



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
ALOESAPONARINA I Y ALOESAPONARINA II Y SUS
DERIVADOS CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA A
(H1N1)pdm09”

Tesis que presenta
REYNA GUADALUPE CHAN BALAN

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS
Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán, México

2016



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Reyna Guadalupe Chan Balan**, titulado "Estudio de la actividad antiviral de aloesaponarina I y aloesaponarina II y sus derivados contra el virus de Influenza A(H1N1)pdm09", fue realizado en los laboratorios de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología y de Virología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán en la línea de investigación de Farmacobiología, bajo la dirección de las Dras. Rocío de Lourdes Borges Argáez y Dra. Guadalupe Ayora Talavera, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro. Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región porque está orientada hacia la economía basada en conocimiento.

Atentamente:

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 27 de enero de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación 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 ha 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 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.



Q.F.B. Reyna Guadalupe Chan Balan

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, así como en el laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” y forma parte del proyecto CONACYT-FONDO SECTORIAL SALUD 2012 (126763) y del proyecto CONACYT-FOMIX (170130), el cual se llevó a cabo bajo la supervisión de la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez y la Dra. Guadalupe Ayora Talavera.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras la Dra. Rocío Borges Argáez y la Dra. Guadalupe Ayora Talavera por permitirme participar en este proyecto, su infinita paciencia y por todos sus consejos a lo largo de este proyecto.

A la Q.B.B. Mirbella Cáceres Farfán por toda su ayuda y enseñanzas en el uso de equipos y reactivos en el análisis fitoquímico.

A mi comité sinodal, la Dra. Luisa López Ochoa, al M. en C. Pablo Sansores Peraza y al Dr. Felipe Vázquez Flota por su tiempo y dedicación para hacer este trabajo mejor.

A la Dra. Leidi Álvarez Sánchez, la M. en C. Lesly Romero Beltrán y a la M. en C. Lisseth Cetina Montejo por su apoyo y enseñanzas en cultivo celular.

A mis amigos de la universidad y compañeros de laboratorio de Química de Productos Naturales y del departamento de Virología por toda su comprensión y afecto.

A LA Red Farmed por el financiamiento para asistir al “Simposio de Química Médica y Diagnóstica 2015” en Taxco de Alarcón, Guerrero.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 395546 otorgada para los estudios de maestría así como el apoyo para los proyecto CONACYT FONDO SECTORIAL SALUD 2012 (126763) y CONACYT-FOMIX (170130), al que perteneció la tesis realizada

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y al Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” por las instalaciones, equipos y reactivos prestados.

DEDICATORIA

A mi familia, por su amor incondicional.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES GENERALES.....	3
1.1 VIRUS DE LA INFLUENZA.....	3
1.1.1 ESTRUCTURA.....	3
1.1.2 CICLO DE REPLICACIÓN.....	4
1.1.3 VARIACIÓN ANTIGÉNICA.....	6
1.2 ORIGEN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A(H1N1)pdm09.....	8
1.3 AGENTES ANTIVIRALES.....	10
1.4 PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE FÁRMACOS.....	12
1.5 <i>Aloe vera</i>	13
1.5.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	15
1.5.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA RAÍZ DE <i>Aloe vera</i>	16
1.5.3 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE <i>Aloe Vera</i>	18
1.6 DERIVATIZACIÓN QUÍMICA.....	21
1.6.1 HIDRÓLISIS.....	21
1.6.2 METILACIÓN.....	22
1.6.3 O-GLUCOSILACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	26
OBJETIVOS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	28
CAPÍTULO II.....	29
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS I Y II PRESENTES EN LAS RAICES DE <i>Aloe Vera</i> Y SUS DERIVADOS SEMISINTÉTICOS.....	29
2.1 INTRODUCCIÓN.....	29

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.2.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES.....	30
2.2.2 EXTRACTO CRUDO METANÓLICO Y MATERIAL VEGETAL.....	31
2.2.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS	31
2.2.4 OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTRAQUINÓNICOS.....	33
2.2.4.1 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO I	33
2.2.4.2 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO II.....	36
2.2.5 DERIVATIZACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS I Y II.....	37
2.2.5.1 HIDRÓLISIS DEL COMPUESTO I.....	38
2.2.5.2 REACCIÓN DE METILACIÓN DEL COMPUESTO I.....	39
2.2.5.3 REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DEL COMPUESTO IV	40
2.2.5.4 REACCIÓN DE O-GLUCOSILACIÓN DEL COMPUESTO III.....	41
2.2.5.5 REACCIÓN DE O-GLUCOSILACIÓN DEL COMPUESTO II.....	42
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
2.3.1 RENDIMIENTOS DE EXTRACTOS ORGÁNICOS Y DEL COMPUESTO I.....	43
2.3.2 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO I (ALoesAPONARINA I).....	43
2.3.3 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO II (ALoesAPONARINA II).....	46
2.3.4 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO III.....	49
2.3.5 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO IV	52
2.3.6 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO V	55
2.3.7 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO VI	58
2.3.8 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO IX	66
2.4 CONCLUSIONES	74
CAPÍTULO III	75
EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS I Y II Y SUS DERIVADOS SEMISINTÉTICOS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA A(H1N1)pdm09.	75
3.1 INTRODUCCIÓN	75
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	78
3.2.1 EQUIPOS Y REACTIVOS.....	78
3.2.2 LÍNEA CÉLULAR, VIRUS Y COMPUESTOS	78
3.2.3 CRECIMIENTO DE CÉLULAS MDCK	79
3.2.4 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	79
3.2.5 ENSAYO DE REDUCCIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO: POST-TRATAMIENTO ..	80
3.2.6 ENSAYO EN PLACA	81
3.2.7 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS	81
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
3.3.1 CITOTOXICIDAD.....	82

3.3.2 ACTIVIDAD ANTIVIRAL	88
3.4 CONCLUSIONES	94
CAPÍTULO IV	95
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL	95
4.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	95
4.2 CONCLUSIÓN GENERAL	97
4.3 PERSPECTIVAS	98
ANEXOS.....	99
BIBLIOGRAFÍA.....	101

ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico
μL	Microlitro
AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
ASI	Aloesaponarina I
ASII	Aloesaponarina II
CCD	Cromatografía en capa delgada
CC	Control celular
CC ₅₀	Concentración citotóxica media
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CV	Control viral
CLV	Cromatografía líquida al vacío
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
Hx	Hexano
HCl	Ácido clorhídrico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IS	Índice de selectividad
J	Constante de acoplamiento
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
M	Molaridad
MCNC	Máxima concentración no citotóxica
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio anhidro

Rf	Factor de retención en CCD
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
UFP/mL	Unidades formadoras de placa / mililitro

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura del virus de la influenza A.	4
Figura 2	Ciclo de replicación del virus de la influenza A.	6
Figura 3	Origen del virus de la influenza A (H1N1)09pdm.	9
Figura 4	Estructuras de fármacos inhibidores de la NA.	10
Figura 5	Clases de productos naturales que inhiben la NA del virus de la influenza.	12
Figura 6	Planta de <i>Aloe vera</i> .	14
Figura 7	Compuestos antraquinónicos presentes en las raíces de <i>Aloe spp.</i>	17
Figura 8	Compuestos de diferente naturaleza química presentes en las raíces de <i>Aloe spp.</i>	18
Figura 9	Antraquinonas de <i>Aloe vera</i> con actividad antiviral.	19
Figura 10	Mecanismo de reacción de la hidrólisis de ésteres en condiciones ácidas.	21
Figura 11	Mecanismo de reacción de la hidrólisis de ésteres en condiciones básicas.	22
Figura 12	Reacción general de la metilación de compuestos fenólicos en condiciones básicas.	23
Figura 13	Mecanismo de la reacción de O-glicosilación de antraquinonas.	25
Figura 14	Diagrama de la estrategia experimental.	28
Figura 15	Método I de obtención del extracto de acetato de etilo (RAV-A).	32
Figura 16	Método II de obtención del extracto de acetato de etilo (RAV-A1).	32
Figura 17	Diagrama de aislamiento del compuesto I a partir de RAV-A.	34
Figura 18	Diagrama de aislamiento del compuesto I a partir de RAV-A1.	36
Figura 19	Diagrama de aislamiento del compuesto II a partir de SC-11.	37
Figura 20	Esquema de reacciones de derivatización química de los compuestos I y II.	38
Figura 21	Reacción general de obtención del compuesto III.	38
Figura 22	Reacción general de obtención del compuesto IV.	39

Figura 23	Reacción general de obtención del compuesto V.	40
Figura 24	Reacción general de obtención del compuesto VI.	41
Figura 25	Reacción general de obtención del compuesto IX.	42
Figura 26	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del compuesto I obtenido a 400 MHz en CDCl ₃ .	45
Figura 27	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del compuesto II obtenido a 400 MHz en (CD ₃) ₂ CO.	48
Figura 28	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del compuesto III obtenido a 400 MHz en DMSO-d ₆ .	51
Figura 29	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del compuesto IV obtenido a 400 MHz en CDCl ₃ .	54
Figura 30	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del compuesto V obtenido a 400 MHz en CD ₃ OD.	57
Figura 31	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del compuesto VI obtenido a 600 MHz en CDCl ₃ .	60
Figura 32	Estructura y espectro de RMN- ¹³ C del compuesto VI obtenido a 150 MHz en CDCl ₃ .	61
Figura 33	Espectro HSQC del compuesto VI obtenido a 600 MHz en CDCl ₃ .	64
Figura 34	Espectro HMBC del compuesto VI obtenido a 600 MHz en CDCl ₃ .	65
Figura 35	Estructura y espectro de RMN- ¹ H del compuesto IX obtenido a 400 MHz en CDCl ₃ .	68
Figura 36	Estructura y espectro de RMN- ¹³ C del compuesto IX obtenido a 100 MHz en CDCl ₃ .	69
Figura 37	Espectro HSQC del compuesto IX obtenido a 400 MHz en CDCl ₃ .	72
Figura 38	Espectro HMBC del compuesto IX obtenido a 400 MHz en CDCl ₃ .	73

Figura 39	Esquema general de las etapas del ciclo de vida del virus de la influenza y su detección mediante ensayos de tiempos de adicción.	77
Figura 40	Compuestos antraquinónicos citotóxicos y no citotóxicos.	85
Figura 41	Mecanismo general del ciclo redox de quinonas.	86
Figura 42	Efecto en el rendimiento viral del virus A/Yucatán/2370/09 tratados con los compuestos II, IV, VII y IX durante el Post-tratamiento.	89
Figura 43	Efecto en el rendimiento viral del virus A/México/InDRE797/10 tratados con los compuestos VII y IX durante el Post-tratamiento.	90
Figura 44	Efecto en el rendimiento viral del virus A/Yucatán/2370/09 (H1N1) pdm tratados con los compuestos VII y IX durante el ensayo de reducción de placa.	91

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Clasificación taxonómica de <i>Aloe vera</i> .	13
Cuadro 2	Compuestos químicos bioactivos de <i>Aloe Vera</i> .	16
Cuadro 3	Actividad antiviral de compuestos antraquinónicos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 en el ensayo de reducción del efecto citopático a nivel post-tratamiento	20
Cuadro 4	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H del compuesto I en comparación con la literatura.	46
Cuadro 5	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H del compuesto II en comparación con la literatura.	49
Cuadro 6	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H del compuesto III en comparación con la literatura.	52
Cuadro 7	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H del compuesto IV en comparación con la literatura.	55
Cuadro 8	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H del compuesto V.	58
Cuadro 9	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto VI.	62
Cuadro 10	Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto IX.	70
Cuadro 11	Efecto citotóxico y antiviral de los compuestos aislados de <i>Aloe vera</i> y derivados semisintéticos.	84

RESUMEN

El alto potencial pandémico de Influenza A así como la aparición de cepas resistentes a oseltamivir y zanamivir, ha puesto en relieve la necesidad de identificar nuevos y más efectivos agentes antivirales. En un estudio previo se determinó la bioactividad del compuesto semisintético antraquinónico 8-hidroxi-3-O-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-1-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidro-2-antracencarboxilato de metilo. (Compuesto VII), contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09 a nivel post-tratamiento. Con el fin de obtener mayor información sobre la relación estructura-actividad de este tipo de compuestos, se evaluó la actividad antiviral de las quinonas Aloesaponarina I (Compuesto I) y Aloesaponarina II (Compuesto II) aislados de las raíces de *Aloe vera* así como sus derivados semisintéticos hidroxilados (Compuesto III), metilados (Compuestos IV, V), y O-glucosilados (compuestos VI-IX) contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09. Las antraquinonas aloesaponarina I y II y sus derivados semisintéticos se purificaron por técnicas cromatográficas e identificaron por técnicas espectroscópicas de RMN-1D y 2D. Los ensayos *in vitro* de citotoxicidad y evaluación antiviral se realizaron en células de riñón canino madin darby (MDCK) en presencia de las cepas virales A/Yucatán/2370/09 y A/México/InDRE797/10, susceptible y resistente a oseltamivir respectivamente.

Se sintetizaron dos novedosas antraquinonas: ácido-8-hidroxi-3-O-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-1-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidro-2-antraceno carboxílico (compuesto VI) y 8-hidroxi-3-O-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-1-metil-9,10-antraquinona (compuesto IX). Los compuestos evaluados no presentaron citotoxicidad *in vitro* con valores de $CC_{50} > 90 \mu\text{M}$. Los compuestos VII y IX fueron los más activos contra la cepa susceptible a oseltamivir con CI_{50} de 23.11 y 9.28 μM respectivamente y contra la cepa resistente con CI_{50} de 62.28 y 19.47 μM . Con base en el análisis de la relación estructura actividad (SAR)

de los compuestos se sugirió que el sustituyente tetraacetilglucosídico en posición C3 de la antraquinona tiene un papel importante en la actividad antiviral. La actividad antiviral a nivel post-tratamiento contra la cepa susceptible se confirmó con el ensayo de reducción en placa. El compuesto VII inhibió significativamente el título viral (>90%) a las concentraciones de 100 y 50 μM , en contraste el compuesto IX inhibió el título de virus en un rango del 30 al 70 % por lo que se propuso que este compuesto podría estar inhibiendo pasos adicionales a la post-infección. Estos resultados sugieren el potencial bioactivo de antraquinonas glucosiladas.

ABSTRACT

The emergence of influenza viruses resistant to the antivirals oseltamivir and zanamivir, and the pandemic potential of some influenza A viruses, highlights the need to develop new and effective antiviral agents. In a previous study it was suggested a possible antiviral effect of a semisynthetic anthraquinone compound named methyl 8-hydroxy-3-O-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-1-methyl-9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenecarboxylate (compound VII) against the influenza A (H1N1)pdm09 at the post-treatment level.

To confirm the previous, the aim of this study was to evaluate the antiviral activity of different quinones, Aloesaponarin I (compound I), Aloesaponarin II (compound II) isolated from the roots of *Aloe vera*, and their hydroxylated (compound III), methylated (methylated IV and V), and O-glycosylated derivatives (compounds VI-IX) against influenza A (H1N1)pdm09 virus. The compounds were purified by chromatographic techniques and identified by 1D and 2D-NMR spectroscopy. In vitro cytotoxicity and antiviral assays were performed on Madin Darby canine kidney (MDCK) cells using A/Yucatan/2370/09 and A/Mexico/InDRE797/10 oseltamivir susceptible and resistant influenza viruses, respectively.

From all compounds to test, the anthraquinones 8-hydroxy-3-O-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-1-methyl-9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracene carboxylic acid and 8-hydroxy-3-O-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-1-methyl-9,10-anthraquinone (Compound VI and IX, respectively) were first synthesized. The results from the cytotoxicity assay indicated that none of the compounds were cytotoxic to the MDCK cells with $CC_{50} > 90 \mu\text{M}$. The antiviral assays indicated that compounds VII and IX were the most active against the susceptible strain with IC_{50} values of 23.11 and 9.28 μM , and IC_{50} values of 62.28 and 19.47 μM for the resistant. The structure-activity analysis suggested that the

presence of a tetraacetylglucoside substituent at the C-3 position of the anthraquinone plays an important role in the antiviral activity. The post-treatment antiviral activity against the susceptible strain was further confirmed with a plaque reduction assay. Viruses treated with Compound VII at 100 and 50 μM were significantly inhibited with a titer reduction of >90 %. In contrast, viruses in the presence of compound IX showed a reduction in viral titers between 30 to 70 %, so it was proposed that this compound could be inhibiting additional steps to post-infection. These results suggest the bioactive potential of glycosylated anthraquinones.

INTRODUCCIÓN

La influenza es una infección respiratoria aguda causada por tres tipos de virus: virus de la influenza A, B y C, de los cuales el tipo A es antigénicamente muy variable y genera la aparición de nuevas cepas circulantes responsables de pandemias (Neumann *et al.*, 2009). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año en el mundo se presentan alrededor de 1, 000 millones de casos de influenza estacional (~15% de la población mundial), entre 3 y 5 millones de casos severos y de 300 a 500 mil muertes. En México constituye un problema de salud prioritario por su continua presencia dentro de las diez principales causas de defunción en los distintos grupos de edad (Secretaría de salud, 2008).

Por otra parte, en el 2009 la OMS declaró la primera pandemia del siglo XXI ocasionada por el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 con altas tasas de mortalidad y morbilidad convirtiéndose en un problema de salud pública (Punpanich *et al.*, 2012). La FDA (Food and Drug Administration) recomienda el uso de los agentes antivirales oseltamivir, zanamivir y peramivir para el tratamiento de infecciones causadas por influenza A y B, estos fármacos son conocidos como inhibidores de la neuraminidasa y se desarrollan a través del diseño racional de pequeñas moléculas análogas al ácido siálico que se unen fuertemente al sitio activo de la sialidasa viral, sin embargo, a menudo están asociados a efectos secundarios adversos y eficacia limitada ante cepas resistentes a estos fármacos. Estudios recientes del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) reportaron casos aislados de cepas de virus de la influenza A(H1N1)pdm09 resistentes a oseltamivir (CDC, 2015), lo que ha orientado a la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas al tratamiento actual.

Los productos naturales son fuente de nuevos fármacos debido a su alto potencial bioactivo contra diferentes organismos como bacterias, hongos y virus. Entre las especies de plantas con valor medicinal, cosmético e industrial se encuentra *Aloe vera*, esta especie posee un amplio espectro de propiedades terapéuticas; se caracteriza fitoquímicamente por la presencia de abundantes compuestos antraquinónicos como emodina, reína, aloemodina, aloesaponarina I y crisofanol, algunos reportados con actividad antiviral (Moghaddasi *et al.*, 2011). En estudios preliminares se determinó la bioactividad del compuesto VII contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 a nivel post-tratamiento, el cual es un derivado

semisintético novedoso de Aloesaponarina I (compuesto I) obtenido a partir de extractos de AcOEt de raíces de *Aloe vera*.

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad biológica de Aloesaponarina I y II (compuestos I y II) aislados de las raíces de *Aloe vera* así como de sus derivados semisintéticos hidroxilados, metilados y O-glucosilados (compuestos III-IX) contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES GENERALES

1. 1 VIRUS DE INFLUENZA

1.1.1 ESTRUCTURA

La influenza o gripe es una enfermedad respiratoria aguda altamente infectocontagiosa cuyas manifestaciones clínicas son fiebre, cefalea, mialgia, postración, coriza, dolor de garganta y tos (Punpanich *et al.*, 2012) es causada por virus monocatenarios de ARN segmentados de sentido negativo que pertenecen a la familia de los *Orthomyxovirus* (Salazar *et al.*, 2010).

Los virus de la influenza se clasifican en tres tipos: A, B y C, dependiendo de las características antigénicas de dos de sus proteínas internas (M y NP). Los virus de la influenza B infectan principalmente a humanos y debido a que sólo existe un subtipo, tiene un bajo potencial pandémico, aunque pueden provocar enfermedades respiratorias severas. Los virus de la influenza C causan enfermedades respiratorias moderadas en humanos y algunos animales. Por otro lado, los tipos A presentan mayor variabilidad genética y alto potencial pandémico (Salazar *et al.*, 2010 y Gatherer *et al.*, 2009).

Las partículas virales del virus de influenza A son pleomórficas con un diámetro de entre 80 y 120 nm, aunque algunas cepas generan partículas filamentosas de hasta 300 nm de longitud; presentan una envoltura lipídica derivada de la célula hospedera que contiene las proteínas de membrana hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y proteína M2. Las proteínas HA y NA son abundantes, siendo la HA mayoritaria en la membrana, mientras que la proteína M2 está presente sólo en unas copias por virión (Samji, 2009). La HA interacciona con el receptor de la célula hospedera durante la entrada del virus y la actividad de NA está involucrada en la liberación de nuevos viriones. Por otra parte, la proteína M2 funciona como un canal iónico que permite el paso de protones (Arias *et al.*, 2009).

El espacio entre la bicapa lipídica y la cápside viral es ocupado por la proteína matriz M1, formando una capa proteica que encierra el genoma viral constituido por ocho segmentos de RNA diferentes que codifican para 11 proteínas, sin embargo, esta cantidad varía dependiendo de la cepa viral. Cada segmento de RNA se encuentra asociado con el

complejo de la polimerasa constituido por dos unidades básicas (PB1, PB2) y una ácida (PA) y con monómeros de la nucleoproteína (NP), formando lo que se denomina ribonucleoproteínas (RNPs) virales. Además el virión incluye la proteína NS2/NEP (proteína de exportación nuclear), que interacciona con la proteína M1 (Arias *et al.*, 2009) (Figura 1).

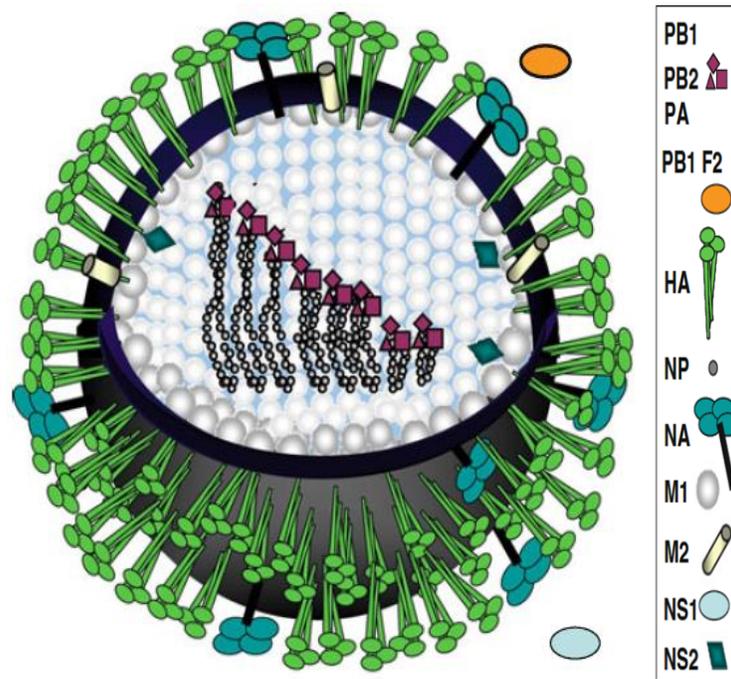


Figura 1. Estructura del virus de la influenza A (Itzstein, 2012). En la membrana plasmática de la partícula viral se encuentran insertadas las proteínas HA, NA y M2. El interior de la partícula está formada por la proteína M1 y el complejo de ribonucleoproteínas, que consiste en los segmentos de ARN genómico asociadas con NP, y las polimerasas PB1, PB2 y PA. Los viriones contienen además las proteínas no estructurales NS2, NS1 y PB1-F2.

1.1.2 CICLO DE REPLICACIÓN

La transmisión del virus de la influenza en humanos se produce por contacto directo con aerosoles emitidos por individuos infectados al toser o estornudar. El virus ingresa por nariz o boca e infecta a las células que recubren el tracto respiratorio (Salazar *et al.*, 2010; Clancy *et al.*, 2008).

En la etapa inicial de la replicación del virus de la influenza A, la HA viral se une a los receptores ácido siálico (AS) α -2,6 de las células del tracto respiratorio y el virus es internalizado al citoplasma celular por endocitosis mediada por la clatrina. La proteína transmembranal M2 funciona como un canal iónico que permite la entrada de protones hacia el interior de la partícula viral, acidificando el interior del endosoma. Por una parte, el bajo pH endosomal induce un cambio conformacional en la hemaglutinina que expone una región hidrofóbica en la proteína, lo que favorece la fusión de las membranas celular y viral, permitiendo la liberación de los complejos de RNP's que contienen el genoma viral. Estos se trasladan al núcleo, donde son transcritos por la ARN polimerasa y se replica el ARN viral de sentido negativo ((-) ARNv), dando lugar a moléculas de ARN de sentido positivo complementario ((+) ARNc), las cuales son utilizadas como una plantilla para generar más ARN viral, y ARN mensajero (ARNm), que se exportan al citoplasma para su traducción. Las proteínas virales que son necesarias en la replicación y la transcripción, son trasladadas de vuelta al núcleo, y los complejos RNPs sintetizados se exportan al citoplasma para encapsidarse. Las proteínas HA, NA y M2 son mediadas por M1 y NEP y transportadas por la ruta secretora *trans*-Golgi; las proteínas maduras llegan a la membrana plasmática, donde M1 ayuda a la formación de partículas de virus. Una vez que se acumula una cantidad crítica de proteína viral, se ensamblan los nuevos virus que salen de la célula por gemación a través de la membrana plasmática, que ya ha sido modificada por la inserción de la HA y la NA del virus, así como por el canal iónico M2 (Figura 2). En esta fase, la liberación de la progenie viral en la célula hospedera es mediado por la actividad de la NA, la cual hidroliza la unión entre el AS en la célula y la HA viral. De no ser así los viriones quedarían retenidos en la superficie celular (Arias *et al.*, 2009; Wilksa *et al.*, 2012; Samji, 2009; Medina y García-Sastre, 2011).

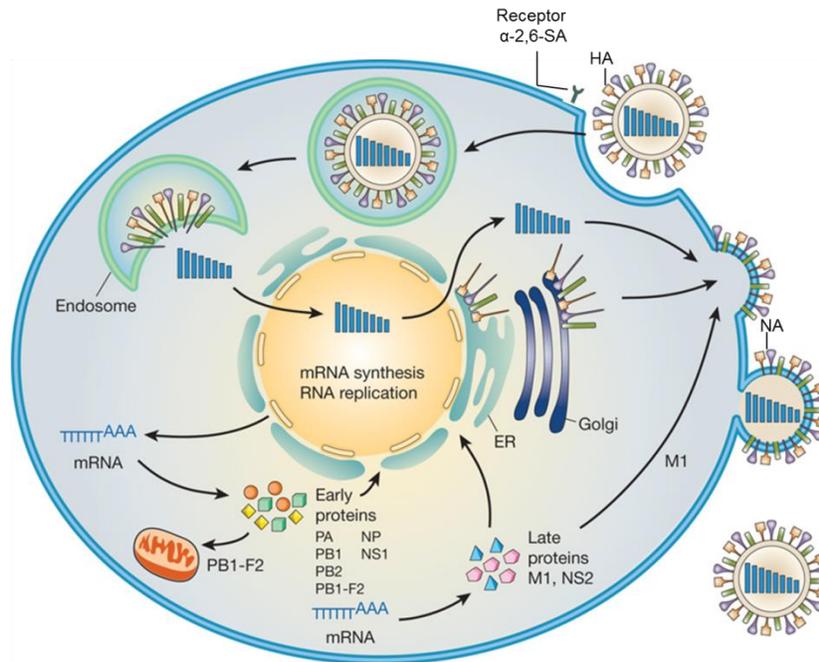


Figura 2. Ciclo de replicación del virus de la influenza A (Neumann *et al.*, 2009). La HA viral interactúa con el receptor AS y el virus es internalizado por endocitosis, la acidificación del endosoma permite la fusión con la membrana plasmática viral y la liberación de las RNPs virales al citoplasma los cuales se transportan a el núcleo donde se lleva a cabo la replicación y la transcripción. El ARN mensajero se exporta al citoplasma para su traducción y las proteínas virales tempranas necesarias para la replicación y transcripción son transportadas de nuevo al núcleo. Las proteínas M1 y NS2 facilitan la exportación nuclear de RNPs recién sintetizados. PB1-F2 está asociado con las mitocondrias y la apoptosis celular. El empaquetamiento y la gemación de los nuevos viriones se producen en la membrana plasmática. La liberación de la progenie viral es mediada por la NA.

1.1.3 VARIACIÓN ANTIGÉNICA

Los virus de influenza A se clasifican por las propiedades antigénicas de sus proteínas de superficie HA y NA (Salazar *et al.*, 2010). Estas dos proteínas son los objetivos principales de la inmunidad en el hospedero. Recientemente se han descrito 18 subtipos de la HA (H1-H18) y 11 subtipos de la NA: (N1-N11) y casi todos se han aislado de las aves silvestres los cuales son los reservorios naturales del virus de la influenza A (CDC, 2016).

Los virus con los subtipos de HA: H1, H2 y H3, y los subtipos de NA: N1 y N2 se han adaptado a los seres humanos desde el siglo pasado, y sólo dos subtipos H1N1 y H3N2, han estado circulando en humanos durante varias décadas. No obstante existen variantes que pueden ser transmitidas directamente por las aves, como los subtipos H5N1 y H9N2 de alta patogenicidad (Masaki *et al.*, 2014; Hilleman, *et al.*, 2002)

Una característica de los virus de influenza es su constante variación antigénica. Los principales mecanismos de variación genética se conocen como deriva y cambio genético. La deriva genética (*antigenic drift*) se debe a mutaciones puntuales, es decir, cambios en nucleótidos individuales que ocurren durante la replicación del genoma viral como resultado de la tasa de error de la RNA polimerasa (Crisci *et al.*, 2013). La acumulación de estos cambios en proteínas de superficie del virus conduce a que el sistema inmune del hospedero no reconozca las proteínas HA y NA del virus (Hilleman, *et al.*, 2002).

Los genes de influenza se encuentran codificados en segmentos separados, este arreglo genómico permite constantes cambios antigénicos (*antigenic shift*), lo que facilita el intercambio de segmentos completos con otras variantes virales y genera nuevas entidades capaces de infectar humanos y mediante eventos mutagénicos pueden adaptarse a ser transmitidos directamente entre ellos. El rearrreglo de segmentos codificantes para HA y NA permite la aparición de nuevos subtipos virales (Salazar *et al.*, 2010, Arias *et al.*, 2009).

Por otra parte, el receptor ácido siálico o ácido *N*-acetilneuramínico se asocia con glicoproteínas en la superficie de las células epiteliales y define el tropismo viral debido a la especificidad que tienen diferentes cepas virales por diferentes tipos de enlace entre el AS y la galactosa que forma parte de las glicoproteínas unidas a la membrana celular. Los virus de influenza humana se unen principalmente al receptor AS con tipos de enlace α -2,6, mientras que los virus de influenza aviar se unen al AS con enlaces α -2,3. En las células epiteliales de la tráquea de cerdos los receptores α -2,3 y α -2,6 se encuentran en igual proporción favoreciendo que el cerdo pueda ser infectado además de virus porcinos, de virus de origen aviar y humano, generando rearrreglos genéticos entre cepas de diferente origen (Wilk *et al.* 2012, Imai *et al.*, 2014). Es por ello, que los cerdos han sido considerados los intermediarios más importantes y la fuente principal de nuevas variantes del virus de la influenza (Medina *et al.*, 2012).

1.2 ORIGEN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A(H1N1)pdm09

En la década de los 90's ocurrió un rearreglo genético (deriva antigénica) entre los virus de la influenza porcina clásica, influenza humana A (H3N2) e influenza aviar de linaje norteamericano, como resultado se originó el virus porcino triple rearreglante A (H3N2) el cual ha estado en circulación en la población porcina de norteamérica. En 1998 ocurrió de nuevo un rearreglo genético entre el virus triple rearreglante H3N2 porcino y el virus de influenza porcina clásica. Este hecho generó dos nuevos subtipos de virus de influenza A porcina: H1N1 y H1N2 los cuales han estado circulando en la población porcina de Asia (Medina y García, 2011).

El virus de la influenza A(H1N1)pdm09 es resultante de la reasociación de segmentos de ARN de virus de origen porcino, aviar y humano. Los genes codificantes de la HA, NP y NS provienen directamente del linaje porcino clásico "norteamericano". Los genes de NA y M provienen del linaje porcino "eurasiático", adquiridos a partir de virus influenza aviar alrededor de 1979. Dos de los genes codificantes del complejo de polimerasas (PB2 y PA) provienen del linaje aviar "norteamericano" y fueron introducidos en la población porcina alrededor de 1998. Por otra parte, el gen PB1 se originó a partir de virus causantes de la gripe estacional humana A(H3N2) (Figura 3). Cabe resaltar que el segmento de gen M confiere resistencia a los fármacos bloqueadores de canales iónicos como los adamantanos (Runstadler *et al.*, 2013; Girarda *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2009; Medina y García, 2011).

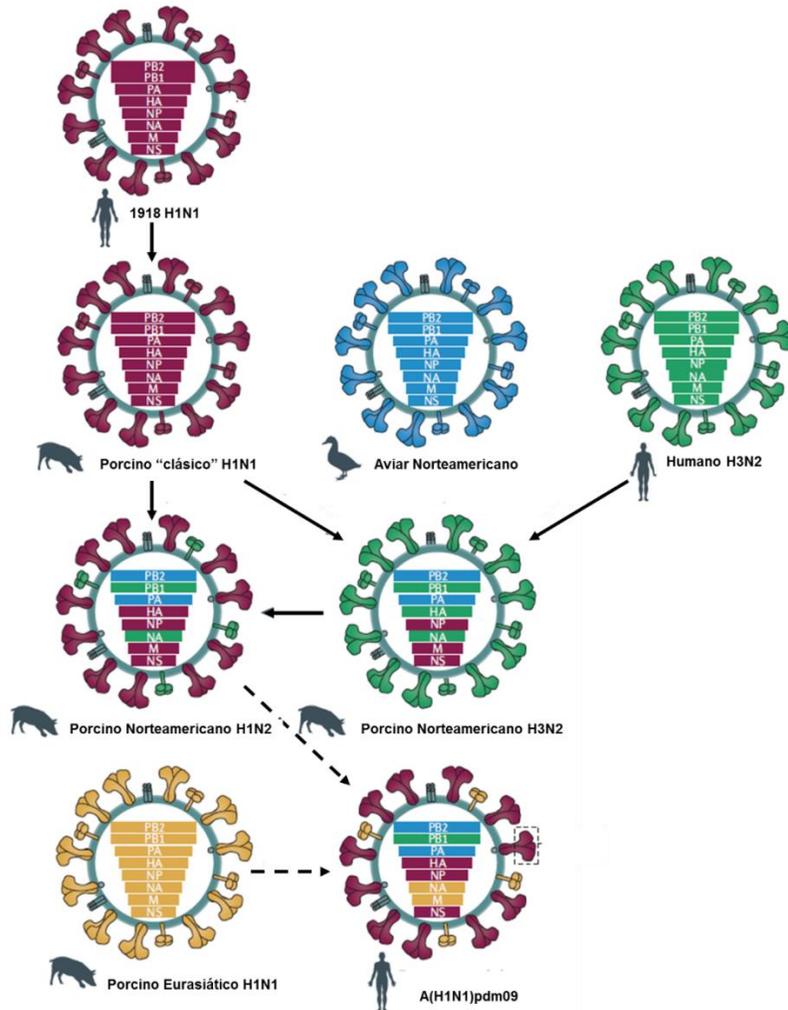


Figura 3. Origen del virus de la Influenza A(H1N1)09pdm (Medina y García, 2011). Los virus de la influenza A de 1918 son antigénicamente similares a los virus de la influenza A porcina. Los virus de la influenza pandémico son triple rearreglantes, sus segmentos genéticos provienen de virus de la influenza aviar, porcina y humana. Los genes PB2 y PA provienen de virus aviares, el gen PB1 es de origen humano del virus de la influenza A H3N2. Los genes HA, NP y NS provienen de virus porcinos clásicos. Los otros genes NA y M provienen de virus porcinos eurasiáticos.

La epidemia de la influenza A(H1N1)pdm09 infectó a más de 600,000 personas en todo el mundo y se caracterizó por una alta velocidad de transmisión pero baja virulencia, además de infectar con mayor frecuencia a la población relativamente joven (<30 años), a diferencia

de la Influenza estacional (Influenza A y B) que afecta principalmente a los extremos etarios de la población (Punpanich *et al.*, 2012 y Chang *et al.*, 2009).

1.3. AGENTES ANTIVIRALES

La FDA (Food and Drug Administration) aprueba el uso de dos antivirales para el control de Influenza: los adamantanos como la amantadina y rimantadina que se utilizan contra influenza A pero no contra B, sin embargo, se ha limitado su uso debido a la alta prevalencia de los virus de la influenza A(H3N2) y A(H1N1)pdm09 resistentes a estos fármacos (CDC., 2016). Y los inhibidores de la neuraminidasa (INA) como el oseltamivir, zanamivir y peramivir (Figura 4) los cuales se usan en el tratamiento de influenza A y B incluyendo el actual virus pandémico (CDC, 2016; Moscona, 2005).

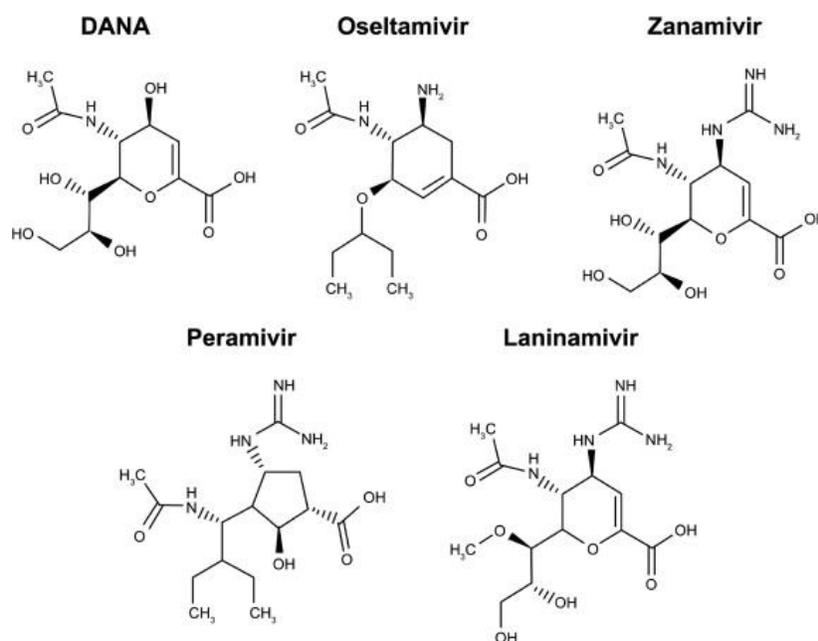


Figura 4. Estructura de fármacos inhibidores de la NA (Samson *et al.*, 2013).

El oseltamivir es un profármaco de éster de etilo que se metaboliza en el organismo transformándose en carboxilato de oseltamivir que es su forma activa, fue desarrollado a través de modificaciones en el ácido siálico, incluyendo la adición de una cadena lateral lipofílica voluminosa, permitiendo que el fármaco se administre por vía oral. Oseltamivir

muestra poca o ninguna actividad contra la NA de otros virus, bacterias o microsomas hepáticos humanos (Samson *et al.*, 2013, Itzstein, 2012).

Zanamivir es un análogo 4-desoxi-4-guanidino de DANA (ácido 5-acetamido-2,6-anhidro-3,5-dideoxi-D-glicero-D-galacto-non-2-enoico) que fue aprobada como un agente anti-influenza en 1999. Debido a su baja biodisponibilidad oral, zanamivir se formula como un polvo seco que tiene que ser inhalado (Samson *et al.*, 2013).

Peramivir es un compuesto mímico del ácido siálico con un núcleo de ciclopentano, un grupo carboxilato cargado negativamente, un grupo guanidino cargado positivamente y una cadena lateral lipófila. Debido a su baja biodisponibilidad, este fármaco se administra parentalmente (Samson *et al.*, 2013).

Estos antivirales actúan como inhibidores específicos de la NA viral ya que son productos análogos del sustrato natural que compiten por la unión en el sitio activo de la sialidasa, por consecuencia los viriones producidos se mantienen unidos a la superficie celular y agregados entre sí, inhibiendo su diseminación e infección a otras células (Moscona, 2005).

La resistencia a los INA está asociada a mutaciones en el gen de la NA, pero estos virus con frecuencia son menos aptos, aparecen esporádicamente y no se propagan. Sin embargo, en la temporada del 2007/2008 se observó la circulación mundial de cepas A/H1N1 resistentes a oseltamivir debido principalmente a la mutación H275Y (Nitsch-Osuch y Berneta, 2014; Fiore *et al.*, 2011).

De acuerdo a las estadísticas de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) al 9 de abril de 2016 se detectaron 11 virus de la influenza A(H1N1)pdm09 (0.7 %), resistentes a oseltamivir y peramivir durante la temporada de influenza 2015-16 en los Estados Unidos. La resistencia al oseltamivir y peramivir es poco frecuente entre los virus de la influenza A (H1N1)pdm09, sin embargo existe la tendencia a incrementar estas cifras a través del tiempo. Por otra parte, los virus mutantes resistentes a oseltamivir no parecen transmitirse eficientemente de persona a persona, por lo que los casos de aislamiento de virus resistentes a éste fármaco han sido esporádicos (CDC, 2016).

1.4 PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE FÁRMACOS

Los recursos vegetales son fuente de un gran número de productos metabólicos secundarios. Así mismo, estas moléculas tienen un potencial importante en aplicaciones en la medicina moderna como: a) fuente directa de agentes terapéuticos, b) materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, c) modelos estructurales para la elaboración de drogas sintéticas, d) marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Calixto, 2005).

Mundialmente el 44 % de los medicamentos nuevos están basados en productos naturales y en países desarrollados el 25 % de los medicamentos son derivados de plantas. Tal es su importancia, que aproximadamente el 60 % de compuestos anticancerígenos y el 75 % de medicamentos contra enfermedades infecciosas son productos naturales o derivados de estos (Pandey *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2008).

En un estudio realizado por Grienke y cols (2012) se reportó un compendio de productos naturales con actividad anti-influenza y los distribuyeron de acuerdo a su clase química. Se encontró que los flavonoides y estilbenos son los metabolitos secundarios más reportados con actividad antineuraminidasa, en contraste, son pocos los registros de terpenos con potencial como inhibidores de la neuraminidasa, en este mismo estudio no se encontraron registros de antraquinonas con actividad antiviral (Figura 5).

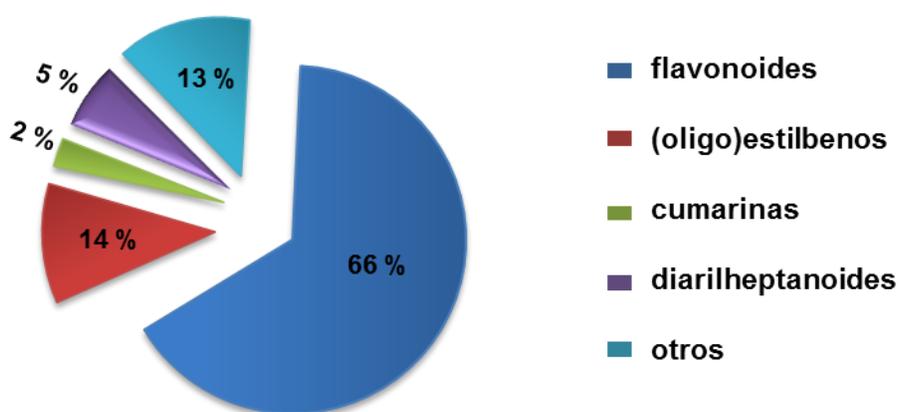


Figura 5. Clases de productos naturales que inhiben la NA del virus de influenza (Grienke *et al.*, 2012).

1.5 *Aloe vera*

A. vera (sinónimo: *A. barbadensis* Miller) pertenece a la familia de las *Xanthorrhoeaceae* (Cuadro 1) que comprende alrededor de 300 especies, la mayoría son nativas del sur de África, Madagascar y Arabia, sin embargo es cultivada en todo el mundo excepto en la tundra, desiertos y selvas tropicales. El cultivo tarda aproximadamente 4 años para llegar a su madurez y tiene una vida útil en promedio de 12 años (Chinchilla *et al.*, 2013; Moghaddasi y Verma, 2011).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica *A. vera*. (Trópicos, 2015)

Clase	<i>Equisetopsida</i> C. Agardh.
Orden	<i>Asparagales</i> Link.
Familia	<i>Xanthorrhoeaceae</i> Dumort.
Género	<i>Aloe</i> L.
Especie	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.

A. vera es una planta perenne, xerófila, suculenta con hojas triangulares carnosas que alcanzan dimensiones de 50 cm de largo por 12 cm de ancho aproximadamente con picos a lo largo de los bordes (Figura 6). El gel de apariencia clara se encuentra en el parénquima fresco del centro de la hoja. El látex líquido es de color amarillento y consistencia pegajosa y se deriva de los túbulos pericíclicos que delimitan la corteza de la hoja; esta parte de la planta produce gran cantidad de antraquinonas. Las flores que son poco utilizadas medicinalmente son amarillas. Sus raíces son medianamente superficiales y forman una red compleja que le permite captar agua con mayor facilidad (Chinchilla *et al.*, 2013).



Figura 6. Planta de *Aloe vera*

Las especies más populares de *Aloe* son *A. vera*, *A. aborescens* y *A. chinensis* dentro de ellas *A. barbadensis* Miller es considerada la especie más activa biológicamente (Patel *et al.*, 2012). A pesar de la gran variedad de especies, sólo *A. vera* y *A. aborescens* se cultivan comercialmente (Ahlawat *et al.*, 2011; Gantait *et al.*, 2014).

El *A. vera* tienen amplias aplicaciones en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética por lo tanto, la alta demanda de sus hojas no es satisfecha con la producción actual (Ahlawat *et al.*, 2011; Gantait *et al.*, 2014).

Aunque *A. vera* se propaga de forma vegetativa en su estado natural, su tasa de propagación resulta ser demasiado lenta para la producción comercial de plántulas, se estiman que una planta de sábila requiere un período de por lo menos un año para la producción de aproximadamente cuatro brotes después de la realización del trasplante (Gantait *et al.*, 2014). Por ello, el cultivo *in vitro* de tejidos de *Aloe* constituye una opción biotecnológica para conseguir la propagación clonal rápida del cultivo, recomendada para especies vegetales que presentan bajos índices de multiplicación, logrando así la producción masiva de hijuelos libres de cualquier patógeno que pueda inhibir el desarrollo y posterior aprovechamiento económico del cultivo. La micropropagación *in vitro* de *A. vera*

puede ser por organogénesis, esta vía requiere la selección apropiada de explantes a su edad óptima, formulaciones precisas de medios, reguladores de crecimiento específicos, fuentes de carbono, agentes gelificantes y otros factores físicos que incluyen intensidad de luz, temperatura y humedad (Álvarez *et al*, 2012, Gantait *et al*, 2014; Amoo *et al*, 2012). El desarrollo y optimización de sistemas de cultivo *in vitro* de tejidos de *Aloe spp* es necesario para la producción a gran escala de esta especie comercialmente importante.

1.5.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

A. vera se ha utilizado durante muchos siglos por sus propiedades curativas y terapéuticas. Poco más de 200 diferentes tipos de moléculas han sido aislados de ésta especie de las cuales se han identificado más de 75 compuestos activos, pese a ello los efectos terapéuticos no han sido correlacionados específicamente con cada componente individual, por lo que se cree que esta actividad biológica está relacionado a una acción sinérgica entre los compuestos contenidos en lugar de una sola sustancia química (Hamman *et al.*, 2008).

Químicamente el *A. vera* se caracteriza por la presencia de constituyentes fenólicos que son generalmente clasificados en dos principales grupos: las cromonas, como la aloensina y las antraquinonas (libres y glicosiladas) como la barbaloína, isobarbaloína y la aloemodina; estos compuestos se encuentran en el acíbar y raíces (Maharjan *et al.*, 2015).

El gel es la parte de la planta que se ha utilizado con más fines terapéuticos, es abundante en glicoproteínas y polisacáridos como glucomanano y acemanano a los cuales se les atribuye actividad antiviral, antibacteriana, laxante, antiinflamatoria, inmunoestimulante y antioxidante. Por otro lado, el látex también conocido como acíbar, contiene gran cantidad de compuestos fenólicos derivados de cromona, antraquinona o antrona. Algunos de éstos son ampliamente distribuidos en el género y algunos se limitan a unas pocas especies y por lo tanto, son de potencial valor taxonómico. El látex tiene además un alto contenido de aloína (28% base húmeda), que es un C-glucósido de la antrona aloemodina. En el cuadro 2 se presenta de forma general los compuestos bioactivos del *A. vera* (Moghaddasi *et al.*, 2011).

Cuadro 2. Compuestos químicos bioactivos de *A. Vera* (Moghaddasi *et al.*, 2011).

Clase	Metabolito	Propiedades
Antraquinonas/ antronas	Aloemodina, ácido aloético, antranol, barbaloina, isobarbaloina, emodina, éster del ácido cinámico.	Aloína y emodina actúan como analgésicos y antivirales.
Carbohidratos	Manano, manano acetilado, glucomanano acetilado, galactano, arabinogalactano, sustancia péctica, xilano, celulosa.	Alprogen es una glicoproteína con propiedades antialérgicas y antiinflamatorias.
Cromonas	8-C-glucosil-noreugenina, Isoaloesina D, isorabaicromona, neoaloesina A	Actividad antiinflamatoria
Enzimas	Fosfatasa alcalina, bradiquinasa, carboxipeptidasa, catalasa, lipasa.	Bradiquinasa tiene actividad antiinflamatoria
Vitaminas	Vitamina A, B12, C, E, colina y ácido fólico	Vitamina A, C y E son antioxidantes y neutralizan radicales libres.
Hormonas	Auxinas y giberelinas	Actividad antiinflamatoria y en la cicatrización de heridas.

1.5.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE RAÍZ DE *Aloe vera*

Las raíces del género *Aloe* producen compuestos diferentes a los aislados en las hojas y la distribución limitada de sus metabolitos en otras especies puede ser de valor taxonómico (Wyk *et al.*, 1995; Howaida *et al.*, 2009).

Diversos estudios fitoquímicos han confirmado la presencia de compuestos preantraquinónicos y antraquinónicos en *A. vera* como el crisofanol (1), aspodelina (2), aloecrisona (3), los 1-8-dihidroxi antraquinonas: aloesaponarina I (4) y aloesaponarina II (5), éster metílico del ácido lacácico (6) y los 1-metil-8-hidroxiantraquinonas: aloesaponol I (7), aloesaponol II (8) (Figura 7) (Wyk *et al.*, 1995; Collí, 2014).

En otras especies de *Aloe* se han aislado hidroxiquinonas como aloemodina (9) (Figura 10), aloesaponarina II-3-metil éter (10), ziganeina (11), crisofaneina (12). También se ha purificado 4-7 dicloroquinolina (13), lupeol (14), aloína B (15), isovitexina (16) y los

derivados de ácidos fenólicos: ácido cafeico (17) y ácido ferúlico (18) (Figura 8) (Howaida *et al.*, 2009).

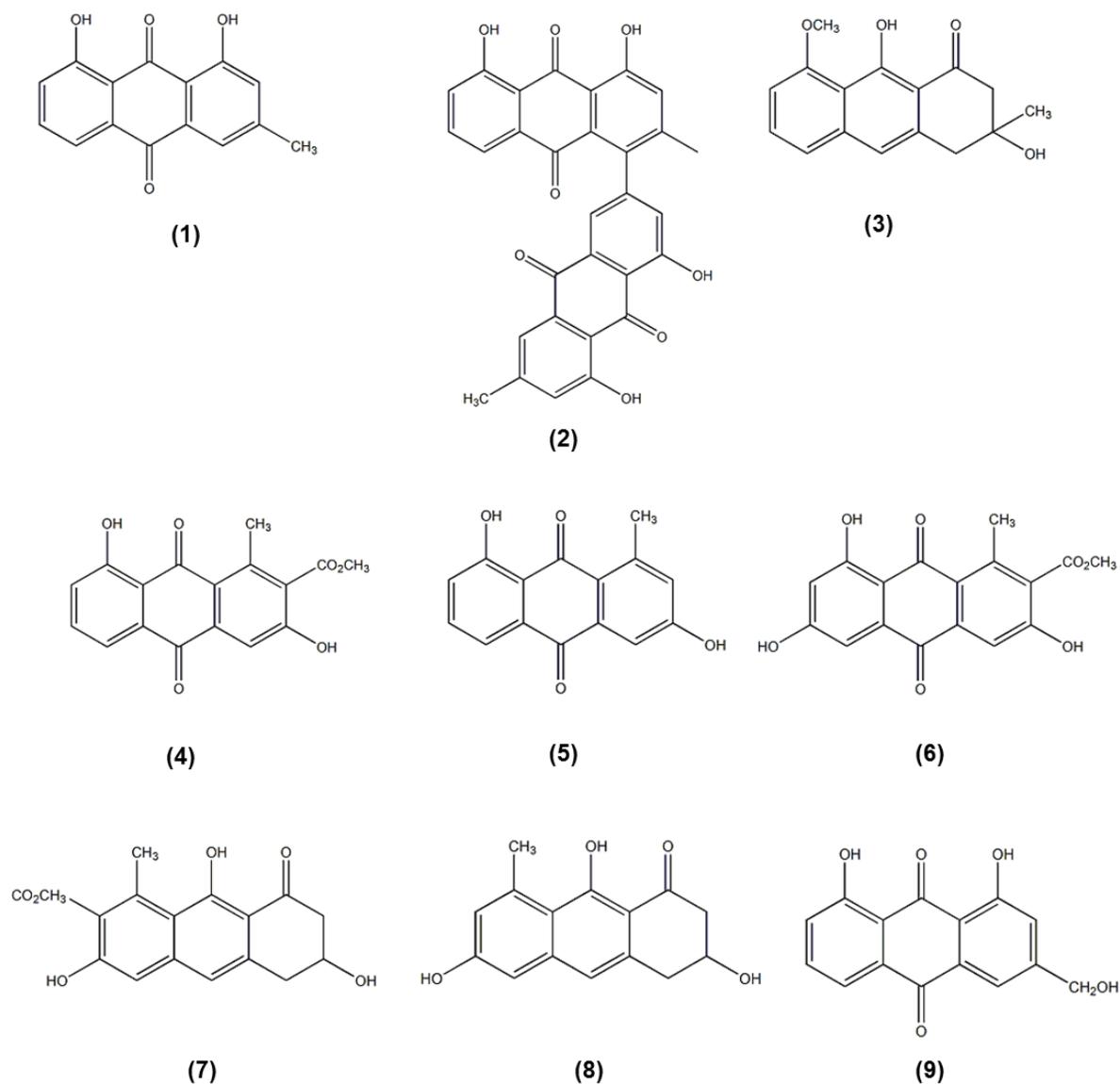


Figura 7. Compuestos antraquinónicos presentes en las raíces de *Aloe spp* (Wyk *et al.*, 1995; Collí, 2014; Howaida *et al.*, 2009).

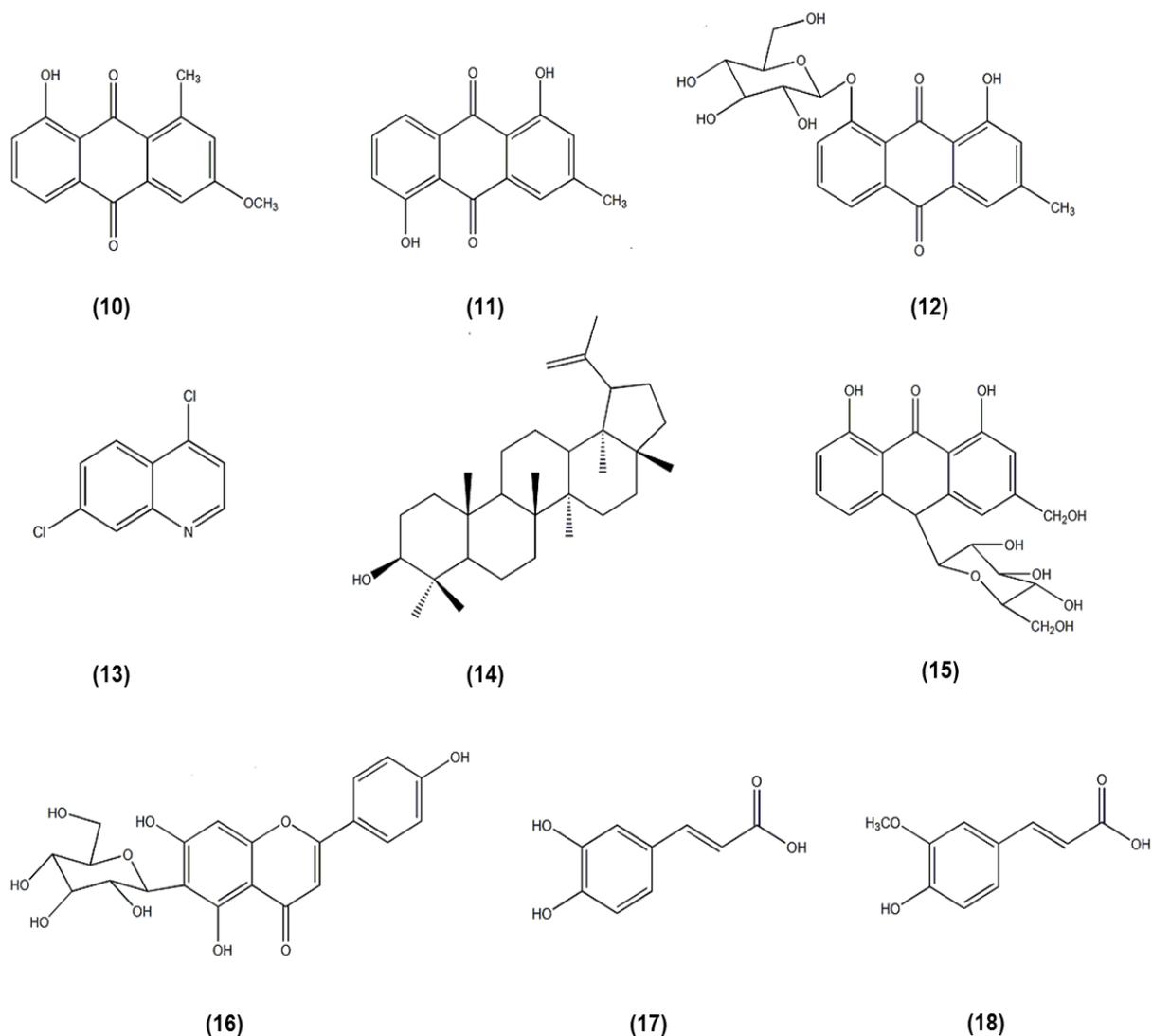


Figura 8 Compuestos de diferente naturaleza química presentes en las raíces de *Aloe spp* (Wyk *et al.*, 1995; Collí, 2014; Howaida *et al.*, 2009)

1.5.3 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE *Aloe Vera*

Estudios *in vitro* han demostrado el efecto antiviral de las antraquinonas emodina (19), reína (20), aloemodina (9) y crisofanol (1) contra el virus de herpes simple tipo I (VHS-I), herpes simple tipo II (VHS-II), rabia, citomegalovirus (CMVH), varicela zóster (VVZ), virus de encefalitis Japonés (VEJ) e Influenza A. (Shih-Wen *et al.*, 2014) Figura 9. Estudios preliminares han sugerido la bioactividad de extractos de *A. vera* contra el virus de

inmunodeficiencia humana (VIH) estimulando la producción de células CD4. Otros experimentos sugieren que extractos metanólicos de *A. vera* incrementan la producción de IFN- α 2 que son proteínas segregadas por el sistema inmune como respuesta a patógenos, tales como virus (Weiyang *et al.*, 2012, Shih-Wen *et al.*, 2014).

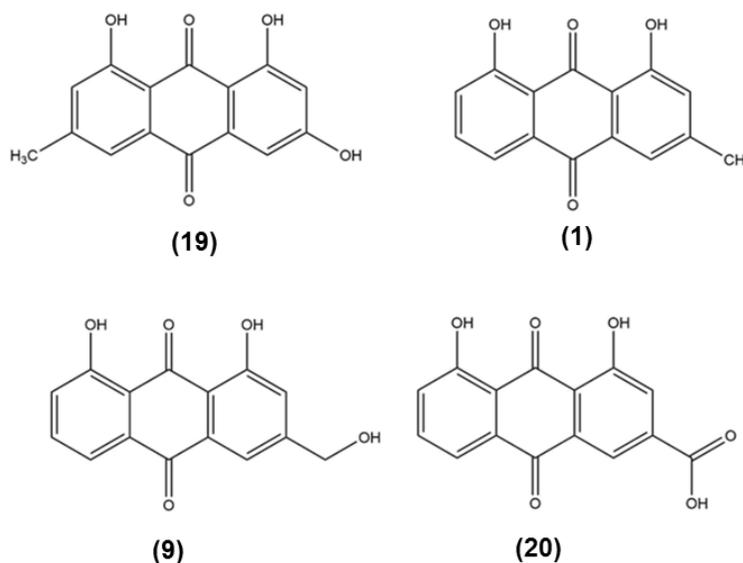


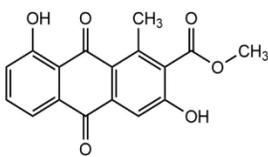
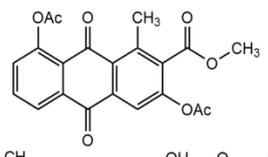
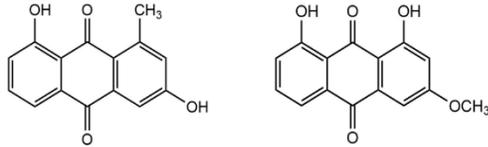
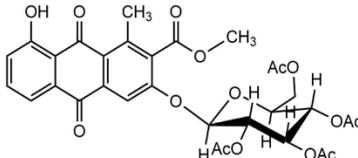
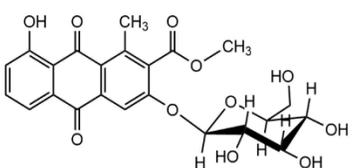
Figura 9. Antraquinonas de *Aloe vera* con actividad antiviral (Shih-Wen *et al.*, 2014).

Además, extractos de flores, hojas y raíz de *A. hijazensis* han mostrado actividad antiviral contra el paramixovirus aviar tipo I (APMV-1) y el virus de influenza A (H5N1) con IS $>$ 60 (Howaida *et al.*, 2009).

Recientemente el grupo de investigación de la Dra. Rocío Borges del Centro de Investigación Científica de Yucatán en colaboración con el grupo de trabajo de la Dra. Guadalupe Ayora del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” realizaron la evaluación antiviral de 25 moléculas de diferente naturaleza química, encontrándose antraquinonas, naftoquinonas, triterpenos y bencilsulfurados contra la cepa del virus de influenza A/Yucatán/2370/09. A partir de este estudio se encontró el potencial bioactivo de compuestos quinónicos. En el cuadro 3 se presentan los resultados de la actividad antiviral de los compuestos antraquinónicos evaluados a nivel post-tratamiento. Los compuestos VII, VIII y XI son derivados sintéticos del compuesto I conocido comúnmente como Aloesaponarina I (ASI). El compuesto II conocido comúnmente como Aloesaponarina II

(ASII) es un derivado natural descarboxilado del compuesto I. De forma general se observó que las modificaciones estructurales del compuesto I tales como acetilación (Compuesto XI) y O-glucosilación (Compuestos VII y VIII) contribuyeron a disminuir su actividad citotóxica, así mismo el compuesto VII resultó ser más activo (R. Borges, comunicación personal, Febrero 2014; Collí, 2014). Con base en estos resultados, el objetivo de este trabajo fue realizar modificaciones estructurales de Aloesaponarina I y II que potencien su actividad antiviral.

Cuadro 3. Actividad antiviral de compuestos antraquinónicos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 en el ensayo de reducción del efecto citopático a nivel post-tratamiento.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	POSTRATAMIENTO A/Yucatán/2370/09 MOI= 0.001		
		CITOTOXICIDAD CC ₅₀ (µM)	Cl ₅₀ (µM)	IS
I		89.74	>20.03	≤4.48
XI		81.27	>12.86	≤6.31
II:XII (1:1)		156.85	>47.70	≤3.28
VII		>155.72	7.78	>20.01
VIII		>210.92	>210	1

CC₅₀ = Concentración citotóxica media, Cl₅₀ = Concentración inhibitoria media, IS= Índice de selectividad
MOI= Multiplicidad de infección. Compuestos: I (Aloesaponarina I), II (Aloesaponarina II), VII y VIII (derivados O-glucosilados de Aloesaponarina I), XI (Aloesaponarina I diacetilada) y XII (metoxicrisantina).

1.6 DERIVATIZACIÓN QUÍMICA

Los compuestos con grupos ácidos, metoxilos y O-glucosilos tienen amplio espectro de bioactividad y aplicaciones en la industria farmacéutica, pueden encontrarse de forma natural en plantas, hongos y otros microorganismos. La importancia que tienen estos compuestos en procesos biológicos ha estimulado el interés científico en el desarrollo de métodos sintéticos (Bernini *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2002; Wang, 2010).

1.6.1 HIDRÓLISIS

Los derivados esterificados están presentes como profármacos, productos naturales y compuestos sintéticos, son frecuentemente usados en la protección de grupos carboxilo y alcoholes. La hidrólisis de ésteres puede llevarse a cabo en condiciones ácidas, básicas o mediante enzimas (Goverdina *et al.*, 2013).

La hidrólisis catalizada en condiciones ácidas es un proceso inverso a la esterificación de Fisher, y es un sistema menos reactivo que la hidrólisis básica. Por lo que, debido a que se tiene un nucleófilo débil y un electrófilo pobre, es necesario activar el éster mediante la protonación del carbonilo haciéndolo más electrofílico (Wade, 2004). En la figura 10 se presenta el mecanismo de acción general de la hidrólisis ácida.

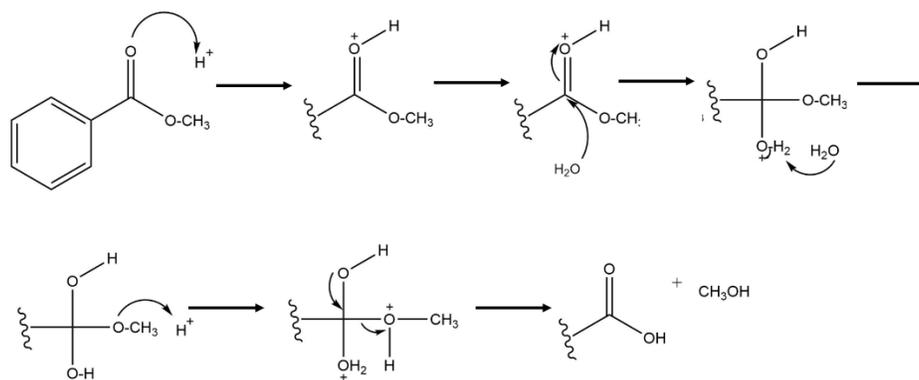


Figura 10. Mecanismo de reacción de la hidrólisis de ésteres en condiciones ácidas. Se observan cuatro etapas principales: la protonación del éster, la adición nucleofílica del agua al carbonilo, el equilibrio ácido base que conduce a la transformación del metóxido en un buen grupo saliente, por último la eliminación del metanol y formación de un ácido carboxílico (Wade, 2004).

La hidrólisis básica de ésteres también conocido como saponificación implica la disolución de los reactantes éster e hidróxido (KOH, NaOH, LiOH) en soluciones acuosas o mezclas de agua con disolventes orgánicos como metanol, etanol, tetrahidrofurano, dioxano y dimetoxietano. La reacción es llevada a cabo en condiciones de exceso del hidróxido seleccionado usualmente entre 0.1 N a 2 N. En presencia de calor o a temperatura ambiente en un período de tiempo entre 30 min hasta 24 h o más. La velocidad de reacción es alterada por efectos estéricos así como interacciones de los reactantes con el disolvente. Así mismo, la reacción nucleofílica entre el hidróxido (OH⁻) y el éster electrofílico en un medio acuoso involucra una gran energía de desolvatación, debido a que el ion de hidróxido es fuertemente solvatado por las moléculas de agua. Por ello, el uso de disolventes apróticos puede aumentar la velocidad de reacción (Theodorou *et al.*, 2007).

En la figura 11 se describe el mecanismo de reacción general de hidrólisis básica (Wade, 2004). Esta reacción ha reportado rendimientos del 90-70 % y es un método simple, rápido y menos costoso (Theodorou *et al.*, 2007).

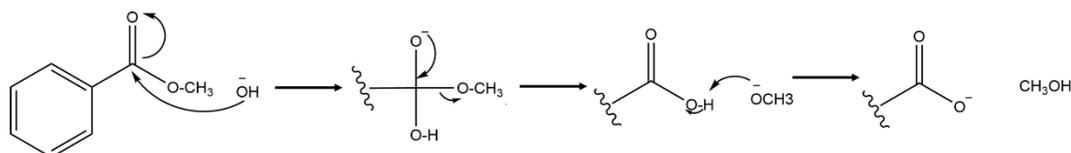


Figura 11. Mecanismo de reacción de la hidrólisis de ésteres en condiciones básicas. Se observan tres pasos importantes: el ataque nucleofílico del hidróxido al carbonilo del éster rompiendo el enlaces π y formando un intermediario tetraédrico. Posteriormente la eliminación del grupo saliente alcóxido RO⁻ que da lugar a la formación del ácido carboxílico. Finalmente, ocurre una rápida transferencia de protones altamente exotérmica formando el ión carboxilato y metanol (Wade, 2004).

1.6.2 METILACIÓN

Los compuestos O-metilados son de importancia farmacocinética debido a que llegan a ser más resistentes al metabolismo hepático y muestran un alto grado de absorción intestinal, además algunos estudios han demostrado que estos compuestos pueden ser más bioactivos que sus derivados hidroxilados (Bernini *et al.*, 2011).

La metilación de compuestos fenólicos ocurre en las rutas biosintéticas de las plantas, microorganismos y mamíferos a través de enzimas O-metil transferasas. Químicamente la

reacción se lleva a cabo mediante agentes alquilantes como diazometano, sulfato de dimetilo, yoduro de metilo y carbonato de dimetilo (Lamoureux y Agüero, 2009; Bernini *et al.*, 2011). Los agentes alquilantes pueden dividirse en tres categorías dependiendo de las condiciones de reacción; básica, neutral o ácida. En condiciones básicas el agente alquilante actúa como electrófilo, en condiciones neutras existen diferentes posibilidades de mecanismo de acción, donde el agente alquilante actúa primero como una base formando especies activas que rápidamente continúan con la alquilación. Finalmente, en medio ácido actúa como nucleófilo (Lamoureux y Agüero, 2009). La metilación en condiciones básicas o neutras generalmente son irreversibles, más selectivas y pueden proporcionar altos rendimientos de reacción (Lamoureux y Agüero, 2009).

La reacción de metilación utilizando sulfato de dimetilo como agente alquilante en condiciones básicas es conocida como metilación de Haworth, no es quimioselectiva ya que puede alquilar ácidos fenólicos así como fenoles (Lamoureux y Agüero, 2009). El mecanismo general de reacción utilizando K_2CO_3 se presenta en la figura 12 (Lewis *et al.*, 1930; Wade, 2004).

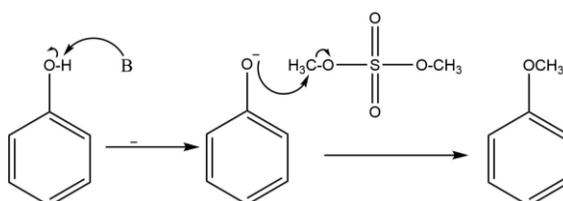


Figura 12. Reacción general de la metilación de compuestos fenólicos en condiciones básicas (Bernini *et al.*, 2011). La desprotonación del grupo fenilo por la base produce un alcóxido de potasio, el cual actúa como un nucleófilo fuerte que reacciona con el sulfato de dimetilo para dar lugar al éter de arilo como producto final de reacción. Así mismo, se obtiene sulfato de potasio como subproducto y el carbonato de potasio excedente (Wade, 2004).

1.6.3 O-GLUCOSILACIÓN

Existen varias condiciones de reacción para la formación de derivados aromáticos O-glucosilados, siendo las más prometedoras las denominadas reacciones de transferencia de fases o reacción catalítica bifásica acuosa. Este método es utilizado cuando se necesita mezclar una serie de reactivos que no son solubles en el mismo disolvente. Esto ocurre cuando uno de los reactivos es un anión (fenolato desprotonado) soluble en agua pero no en disolventes orgánicos, y el otro reactivo es un compuesto orgánico que no puede ser soluble en agua (bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -glucopiranososa en CH_2Cl_2). De este modo, el sistema está formado por dos disolventes inmiscibles entre sí, que muestran poca tendencia a reaccionar por estar en fases separadas. Para que la reacción tenga lugar es necesaria la adición de un agente de transferencia (agentes catalíticos), como son las sales cuaternarias de amonio, las cuales son solubles en ambas fases. Esta sal de amonio forma un par iónico lipofílico con el fenolato desprotonado, y no interfiere en la reactividad del fenolato, y de esta forma migra a la fase orgánica permitiendo la reacción con el haluro de glicósido. El par iónico formado entre el agente de transferencia y el anión se encuentra débilmente asociado, favoreciendo la reacción con la molécula orgánica. Puesto que la reacción procede vía un mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$ ocurre la inversión estereoselectiva del centro anomérico del azúcar (Figura 13) (Yu y Sun, 2010; Jacobsson *et al*, 2006; Gupta *et al*, 2002).

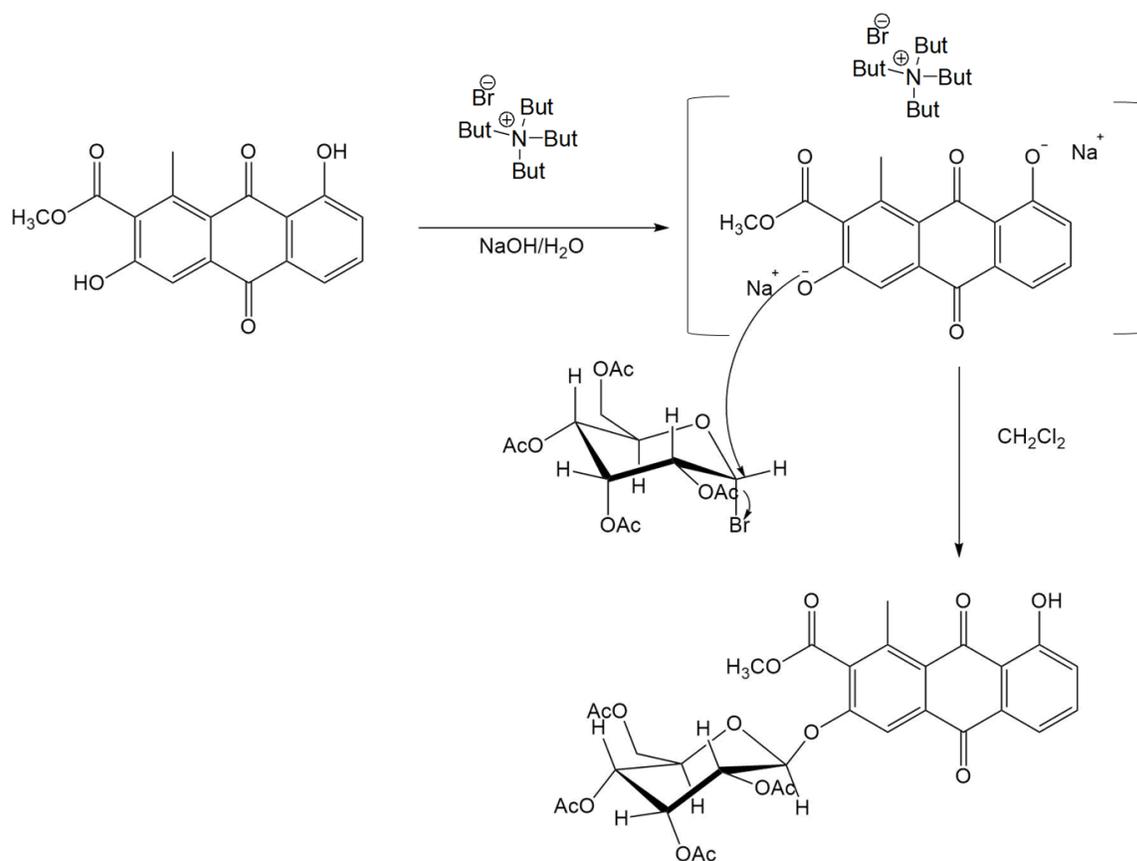


Figura 13. Mecanismo de la reacción de O-glicosilación de antraquinonas. En condiciones básicas acuosas los grupos hidroxilo de la antraquinona se desprotonan formando un fenóxido que actúa como nucleófilo y reacciona con la glucosa bromada la cual se encuentra en la fase orgánica de CH₂Cl₂ formando el derivado O-glucosilado. El bromuro de tetrabutilamonio (C₁₆H₃₆BrN) actúa como un agente de transferencia de los reactantes de una fase a otra (Yu y Sun, 2010; Wade, 2004).

La derivatización química de compuestos es una herramienta útil en la protección de grupos funcionales, en el desarrollo de fármacos y/o profármacos con propiedades farmacocinéticas más favorables y también en el análisis de la relación estructura química-actividad biológica de compuestos con una diana molecular determinada, diversos estudios de esta índole han contribuido al diseño de fármacos antivirales. Actualmente, la influenza es una enfermedad viral que afecta al 15 % de la población mundial y constituye un problema de salud pública. Tras el surgimiento de cepas con potencial pandémico como el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 y la resistencia desarrollada a oseltamivir y zanamivir, resulta necesario la investigación de nuevas opciones a los tratamientos actuales. En un

estudio previo se determinó el potencial anti-influenza a nivel post-tratamiento de compuestos antraquinónicos obtenidos de *A. vera*, por lo tanto en este trabajo se propone la modificación química de antraquinonas a partir de reacciones de metilación, hidrólisis y O-glucosilación que potencien su bioactividad y disminuyan su citotoxicidad.

HIPÓTESIS

Los derivados O-glucosilados de Aloesaponarina I y II, así como los derivados metilados e hidroxilados de Aloesaponarina I presentan actividad antiviral contra el virus de la influenza A (H1N1)pdm09 a nivel post-tratamiento.

JUSTIFICACIÓN

La influenza o gripe es una enfermedad viral de distribución mundial que cada año afecta al 15 % de la población mundial y provoca miles de muerte. Es ocasionada por tres tipos de virus: virus de la influenza A, B y C, de los cuales los virus de la influenza A debido a su constante variación antigénica son considerados de alto potencial pandémico y representan un problema de salud pública. Durante el 2009 ocurrió la primera pandemia del siglo XXI ocasionado por la cepa A(H1N1)pdm09 la cual es resultante de la re asociación de segmentos genéticos de origen aviar, porcino y humano, así mismo una mutación en el gen de la M2 le confiere resistencia a los antivirales amantadina y rimantadina, por lo tanto, la FDA ha recomendado el uso de los fármacos inhibidores de la neuraminidasa como principal tratamiento de la Influenza A. Sin embargo, a pesar que la mayoría de las cepas de virus de la influenza A y B son susceptibles a oseltamivir, se han reportado casos aislados de infección por influenza A(H1N1)pdm09 resistente a oseltamivir, asociado a la mutación H275Y en el gen de la neuraminidasa. Esta problemática ha motivado a la búsqueda de nuevas opciones al tratamiento actual, a través del desarrollo de fármacos más eficaces y con menos efectos tóxicos (CDC, 2014).

Una fuente de productos bioactivos de potencial farmacéutico son las plantas medicinales, entre ellas *Aloe vera*, esta especie posee un amplio espectro de propiedades terapéuticas contra diversos patógenos y se caracteriza fitoquímicamente por la presencia de abundantes antraquinonas algunas de las cuales han demostrado tener actividad antiviral, no obstante, son escasos los reportes de la evaluación de quinonas contra el virus de la

influenza. En estudios *in vitro* previos, se evidenció el potencial bioactivo de quinonas contra el virus de la Influenza A, particularmente se observó que la modificación estructural de compuestos antraquinónicos poco activos pueden incrementar su actividad y disminuir su citotoxicidad, por ello, para comprender mejor la relación entre la estructura química y la actividad biológica de este tipo de compuestos, en este trabajo se realizó la derivatización química de Aloesaponarina I y II aisladas de *A. vera* y se evaluó contra el virus de la Influenza A(H1N1)pdm09.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de los grupos O-glucosilo, carboxilo, metilo e hidroxilo de los compuestos aloesaponarina I y aloesaponarina II en la actividad antiviral contra el virus de la influenza A (H1N1)pdm09 a nivel post-tratamiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y purificar aloesaponarina I y II a partir del extracto de acetato de etilo de *A. vera*.
- Realizar la derivatización química que incluye la O-glucosilación de aloesaponarina I y II así como metilación e hidrólisis de aloesaponarina I.
- Purificar y elucidar los derivados químicos de aloesaponarina I y II por diversos métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos.
- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de aloesaponarina I y II así como sus derivados químicos contra células de riñón canino madin darby (MDCK).
- Evaluar la actividad antiviral *in vitro* de aloesaponarina I y II así como sus derivados químicos contra las cepas A/Yucatán/2370/09 y A/México/InDRE797/10 (H1N1) a partir del ensayo de reducción del efecto citopático a nivel post-tratamiento y ensayo de reducción de placa.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

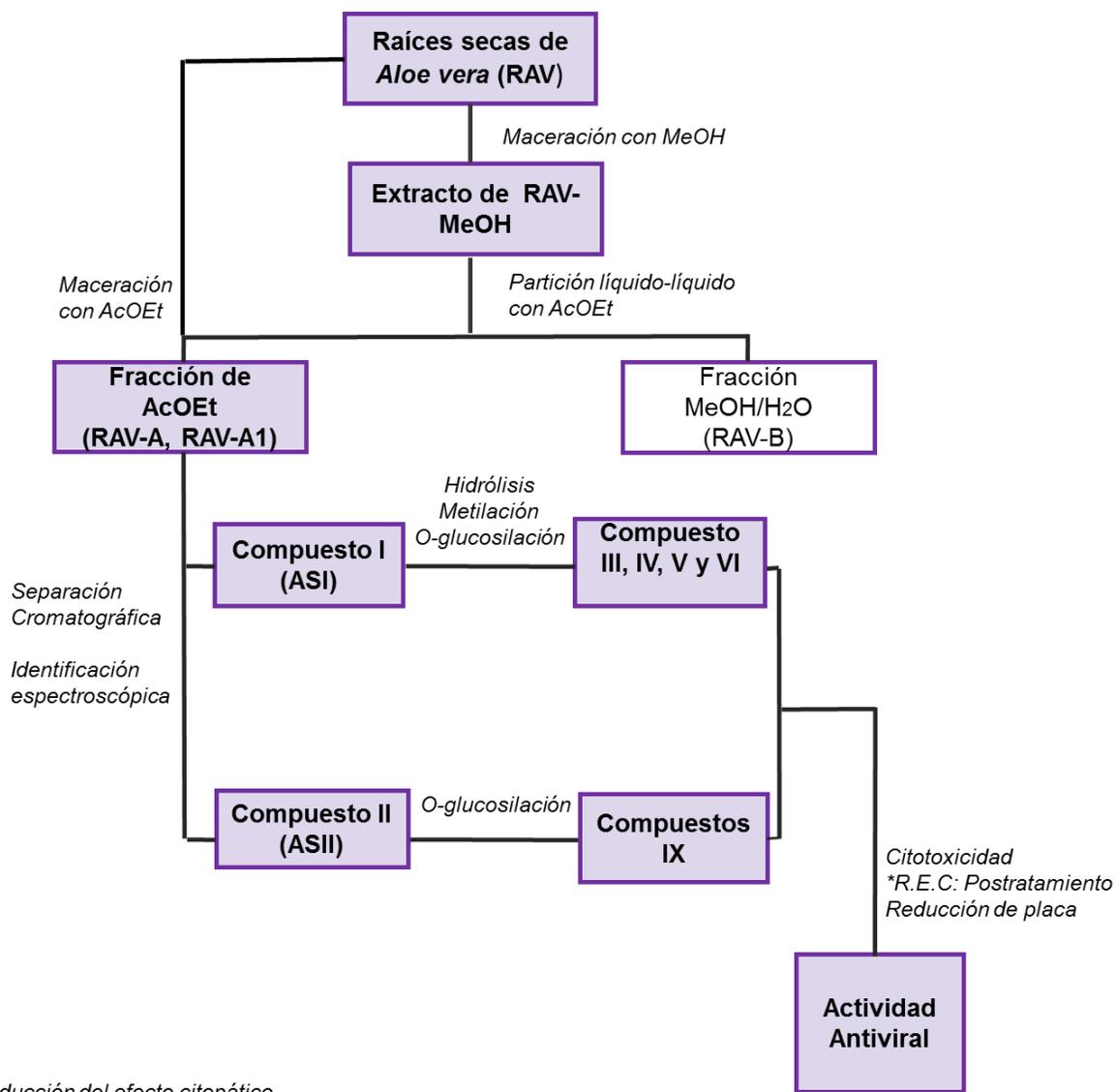


Figura 14. Diagrama de la estrategia experimental.

CAPÍTULO II

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS I Y II PRESENTES EN LAS RAICES DE *Aloe Vera* Y SUS DERIVADOS SEMISINTÉTICOS.

2.1 INTRODUCCIÓN

Las antraquinonas constituyen una clase importante de compuestos naturales y sintéticos derivados de un núcleo estructural 9,10-dioxoantraceno (Chien *et al.*, 2015). Se pueden encontrar como metabolitos secundarios de plantas, hongos y algunos insectos biosintetizados por la vía de los policetidos o shikimato (Geesler *et al.*, 2013). Muestran amplio espectro de bioactividad como laxantes, antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anticancerosos, anti-osteoporóticos, citotóxicos, antioxidantes, inmunomoduladores, diuréticos, insecticidas y fungicidas. Sin embargo, a altas concentraciones algunas antraquinonas pueden conducir a efectos tóxicos mutagénicos y carcinogénicos. En la industria textil, son ampliamente utilizados como colorantes naturales para fibras naturales y sintéticas, mientras que en la microelectrónica tienen aplicaciones como semiconductores (Hussain *et al.*, 2015).

Por otra parte, la modificación química de moléculas activas, permite comprender la relación estructura-actividad así como los grupos funcionales implicados en la actividad detectada, es decir, el farmacóforo de dicha estructura. Otras ventajas de la modificación química es la disminución de toxicidad con el consecuente aumento de especificidad al blanco terapéutico. La NA viral es una diana molecular y su sitio activo está conformado por 8 residuos aminoacídicos altamente conservados en los virus de la Influenza A y B, los cuales potencialmente pueden interaccionar a través de enlaces de hidrógeno, covalentes, hidrofóbicos o iónicos con grupos ácidos carboxílicos, acetilamino, hidroxilo y particularmente dobles enlaces de moléculas mímicas al ácido siálico (Itztein, 2012).

En el presente capítulo se describe las reacciones de metilación e hidrólisis del compuesto I y O-glicosilación de los compuestos I y II, así como su identificación por RMN-¹H. Los compuestos novedosos se analizaron adicionalmente por RMN-¹³C y RMN-2D: HSQC y HMBC.

2. 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES

Para la molienda y secado del material vegetal se utilizó un molino con un tamaño de malla de 5 mm de diámetro y una cámara de secado con focos de 40 watts manteniendo una temperatura de 60°C.

Los disolventes utilizados en laboratorio fueron de grado industrial los cuales se destilaron en laboratorio y grado reactivo analítico. Para el proceso de secado del extracto crudo y de las fracciones así como la recuperación de los disolventes se utilizó un evaporador rotatorio marca Buchi RE111 equipado con un baño de agua a 35 °C.

Para el análisis cualitativo por cromatografía de capa delgada (CCD) se utilizó placas cromatografías con soporte de aluminio impregnadas con gel de sílice 60 F₂₅₄, de 0.20 mm de grosor (Merck). Los componentes separados por CCD se visualizaron bajo UV de onda corta (254nm) y onda larga (360nm); y por detección química utilizando una solución al 4 % de ácido fosfomolibdico con trazas de sulfato cérico en H₂SO₄ al 5 % y el reactivo de Börntrager (Solución de NaOH al 5% en Etanol). En la separación por cromatografía en columna líquida al vacío (VLC) se utilizó gel sílice 60 Å con un tamaño de partícula de 2-25 µm de grosor (Sigma-Aldrich).

En la separación por cromatografía en columna “Flash” de mediana presión se utilizó gel sílice 60 Å de 0.040-0.063 mm (Merck), la elución se llevó a cabo aplicando presión en la cabeza de la columna. Para la cromatografía en columna de exclusión molecular se empleó Sephadex LH-20 (Pharmacia, Fine chemicals) con un tamaño de partícula 25-100 µm. Adicionalmente, se utilizó sílice C18 en la cromatografía de fase reversa.

En las reacciones de derivatización química del compuesto I se utilizaron los siguientes reactivos:

La hidrólisis se realizó utilizando pellets de hidróxido de sodio (NaOH, Sigma-Aldrich). La metilación se llevó a cabo utilizando sulfato de dimetilo (C₂H₆O₄S, Sigma-Aldrich), carbonato de potasio (K₂CO₃, Fermont) y acetona grado HPLC. Para llevar a cabo la reacción de O-glucosilación se utilizó bromuro de tetrabutilamonio (C₁₆H₃₆BrN, Sigma-

Aldrich), diclorometano anhidro (CH_2Cl_2 , Sigma-Aldrich), bromuro de tetra-*o*-acetilglucosa ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{BrO}_9$, Sigma-Aldrich) e hidróxido de sodio (NaOH, Sigma-Aldrich).

En la identificación y caracterización estructural de las moléculas purificadas se utilizó espectroscopía de RMN-1D y 2D empleando un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz) y Varian (600 MHz); los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en partes por millón (ppm).

2.2.2 EXTRACTO CRUDO METANÓLICO Y MATERIAL VEGETAL

El extracto crudo metanólico de *A. vera* (RAV-MeOH) fue proporcionado por el laboratorio de química orgánica del Centro de Investigación Científica de Yucatán de colectas subsecuentes realizadas en la localidad de Maxcanú, Yucatán en el mes de mayo de 2010.

Adicionalmente se colectó material vegetal de raíces de *A. vera* en el municipio de Halachó, Yucatán en el mes de mayo de 2015. El material vegetal fue depositado en una cámara de secado a una temperatura de 60 °C durante 72 h. Posteriormente se realizó la molienda con un tamaño de malla de 5 mm de diámetro, obteniendo 1.36 kg de raíz de *A. vera*.

2.2.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS

El extracto de acetato de etilo de raíz de *A. vera* se obtuvo utilizando dos metodologías:

40.6 g de extracto metanólico de raíz de *A. vera* (RAV-MeOH) se re-suspendió en una mezcla de MeOH/H₂O (7:3) y se fraccionó por partición líquido-líquido con acetato de etilo (AcOEt) hasta el agotamiento (4 x 300 mL), la fracción orgánica y acuosa fueron concentrados a 40 °C bajo presión reducida para eliminar el disolvente, se obtuvo 17.34 g de la fracción de acetato de etilo (RAV-A) y 23.26 g de la fracción acuosa (RAV-B). En la figura 15 se presenta el esquema de fraccionamiento de RAV-MeOH.

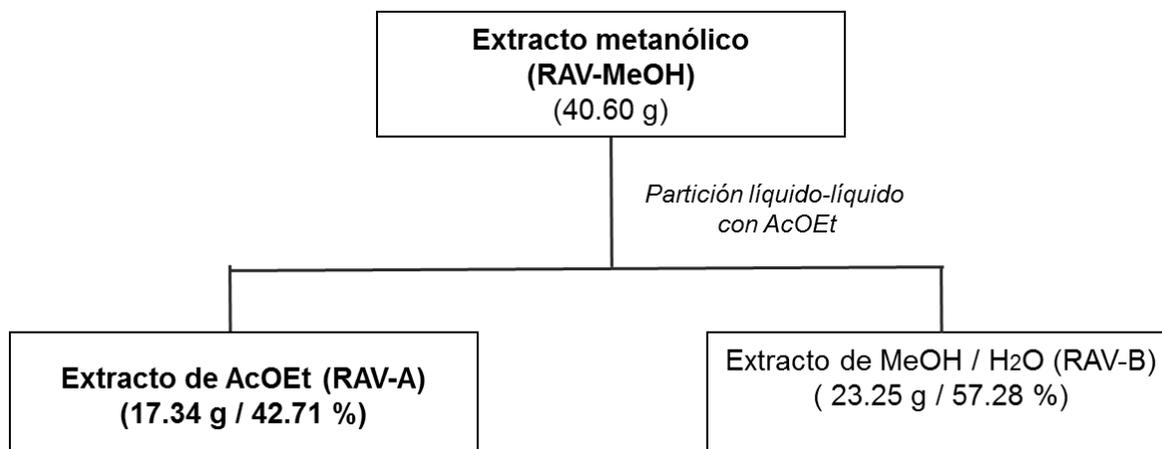


Figura 15. Método I de obtención del extracto de acetato de etilo (RAV-A)

Por otra parte, se realizó la maceración de 1 kg de raíz seca y molida de *A. vera* con AcOEt hasta el agotamiento (5 x 4 L). El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio a presión reducida y se obtuvo 38.8 g de extracto de acetato de etilo (RAV-A1). Figura 16.

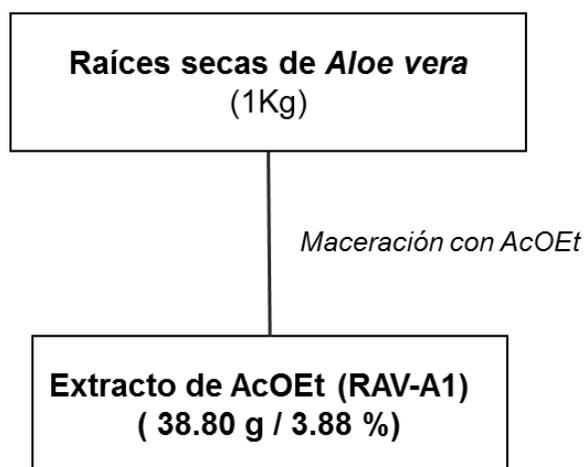


Figura 16. Método II de obtención del extracto de acetato de etilo (RAV-A1)

2.2.4. OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTRAQUINÓNICOS

2.2.4.1 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO I

17.34 g de extracto de acetato de etilo (RAV-A) se fraccionó por cromatografía líquida al vacío (VLC) utilizando un percolador de 10 cm de diámetro y 8 cm de altura eluida en el sistema de disolvente Hx-AcOEt a gradiente y de polaridad ascendente. Se recolectaron 15 fracciones de 200 mL aproximadamente cada una (RAV-B1-RAV-B15). La subfracción RAV-B8 (350 mg) se fraccionó por columna "Flash" con un diámetro de 2 cm y una altura de 32 cm empleando el sistema de disolvente Hx-AcOEt a gradiente, se recolectaron 177 fracciones de 3 mL cada una, que se reunieron en 5 subfracciones (RAV-D1-RAV-D5). La subfracción RAV-D2 (302.3 mg) se purificó por columna "Flash" con un diámetro de 2.5 cm y una altura 32 cm empleando el sistema de disolvente Hx-AcOEt a gradiente de polaridad ascendente, obteniéndose 6 subfracciones (RAV-AE1-RAV-E6). En la subfracción RAV-AE3 (167.4 mg) se purificó el compuesto I con un rendimiento de 0.96 % (Figura 17).

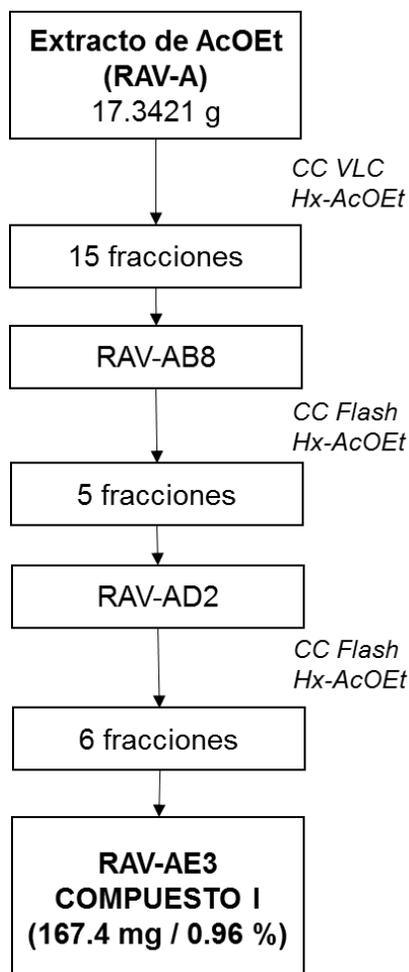


Figura 17. Diagrama de aislamiento del compuesto I a partir de RAV-A

Por otra parte, 38.8 g de extracto de acetato de etilo (RAV-A1) se fraccionó por VLC utilizando un percolador de 8 cm de diámetro y 7 cm de altura, se utilizó como fase móvil el sistema de disolvente Hx-AcOEt a gradiente de polaridad ascendente (70:30, 60:40, 50:50, 100 %) y MeOH al 100%. Se obtuvieron 5 fracciones de 500 mL aproximadamente cada una (RAV-A2B1-RAV-A2B5). Por cromatografía en capa fina y comparación con un estándar se observó que la fracción RAV-A2B2 estaba enriquecida con el compuesto I. La subfracción RAV-A2B2 (2.80 g) se fraccionó por columna “Flash” con un diámetro de 4 cm y una altura de 30 cm empleando el sistema de disolvente Hx-AcOEt a gradiente (80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 100 %) y MeOH al 100%, se recolectaron 40 fracciones de 20 mL aproximadamente cada una, que se reunieron en 4 subfracciones (RAV-A2C1-A2C4). La subfracción RAV- AC4 (681 mg) se fraccionó por columna “Flash” con un diámetro de 3 cm

y una altura 30 cm empleando el sistema de disolvente Hx-AcOEt a gradiente, se obtuvo 60 fracciones que se recolectaron por similitud química en 5 fracciones (RAV-A2D1-A2D5).

La subfracción RAV-A2D (350 mg) se fraccionó por columna “Flash” con un diámetro de 2.5 cm y una altura de 30 cm empleando el sistema de disolvente Hx-AcOEt a gradiente de polaridad ascendente, se obtuvieron 36 fracciones que se recolectaron en 4 subfracciones (RAV-A2E1-A2E4). En la subfracción RAV-A2E2 (52.7 mg) se purificó el compuesto I. Posteriormente la fracción RAV-A2E1 (250 mg) fue fraccionada por cromatografía en columna “Flash” con un diámetro de 2 cm y una altura de 30 cm utilizando el sistema de disolvente Hx-AcOEt a gradiente de polaridad ascendente, obteniendo 19 fracciones que se recolectaron en 4 subfracciones (RAV-A2F1-A2F4), en la subfracción RAV-A2F3 se purificó el compuesto I con un peso de 70 mg (Figura 18).

En total se logró purificar 122.7 mg del compuesto I con un rendimiento de 0.32 %.

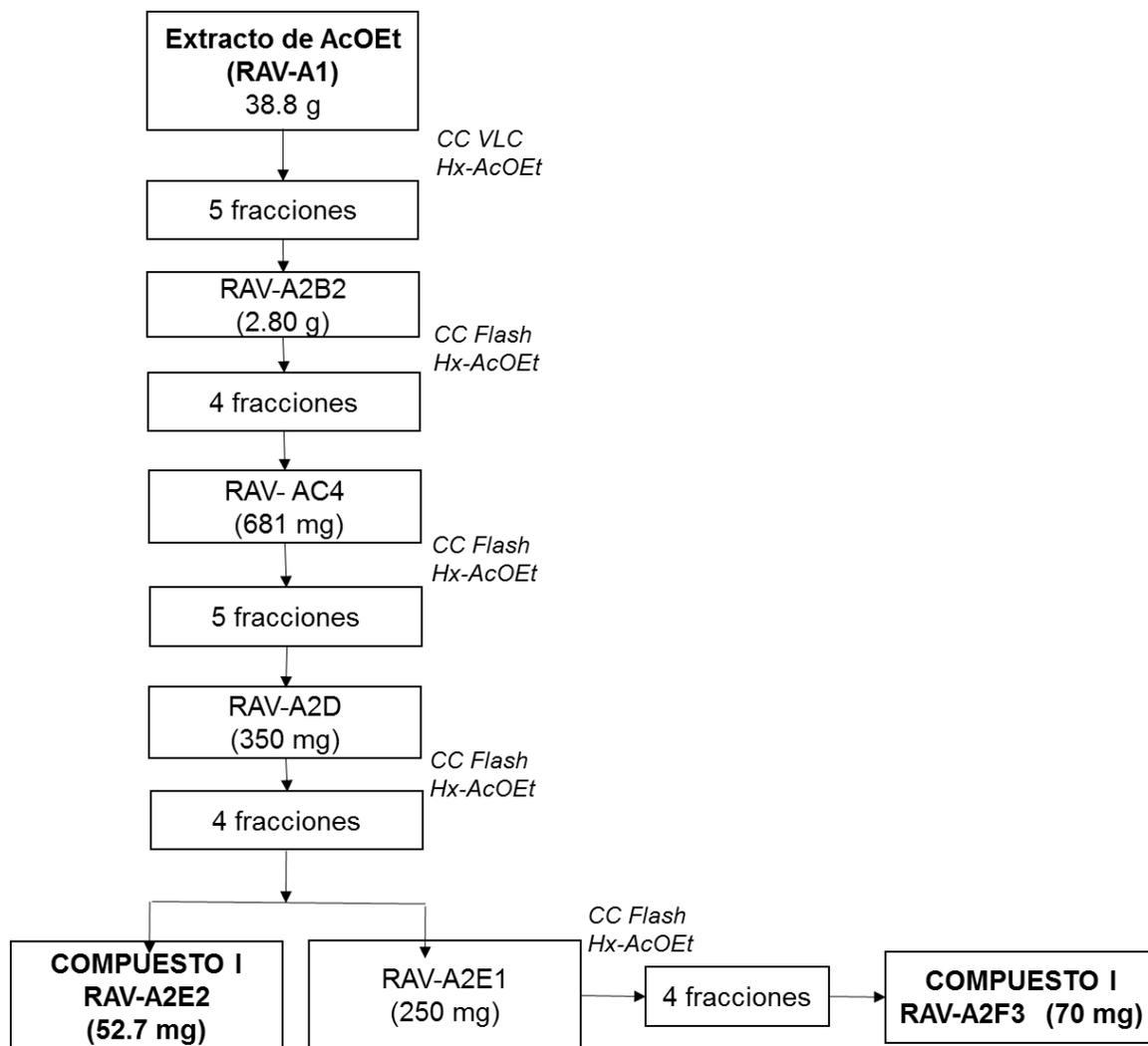


Figura 18. Diagrama de aislamiento del compuesto I a partir de RAV-A1

2.2.4.2 PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO II

33.5 mg de una muestra enriquecida del compuesto II se fraccionó mediante cromatografía “Flash” en una columna de 1 cm de diámetro y 33 cm de altura, utilizando sílice gel como fase estacionaria y el sistema de disolvente Hx-An a gradiente de polaridad ascendente (100% Hx, 95:5, 90:10, 80:20 y 70:30). Se obtuvieron 66 fracciones que se reunieron en 3 subfracciones (SRa-SRc). En la fracción SRb se obtuvo el compuesto II (30.4 mg, 90.7 %) como un precipitado naranja intenso (Figura 19).

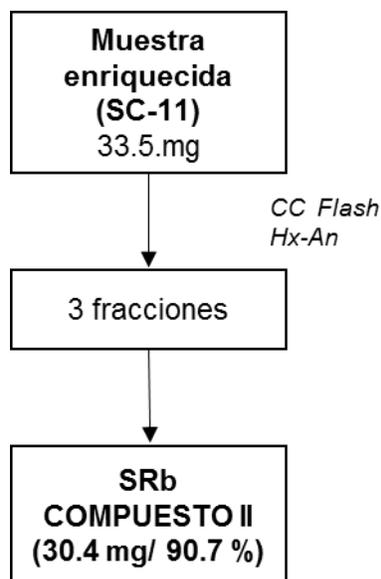


Figura 19. Diagrama de aislamiento del compuesto II.

2.2.5 DERIVATIZACIÓN QUÍMICA DEL COMPUESTO I Y COMPUESTO II.

A partir de los compuestos I y II se obtuvieron los derivados hidrolizados, metilados, y O-glucosidos que se presentan en la figura 20. Los compuestos III-VIII se derivaron del compuesto I, mientras que el compuesto IX se derivó del compuesto II. Cabe resaltar que los compuestos VII y VIII se proporcionaron por el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán. El procedimiento de las reacciones se detalla en las secciones posteriores. Los derivados químicos fueron purificados y elucidados por técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

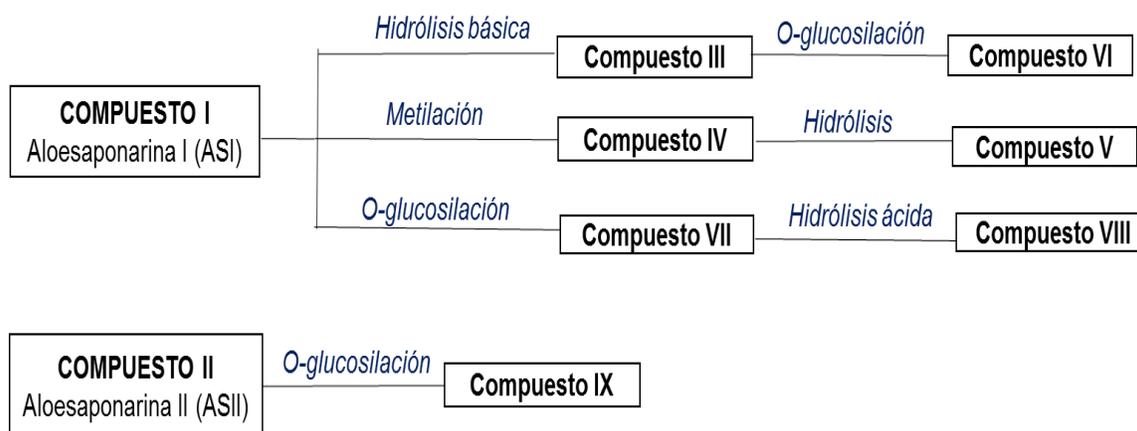


Figura 20. Esquema de reacciones de derivatización química de los compuestos I y II.

2.2.5.1 HIDRÓLISIS DEL COMPUESTO I

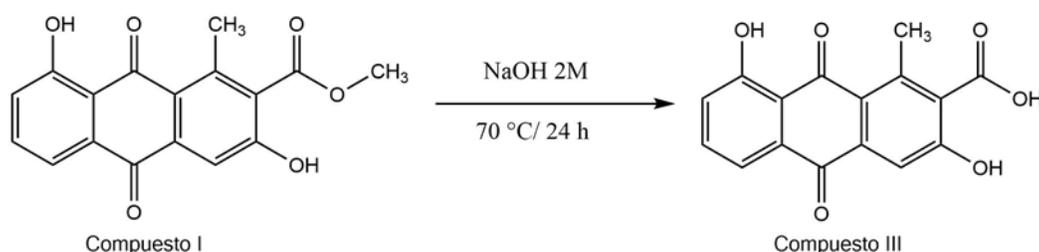


Figura 21. Reacción general de obtención del compuesto III.

En un matraz balón de 25 mL se adicionó 50 mg del compuesto I y se agregó 2 mL de la solución de NaOH 2M poniendo el sistema a agitación constante y a reflujo (70 °C) por 24 h, al término de este tiempo se agregó 10 mL de agua destilada y 5 mL de una solución de HCl 2 M acidificando el medio acuoso (Figura 21). El producto se extrajo con diclorometano (CH₂Cl₂) (3 X 50mL) y con AcOEt (1x 50 mL) hasta observarse el agotamiento del color amarillo en la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida en un rotaevaporador. El producto de reacción (47.4 mg) fue purificado por cromatografía de exclusión molecular utilizando sephadex LH40 como fase estacionaria y MeOH al 100 % como eluyente, en una columna de 3 cm de diámetro y 59 cm de altura. Se obtuvieron 62 fracciones que se recolectaron en 5 subfracciones (RAV-

RX1B-RAV-RX1B5). En la fracción RAV-RX1B4 se purificó un producto en forma de polvo rojo denominado compuesto III con un peso de 37.7 mg y un rendimiento del 79.2 %.

2.2.5.2 REACCIÓN DE METILACIÓN DEL COMPUESTO I

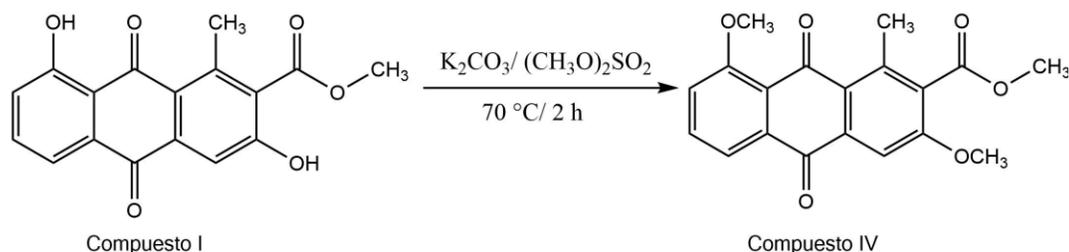


Fig. 22. Reacción general de obtención del compuesto IV

En un matraz balón de 25 mL se adicionó 52.7 mg del compuesto I y se disolvió en 20 mL de acetona (An), posteriormente se adicionó 400 mg de carbonato de potasio (K_2SO_4) y se dejó en agitación constante por 10 minutos hasta observarse la completa disolución de la muestra, después se adicionó 2 mL de sulfato de dimetilo ($C_2H_6O_4S$) y el sistema se dejó a agitación constante y a reflujo a una temperatura de $70\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h (Figura 22), al término de este tiempo el producto crudo de metilación fue extraído con CH_2Cl_2 (4 x 50 mL), la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y el disolvente se evaporó a presión reducida en un rotaevaporador. El producto de reacción (139.6 mg) se purificó por cromatografía en columna "Flash" de 1 cm de diámetro y 30 cm de altura, se utilizó el sistema de disolventes Hx-AcOEt a gradiente de polaridad ascendente (100%, 90:10, 70:30, 50:50) y MeOH al 100 %. Se obtuvieron 12 fracciones que se recolectaron en 3 subfracciones (RAV-RX2A-RAV-RX2C). En la fracción RAV-RX2A (21.3 mg) se obtuvo el producto de metilación en forma de cristales amarillos denominado compuesto IV con un peso de 25.6 mg y un rendimiento del 48.14 %. En un estudio previo se obtuvo un mayor rendimiento de reacción (79 %) en la metilación del compuesto I utilizando Yoduro de metilo (CH_3I) como agente alquilante (Collí, 2014).

2.2.5.3 REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DEL COMPUESTO IV

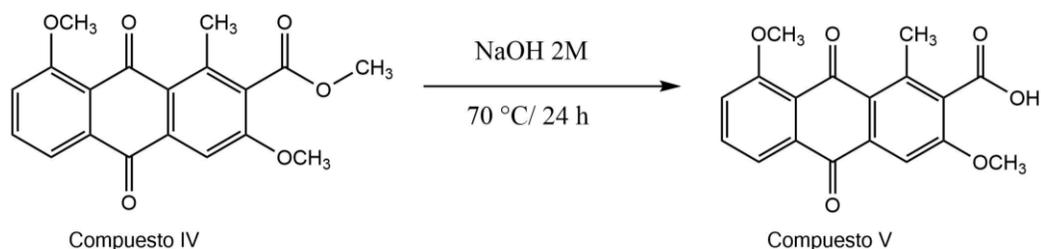


Fig. 23. Reacción general de obtención del compuesto V

En un matraz balón de 50 mL se adicionó 98.4 mg de cristales del compuesto IV en 20 mL de Etanol (C₂H₅OH), posteriormente se adicionó 10.5 mL de NaOH 2M y el sistema se puso en agitación constante a 70 °C durante 24 h (Figura 23). Posteriormente, el pH básico del medio se ajustó con 15 mL de una solución acuosa de HCl 1M y se adicionó 40 mL de agua destilada, el producto de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x40 mL) y con AcOEt (1x 40 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y concentró a presión reducida en un rotaevaporador. El producto crudo de reacción (80 mg) se purificó mediante una columna VLC de 2.7 cm de diámetro y 5.5 cm de altura utilizando como fase estacionaria sílice de fase reversa C18 y como sistema móvil MeOH:H₂O a gradiente de polaridad descendente (2:3, 3:2). Se obtuvieron 50 fracciones que se reunieron en 3 subfracciones (de RX5-1 a RX5-3). La fracción RX5-2 (50 mg) enriquecida con el producto de reacción se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando Sephadex LH-40 activada con MeOH al 100% en una columna de 1 cm de diámetro y 40 cm de altura. Se recolectaron 50 fracciones que se reunieron en 3 subfracciones (de RX5b-1 a RX5b-3), en la fracción RX5b-2 se purificó 7 mg de un producto precipitado de coloración amarillo denominado compuesto V, con un rendimiento de reacción de 7.42 %.

2.2.5.4 REACCIÓN DE O-GLUCOSILACIÓN DEL COMPUESTO III

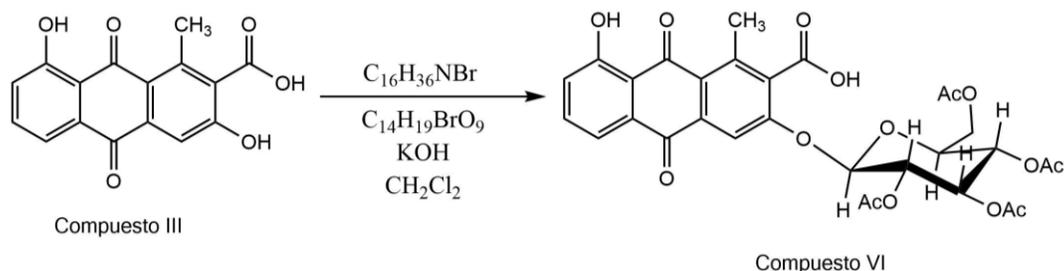


Fig. 24. Reacción general de obtención del compuesto VI

En un sistema Schlenk se adicionó 32.6 mg del compuesto III, el sistema se puso a presión de vacío por 15 minutos, posteriormente se adicionó 6.48 mg de bromuro de tetrametilamonio ($C_{16}H_{36}NBr$) y se puso a vacío por 15 minutos, al término de este tiempo, se adicionó 3 mL de CH_2Cl_2 anhidro, 0.2 mL de una solución acuosa de NaOH al 5 % y 2.8 mL de agua destilado para tener una relación 1:1 de disolvente orgánico: agua. El sistema se puso a vacío por 15 minutos y al término de este tiempo en un ambiente de nitrógeno se adicionó 39 mg de bromuro de tetra-*o*-acetilglucosa ($C_{14}H_{19}BrO_9$) disuelta en 2 mL de CH_2Cl_2 anhidro. Finalmente se adicionó 2 mL de agua destilada para tener una relación 1:1 de $CH_2Cl_2:H_2O$. El sistema se selló para mantener el ambiente de nitrógeno y se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 42 h. (Figura 24). Para recuperar el producto de reacción se adicionó 2 mL de HCl 1 M y 12 mL de agua destilada obteniendo una mezcla ligeramente ácida, el producto se extrajo con CH_2Cl_2 (5 X 50 mL) hasta observarse agotamiento del color amarillo de la fase acuosa. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se filtró y concentró a presión reducida en un rotaevaporador. El producto crudo (87.2 mg) se purificó por cromatografía líquida al vacío VLC en una columna con diámetro de 2.7 cm y una altura de 4.5 cm, utilizando como fase estacionaria sílice en fase reversa C-18 y un sistema de elución isocrático ACN: H_2O (3:2). Se obtuvieron 120 fracciones de aproximadamente 4 mL cada una, que se reunieron en 5 subfracciones (RAV-RX4A-RAV-RX4E), en la fracción RAV-RX4B se purificó 10.2 mg del producto de O-glucosilación denominado compuesto VI en forma de cristales de color amarillo, con un rendimiento de reacción de 14.84 %.

2.2.5.5 REACCIÓN DE O-GLUCOSILACIÓN DEL COMPUESTO II

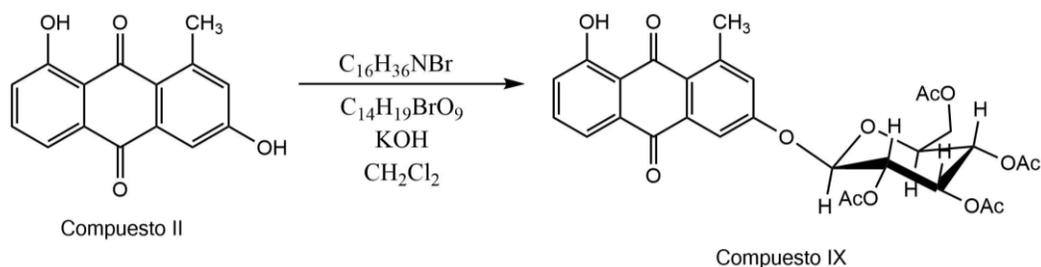


Fig. 25. Reacción general de obtención del compuesto IX.

En un recipiente Schlenk se adicionó 25.6 mg del compuesto II, el sistema se puso a agitación constante y a presión de vacío durante 15 minutos, posteriormente se adicionó 6.5 mg de bromuro de tetrametilamonio ($C_{16}H_{36}BrN$) y se aplicó vacío por 15 minutos, al término de este tiempo se agregó 3 mL de CH_2Cl_2 anhidro, 0.2 mL de una solución acuosa de NaOH al 5 % y 2.8 mL de agua destilada, manteniendo la proporción 1:1 de fase orgánica y fase acuosa. En atmósfera de nitrógeno se adicionó 41.5 mg de Acetobromo α -D-glucosa previamente disuelto en 2 mL de CH_2Cl_2 , finalmente se agregó 2 mL de agua destilada para mantener la proporción 1:1 entre el CH_2Cl_2 y el H_2O . El sistema se selló para mantener el ambiente de nitrógeno y se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 42 h. (Figura 25). Al término de ese tiempo, se ajustó el pH de la muestra con una solución acuosa de HCl 2M (5mL), ocurrió un cambio en la coloración de rojo oscuro a amarillo canario. Se adicionó 40 mL de agua destilada a la mezcla de reacción y se extrajo con CH_2Cl_2 (40 mL x 3). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , filtró y evaporó a presión reducida. Se obtuvieron 32 mg de producto crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna "Flash" utilizando como sistema de elución isocrático Hx:AcOEt (8:2), se obtuvieron tres fracciones (RX6a-RX6c), en la fracción RX6b se obtuvieron 27 mg del compuesto IX en forma de cristales amarillos con un rendimiento del 49.9 %.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 RENDIMIENTOS DE EXTRACTOS ORGÁNICOS Y DEL COMPUESTO I

El extracto de AcOEt RAV-A (17.34 g) tuvo un rendimiento de extracción de 42.71 %, a partir del cual se obtuvo 167.4 mg del compuesto I con un rendimiento de extracción de 0.96 %. Adicionalmente, se obtuvo 38.8 g de extracto RAV-A1 con un rendimiento de extracción del 3.88 %, a partir del cual se purificó 122.7 mg del compuesto I con un rendimiento de 0.32 %. Esta diferencia en rendimientos puede deberse a que la recolección del material vegetal se llevó a cabo en la misma temporada seca, pero en diferente municipio y en diferente año. Los metabolitos secundarios se ven regulados por diferentes factores bióticos en presencia de otros organismos vegetales, animales, microorganismos como bacterias, hongos, virus por mencionar algunos y por factores abióticos como estrés ocasionado por climas extremos, inundaciones, sequías, cambio de pH, luz solar entre otras variables difíciles de controlar. Por lo que estas variaciones pueden ocasionar un aumento en la concentración de otros metabolitos haciendo más compleja la matriz vegetal y por consiguiente dificultando la purificación del compuesto I o disminuyendo directamente la concentración de este metabolito en la planta (Gouvea *et al*, 2012).

2.3.2 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO I (ALoesAPONARINA I)

Un total de 290.1 mg del compuesto I se aisló como cristales color naranja solubles en cloroformo (CHCl₃). En cromatografía en capa delgada (CCD) se observó a un R_f de 0.55 utilizando el sistema de disolventes Hx-AcOEt (1:1) como eluyente. Presentó una coloración naranja con el revelador específico de Börntrager para quinonas y se observó fluorescencia naranja a 365 nm.

En el espectro RMN-¹H del compuesto I en CDCl₃ (Figura 26), se observan dos señales simples a campo alto, el primero con un desplazamiento químico (δ) de 2.96 que indica la presencia de un grupo metilo en posición C1, el segundo a δ 4.06 corresponde al grupo metoxilo de un éster. En la región de los protones aromáticos (7-8 ppm) se presentan las señales de dos protones en acoplamiento *orto* y *meta*, cada señal aparece como un doble de dobletes a δ 7.30 (J_{orto} = 8.3 Hz, J_{meta} = 1.0 Hz) y a δ 7.76 (J_{orto} = 7.4 Hz, J_{meta} = 1.1 Hz) que corresponden a los protones H7 y H5 respectivamente. En esta misma región se observó un triplete a δ 7.62 que corresponde al protón H6 en acoplamiento *orto* (J_{orto} = 7.9 Hz) con

H7 y H5, y una señal simple a δ 7.78 correspondiente al protón H4. Por último a campo bajo se observan dos señales simples, a δ 10.42 que pertenece al grupo hidroxilo en la posición C3 y a δ 12.93 que corresponde al grupo hidroxilo en la posición C8 el cual forma un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo C9. Las señales observadas muestran similitud con los datos reportados para el compuesto aloesaponarina I (Collí, 2014) (Cuadro 4). De esta forma se confirmó la obtención de la antraquinona 9,10-dioxo-9,10-dihidro-2-antracencarboxilato de metilo con fórmula molecular de $C_{17}H_{12}O_6$ y un peso molecular de 312 g/mol. Este metabolito se aisló por primera vez de las raíces de *A. saponaria* Haw (Yagi, A, *et al.* 1974). Aloesaponarina I puede hallarse en otras especies de Aloe como *A. maculata*, *A. hijazensis*, *A. dawei*. y *A. secundiflora*. Se ha aislado de otras especies vegetales como *Emex spinosus*, *Scutia myrtina* y *Rubiaceae sp.* También se ha aislado de bacterias marinas del género *Actinomyces sp.* Ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* (Van-Wyk *et al* 1995; Usama *et al*, 2006; Hou *et al*, 2009; Shan *et al*, 2001; Cui *et al*, 2006; Induli *et al*, 2012).

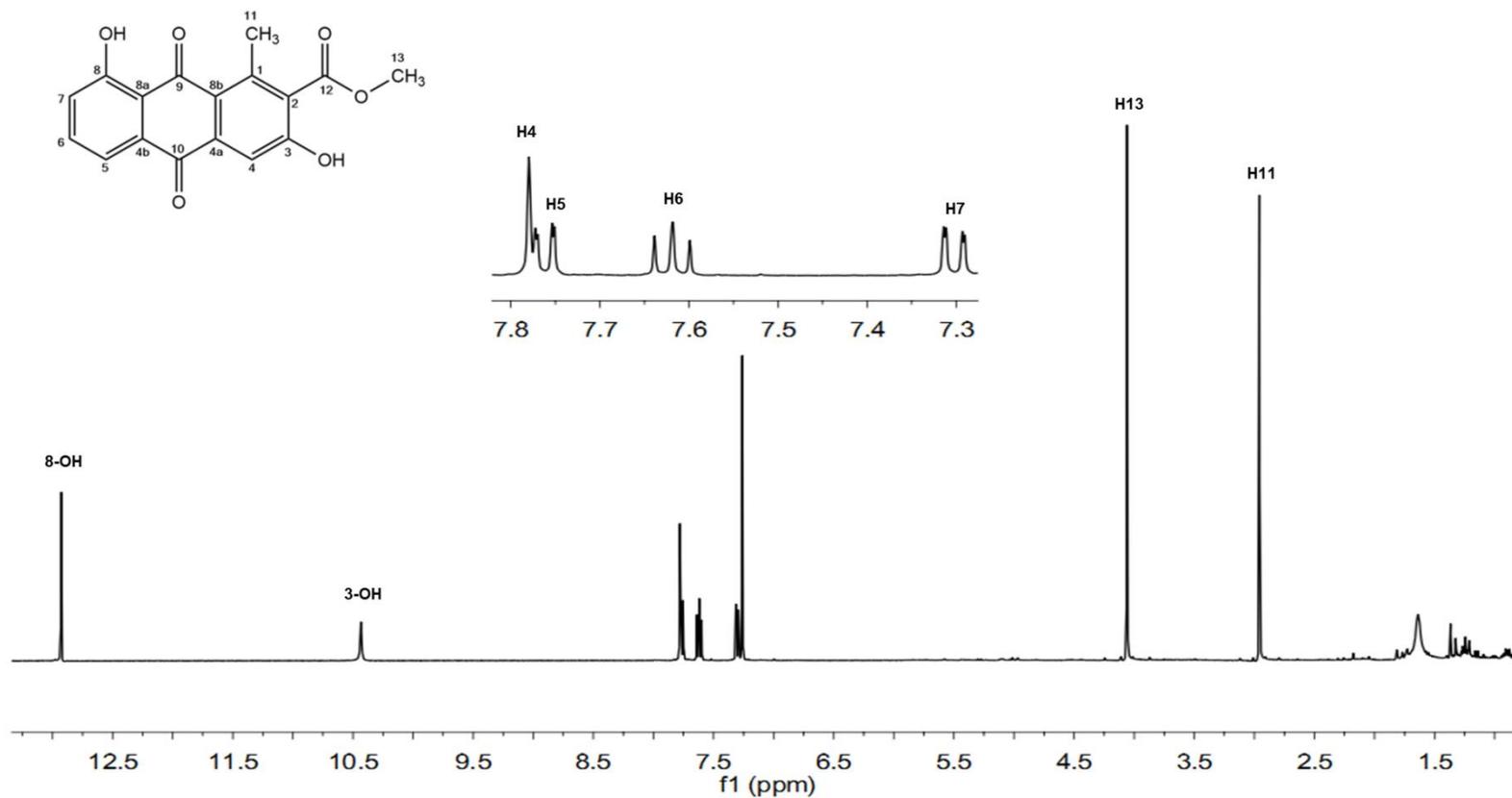


Figura 26. Estructura y espectro de RMN- ^1H del compuesto I obtenido a 400 MHz en CDCl_3 .

Cuadro 4. Datos espectroscópicos de RMN-¹H del compuesto I en comparación con la literatura (Collí, 2014).

Posición	Compuesto I RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ (m, J, I)	Aloesaponarina I RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ (m, J, I)
3	10.43 (s, 1H, 3-OH)	10.42 (s, 1H, 3-OH)
4	7.78 (s, 1H, H4)	7.78 (s, 1H, H4)
5	7.76 (dd, J=7.5, 1.2 Hz, 1H, H5)	7.76 (dd, J= 7.4, 1.1 Hz, 1H, H5)
6	7.62 (t, J=8.2 Hz, 1H, H6)	7.62 (t, J= 7.9 Hz, 1H, H6)
7	7.30 (dd, J=8.3, 1.2 Hz, 1H, H7)	7.30 (dd, J= 8.3, 1.0 Hz, 1H, H7)
8	12.93 (s, 1H, 8-OH)	12.92 (s, 1H, 8-OH)
11	2.96 (s, 3H, H11)	2.96 (s, 3H, H11)
13	4.06 (s, 3H, H13)	4.06 (s, 3H, H13)

2.3.3 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO II (ALOESAPONARINA II)

Se purificaron 30 mg del compuesto II a partir de fracciones enriquecidas. El compuesto II se purificó como cristales naranja solubles en acetona. En cromatografía de capa delgada se observó a un R_f = 0.23 utilizando la fase móvil Hx:An (8:2), en el revelador Börntrager se observó como una banda naranja intenso y presentó fluorescencia naranja a 365 nm.

En el espectro de RMN-¹H del compuesto II en (CD₃)₂CO se observó a campo bajo una señal simple a δ 13.03 que integra para el protón del grupo –OH en posición C-8, el desplazamiento químico de esta señal se debe a que el protón se encuentra comprometido en un enlace hidrógeno con el grupo carbonilo en posición C9. Por otra parte en la sección aromática, entre 7-8 ppm se observaron 5 señales: un multiplete a δ 7.71 que integran para los protones H6 y H7, dos señales dobletes a δ 7.59 y 7.11 que integran para los protones H4 y H2 respectivamente y una señal doble de dobles a δ 7.29 asignado al protón H5 con

$J=6.8$ y 2.6 Hz que corresponden a un acoplamiento en *orto* y *meta* con posiblemente el protón H7 cuya señal se encuentra sobrepuesta con H6. Finalmente a δ 2.78 se observa una señal simple asignada al grupo metilo en posición C1 (Figura 27). Los datos espectroscópicos de RMN- ^1H son similares a los reportados en la literatura (Collí, 2014) (Cuadro 5) que corresponden al compuesto natural 3,8-dihidroxi-1-metil-9,10-antraquinona, también conocido como Aloesaponarina II (ASII). Este metabolito se aisló por primera vez de las raíces de *A. saponaria* Haw (Yagi, A, *et al.* 1974). Aloesaponarina II puede hallarse en las raíces de otras especies de Aloe como *A. rubroviolacea*, *A. ferox* Mill, *A. africana* Mill y en otras especies vegetales como *Asphodelus fistulosus*. También se ha aislado de bacterias del género *Actinomyces* sp, *Streptomyces* spp y del hongo endófito *Nigrospora* sp. Se determinó su actividad antimicrobiana contra *Xanthomonas oryzae*, un fitopatógeno del arroz (Van-Wyk *et al* 1995; El-Fattah *et al*, 1997; Culi *et al*, 2006; Bartel *et al*, 1990; Huang *et al*, 2016; Wang *et al*, 2014).

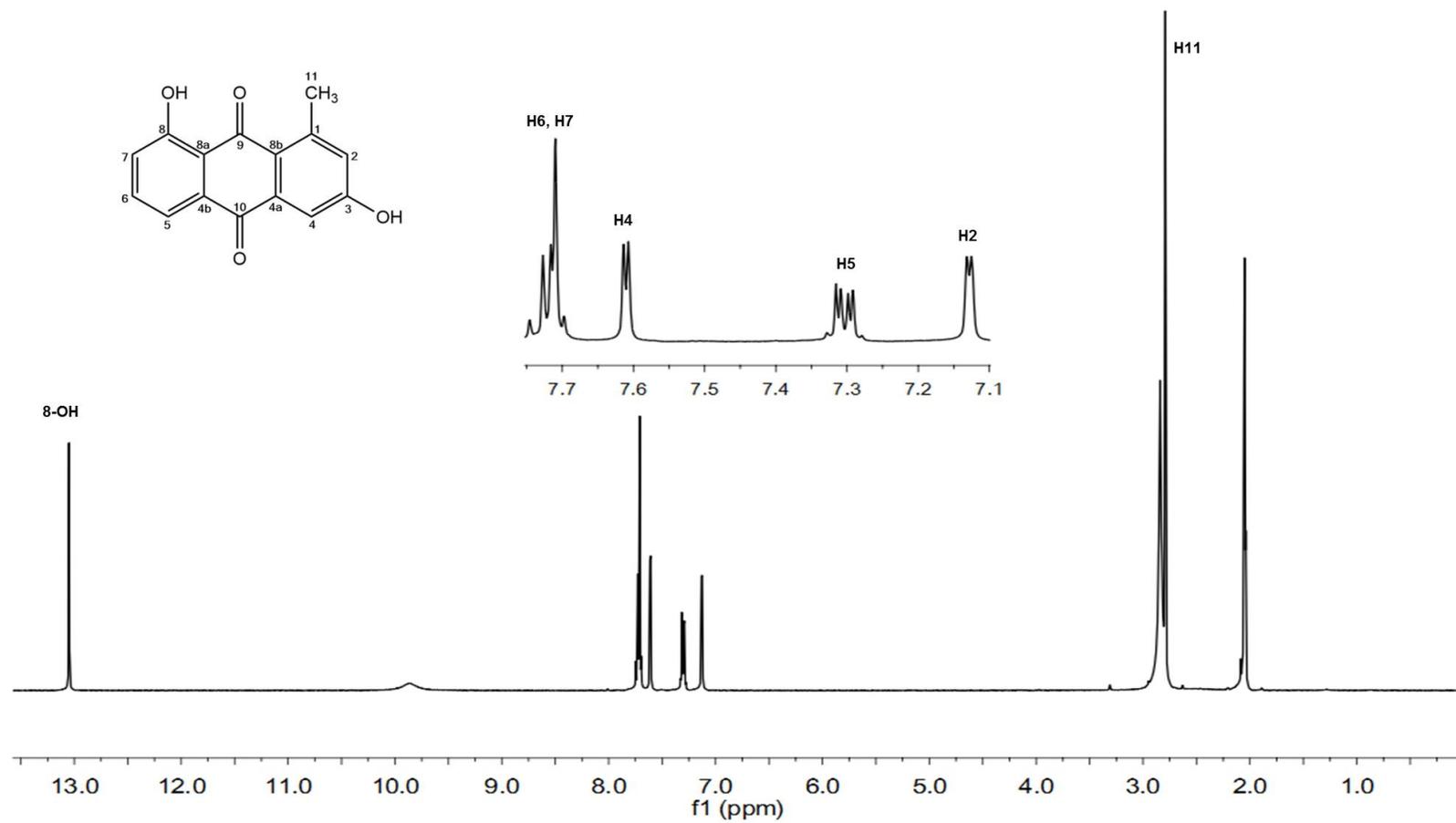


Figura 27. Estructura y espectro de RMN-¹H del compuesto II obtenido a 400 MHz en (CD₃)₂CO

Cuadro 5. Datos espectroscópicos de RMN-¹H del compuesto II en comparación con la literatura (Collí, 2014).

Posición	Compuesto II RMN- ¹ H (400 MHz, [CD ₃] ₂ CO) δ (m, J, I)	Aloesaponarina II RMN- ¹ H (400 MHz, [CD ₃] ₂ CO) δ (m, J, I)
2	7.11 (d, 1H, J= 2.6 Hz, H2)	6.99 (d, 1H, H2)
4	7.59 (d, 1H, J= 2.6 Hz, H4)	7.47 (d, 1H, J= 2.3 Hz, H4)
5	7.29 (dd, J= 6.8, 2.7 Hz, 1H, H5)	7.17 (dd, 1H, J= 7.6 Hz, 2.1 Hz, H5)
6	7.71 (m, 2H, H6 y H7)	7.59 (m, 2H, H6 y H7)
7	7.71 (m, 2H, H7 y H7)	7.59 (m, 2H, H6 y H7)
8	13.03 (s, 1H, 8-OH)	12.92 (s, 1H, 8-OH)
11	2.78 (s, 3H, H11)	2.66 (s, 3H, H11)

2.3.4 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO III

Se purificaron 37.7 mg del compuesto III en forma de polvo color rojo y se obtuvo un rendimiento de reacción de 79.2 %. En cromatografía en capa delgada de fase reversa (C18) se observó a un R_f de 0.83 utilizando el sistema de disolventes MeOH-H₂O (9:1) como eluyente, presentó una coloración roja utilizando el revelador específico de Börntrager para quinonas y se observó fluorescencia roja a 365 nm.

En el espectro de RMN-¹H del compuesto III en DMSO-d₆ (Figura 28), no se observó la señal simple a δ 4.06 asignada al grupo metoxilo del compuesto I lo cual indicó que la hidrólisis del grupo éster se llevó a cabo de manera satisfactoria. Se observaron señales análogas al compuesto I en la región de 7 a 8 ppm que corresponde a protones aromáticos, a δ 12.99 asignada al protón de grupo hidroxilo en C8 y a δ 2.89 que corresponde al metilo en posición C1. Los datos espectroscópicos obtenidos y la comparación con la literatura (Salim *et al*, 2014) (Cuadro 6) permitieron identificar al análogo hidrolizado del compuesto I como ácido-3-8-dihidroxi-1-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidro-2-antracencarboxílico, con fórmula y peso molecular de C₁₆H₁₀O₆ y 298.25 g/mol respectivamente. Este compuesto fue

aislado por primera vez de pigmentos de insectos, más tarde se aisló de bacterias del género *Streptomyces spp* como producto derivado de la biosíntesis de antibióticos tipo benzoisicromanquinonas como la actinorodina, doxorubicina y frenolicina B, también se ha aislado de bacterias del género *Actinokineospora sp* asociadas a esponjas marinas y de escasas especies vegetales como componente de raíces de *Rheum sp* utilizadas como purgante; y como pigmento y antioxidante natural del safrón (*Crocus sativus*). Es un producto de la ruta semisintética de la mumbastatina que es fármaco inhibidor de la enzima hepática glucosa 6-fosfato translocasa utilizado en el tratamiento de diabetes mellitus tipo II (Kim *et al.*, 2012; Abdelmoshen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Takeshi y Takashi, 1991; Lee *et al.*, 2007).

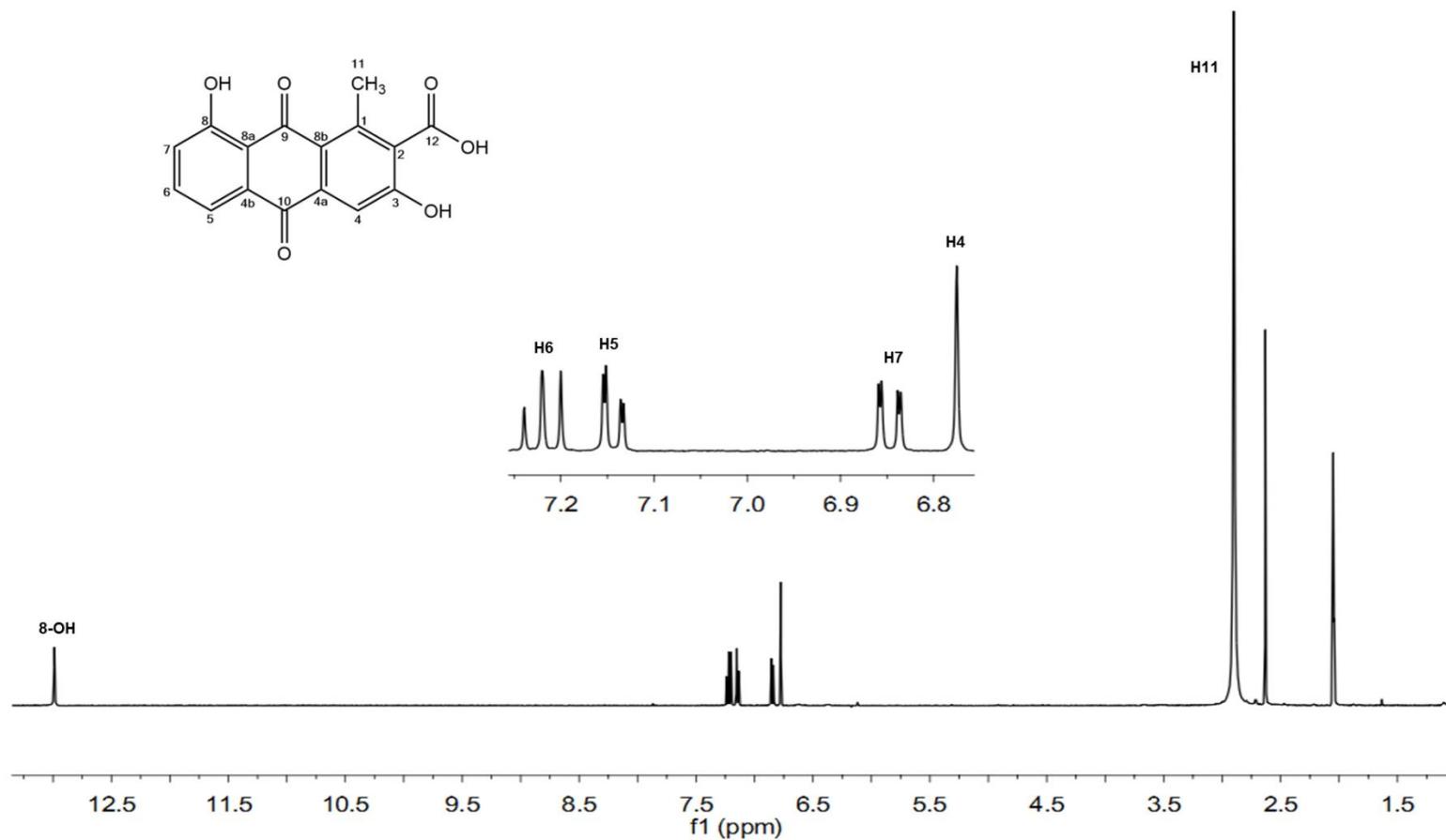


Figura 28. Estructura y espectro de RMN- ^1H del compuesto III obtenido a 400 MHz en DMSO- d_6

Cuadro 6. Datos espectroscópicos de RMN-¹H del compuesto III en comparación con la literatura (Salim *et al*, 2014)

Posición	Compuesto III RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (m, J, I)	Compuesto referencia RMN- ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) δ (m, J, I)
4	6.77 (s, 1H, H4)	7.60 (s, 1H, H4)
5	7.14 (dd, J=8.76, 1.28 Hz, 1H, H5)	7.66 (dd, J= 7.5, 1.1 Hz, 1H, H5)
6	7.22 (t, J= 7.68 Hz, 1H, H6)	7.76 (dd, J=8.3, 7.5 Hz, 1H, H6)
7	6.85 (dd, J=9.44, 1.24 Hz, 1H, H7)	7.36 (dd, J= 8.3, 1.1 Hz, 1H, H7)
8	12.99 (s, 1H, 8-OH)	12.89 (s, 1H, 8-OH)
11	2.89 (s, 3H, H11)	2.71 (s, 3H, H11)

2.3.5 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO IV

Se purificaron 25.6 mg del compuesto IV en forma de cristales de color amarillo soluble en diclorometano, con un rendimiento de reacción de 48.14 %. En cromatografía en capa delgada se observó a un R_f de 0.51 utilizando el sistema de disolventes Hx-AcOEt (1:1) como eluyente. Presentó una coloración amarilla con el revelador específico de Börntrager para quinonas y con ácido fosfomolibdico.

En el espectro de RMN-¹H del compuesto IV en CDCl₃ (Figura 29) a campo alto se observan dos señales simples con un δ 3.98 y 3.96, cada señal integra para tres protones que corresponden a los grupos metoxilos en posición C8 y C3 respectivamente, estableciendo la metilación de los grupos OH del compuesto I y por consiguiente, la ausencia de señales simples a campo bajo asignadas a los protones fenólicos en posición 3 y 8. Por último, en la región aromática entre 7-8 ppm se observan señales análogas a las reportadas en el espectro del compuesto I, así como las señales simples a δ 4.03 que corresponde al grupo metoxi de un metil éster y a δ 2.69 que corresponde al grupo metilo en posición C1. Con base a los datos espectroscópicos obtenidos y la similitud con el derivado trimetil DMAC

(Collí, 2014) Cuadro 7, el compuesto IV se identificó como 3,8-dimetoxi-1-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidro-2-antracencarboxilato de metilo, con fórmula molecular $C_{19}H_{16}O_6$ y peso de 340.33 g/mol. Este compuesto fue aislado por primera vez de *Gladiolus segetum* una planta ornamental perteneciente a la familia de las *Iridaceae*, utilizada en la medicina tradicional de Argelia de Sur como fitopreparado con actividad ulcérica. También, es un producto intermediario en la ruta sintética de la mumbastatina que se utiliza en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (Salim *et al.*, 2014; Abdessemed y Dibi., 2013; Lee *et al.*, 2007).

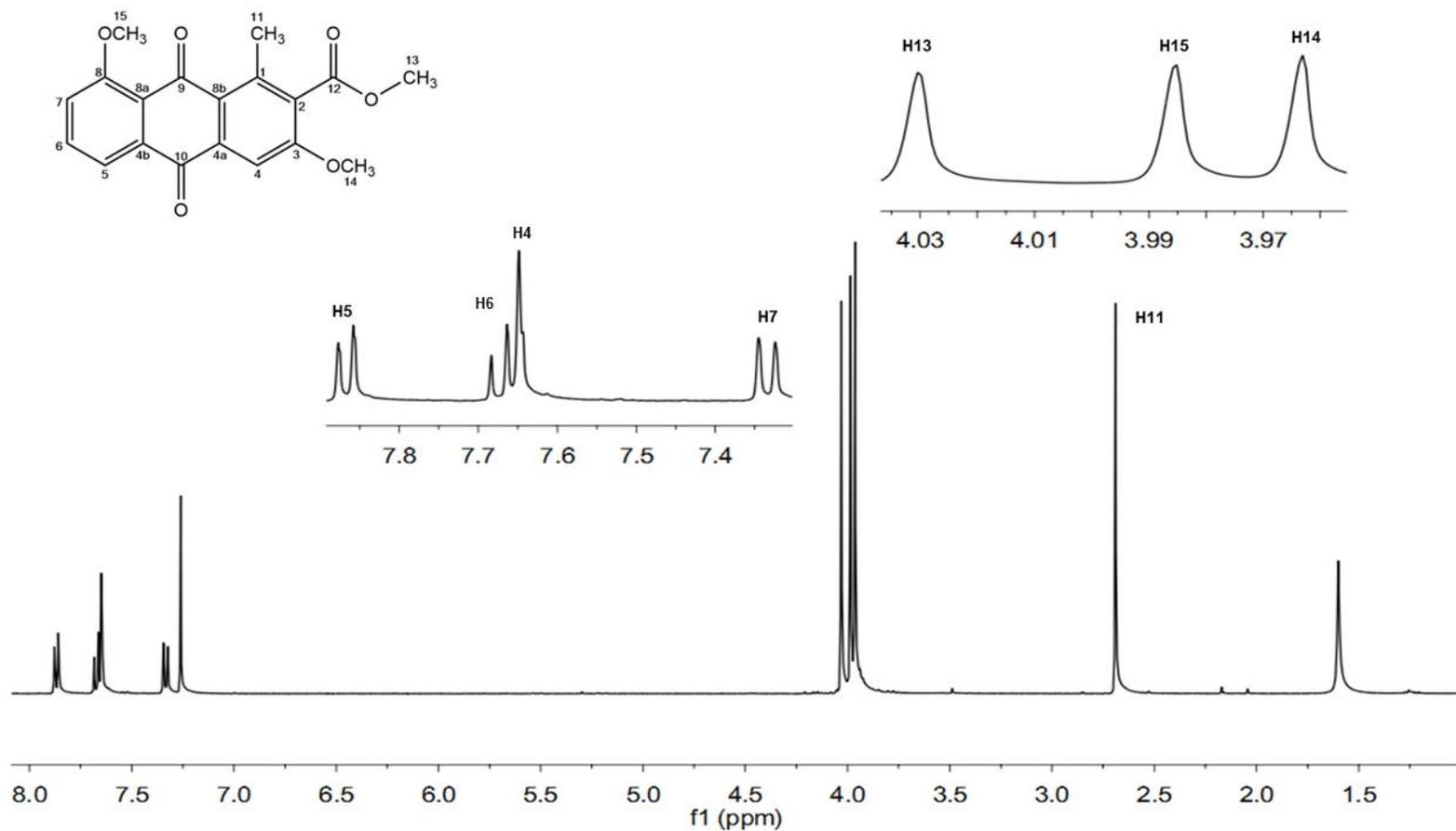


Figura 29. Estructura y espectro de RMN- ^1H del compuesto IV obtenido a 400 MHz en CDCl_3 .

Cuadro 7. Datos espectroscópicos de RMN-¹H del compuesto IV en comparación con la literatura (Collí, 2014).

Posición	Compuesto IV	Trimetil DMAC
	RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ (m, J, I)	RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ (m, J, I)
4	7.65 (s, 1H, H4)	7.65 (s, 1H, H4)
5	7.87 (d, J= 7.64 Hz, 1H, H5)	7.87 (dd, J= 7.7, 1.1 Hz, 1H, H5)
6	7.67 (t, J= 8.1 Hz, 1H, H6)	7.67 (t, J= 8.1 Hz, 1H, H6)
7	7.33 (d, J= 8.4 Hz, 1H, H7)	7.34 (dd, J= 8.4, 0.9 Hz, 1H, H7)
11	2.69 (s, 3H, H11)	2.69 (s, 3H, H11)
13	4.03 (s, 3H, H13)	4.03 (s, 3H, H13)
14	3.96 (s, 3H, H14)	3.97 (s, 3H, H14)
15	3.98 (s, 3H, H15)	3.99 (s, 3H, H15)

2.3.6 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO V

Se purificaron 7 mg del compuesto V en forma de precipitado color amarillo soluble en etanol, con un rendimiento de reacción de 7.4 %. En cromatografía por capa delgada en fase reversa se observó a un R_f de 0.7 utilizando MeOH: H₂O en proporción (3:2) como fase móvil. Presentó una coloración amarilla con el revelador de ácido fosfomolibdico y naranja con el revelador Börntrager.

En la figura 30 se presenta el espectro de RMN-¹H del compuesto V en CD₃OD. A campo alto se observan dos señales simples a δ 3.97 y 4.00 que integran para tres protones cada una y que pertenecen a grupos metoxilo en posición C3 y C8 respectivamente, así mismo no se observó señales simples a campo bajo asignadas a los protones fenólicos en posición 3 y 8 evidenciando la dimetilación de la antraquinona, tampoco se detectó otra señal a aproximadamente δ 4 característica de grupos metoxilos de un metil éster lo cual indica la

transformación química a un ácido carboxílico. Se observó señales análogas al compuesto I en la región aromática entre 7-8 ppm así como la presencia de una señal a 2.67 ppm que pertenece al grupo metilo en C1.

Con base en los datos espectroscópicos obtenidos (Cuadro 8) el compuesto V se identificó como ácido-3,8-dimetoxi-1-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidro-2-antraceno-carboxílico con fórmula molecular de $C_{18}H_{14}O_6$ y peso molecular de 326.3 g/mol. Actualmente se encuentra patentado como agente antitumoral en combinación con otros compuestos antineoplásicos y agentes inmunoterapéuticos (Lu *et al.*, 2012).

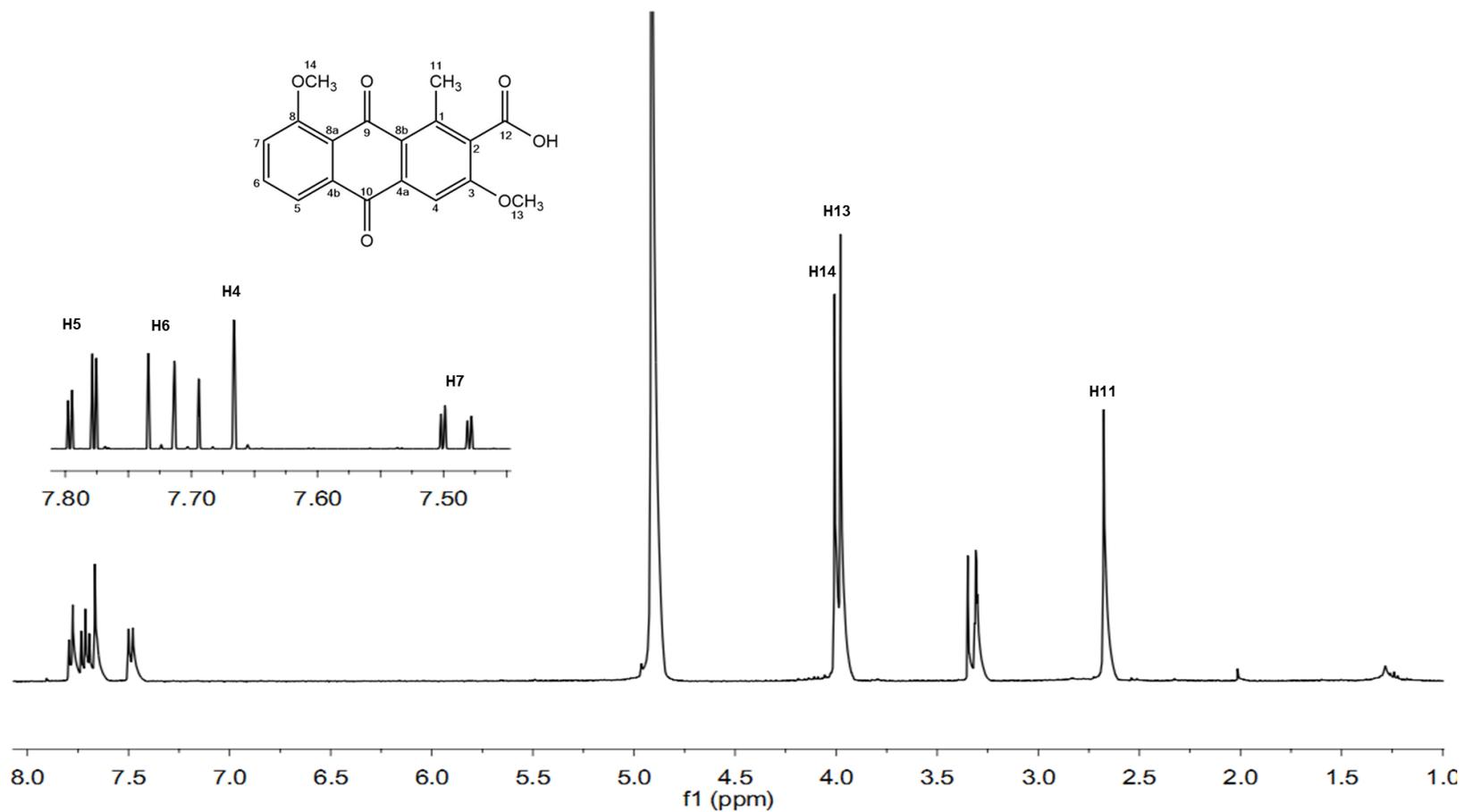


Figura 30. Estructura y espectro de RMN- ^1H del compuesto V obtenido a 400 MHz en CD_3OD .

Cuadro 8. Datos espectroscópicos de RMN-¹H del compuesto V

Posición	Compuesto V
	RMN- ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) δ (m, J, I)
4	7.66 (s, 1H, H4)
5	7.78 (dd, J=11.5, 1.6 Hz, 1H, H5)
6	7.71 (t, J=12.4 Hz, 1H, H6)
7	7.49 (dd, J=12.6, 1.6 Hz, 1H, H7)
11	2.67 (s, 3H, H11)
13	3.98 (s, 3H, H13)
14	4.00 (s, 3H, H14)

2.3.7 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO VI

Se obtuvieron 10 mg del compuesto VI en forma de cristales amarillos solubles en diclorometano, con un rendimiento de 15 %. En cromatografía en capa delgada de fase reversa se observó una banda a un R_f de 0.3 utilizando el sistema de disolventes ACN: H₂O (3:2) que reveló a un color naranja en presencia del revelador de quinonas Börntrager y presentó fluorescencia naranja a 365 nm. La elucidación estructural del compuesto se realizó a partir de espectroscopia RMN-¹H, RMN-¹³C, HMBC y HSQC.

El espectro de RMN-¹H del compuesto VI en CDCl₃ (Figura 31) presenta las señales características para una estructura antraquinónica glicosilada como lo son:

Una señal triplete a δ 7.62 (H6) en acoplamiento *orto* (J_{orto} = 8.1 Hz) con el protón H7. Así mismo, se observó una señal doblete a δ 7.76 asignada al protón H5, que se encuentra sobrepuesta con una señal simple a δ 7.75 que corresponde al protón H4. Así también se observó una señal doblete a δ 7.30 (H7) en acoplamiento *orto* (J_{orto} = 8.1 Hz) con el protón H6 del anillo aromático de la antraquinona. Una señal simple a δ 12.83 fue asignada al

grupo hidroxilo (8-OH) comprometido en un enlace de hidrógeno con el carbonilo en posición C9. Por otra parte, la señal simple a δ 2.8 se asignó al protón H11.

Por último las señales de la glucosa tetraacetilada en unión al anillo antraquinónico se evidenció por señales a δ 6.05 que corresponde al protón anomérico (H1') y a δ 5.21, 4.34, 4.19, 3.96, y 5.33 asignadas a los protones H2', H3', H4', H5' y H6' que conforman el anillo de la piranosa. También se observó cuatro señales a δ 2.09, 2.07, 2.06 y 2.04 que corresponden a los grupos metilos de la glucosa tetraacetilada.

En el espectro de RMN-¹³C del compuesto VI (Figura 32) se detectaron 30 carbonos, en conjunto con el espectro de HSQC (Figura 33, Anexo I) se observó la presencia de 7 grupos carbonilos, de los cuales, las señales a δ 189.25 y δ 181.94 se asignaron a los carbonos C9 y C10, la señal a δ 161.93 se asignó al carbono C12 que corresponde a un grupo carboxilo y a δ 170 aproximadamente se observaron cuatro señales que corresponden a los grupos acetilos de la glucosa.

Así también se observó la presencia de 8 carbonos cuaternarios, las señales más desplazadas a δ 162.49 y δ 167.43 se asignaron a los carbonos C8 y C3 respectivamente y corresponden a carbonos que son base de alcohol.

Por otra parte, se evidenció la presencia de 4 grupos metinos aromáticos a δ 114.6, 119.16, 135.87 y 125.14 asignadas a los carbonos C4, C5, C6 y C7 respectivamente en la antraquinona (Figura 33A), así como la presencia del carbono anomérico C1' a δ 92.91, 4 grupos metinos unidos a grupos acetilos (C2', C3', C4' y C5') y un grupo metileno (C6') que conforman el anillo de la piranosa (Figura 33B). Finalmente se observó 5 grupos metilos, de los cuales la señal a δ 21.54 se designó como C-11 de la antraquinona y las 4 señales restantes a δ 20.62, 21.62, 20.57 y 20.55 asignadas a los carbonos C2'', C3'', C4'' y C5'' respectivamente corresponden a los metilos de la glucosa tetraacetilada (Figura 33C).

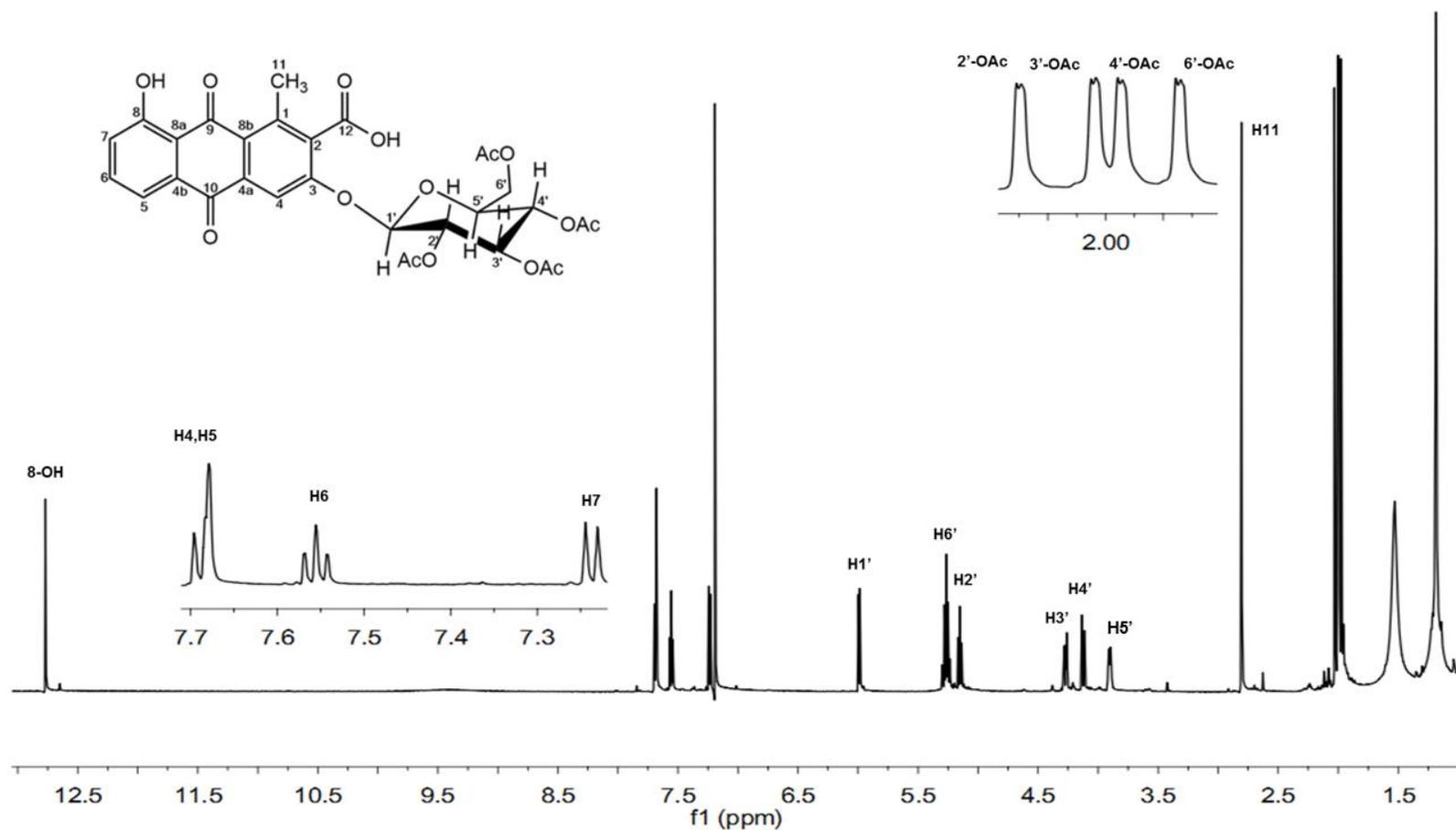


Figura 31. Estructura y espectro de RMN- ^1H del compuesto VI obtenido a 600 MHz en CDCl_3 .

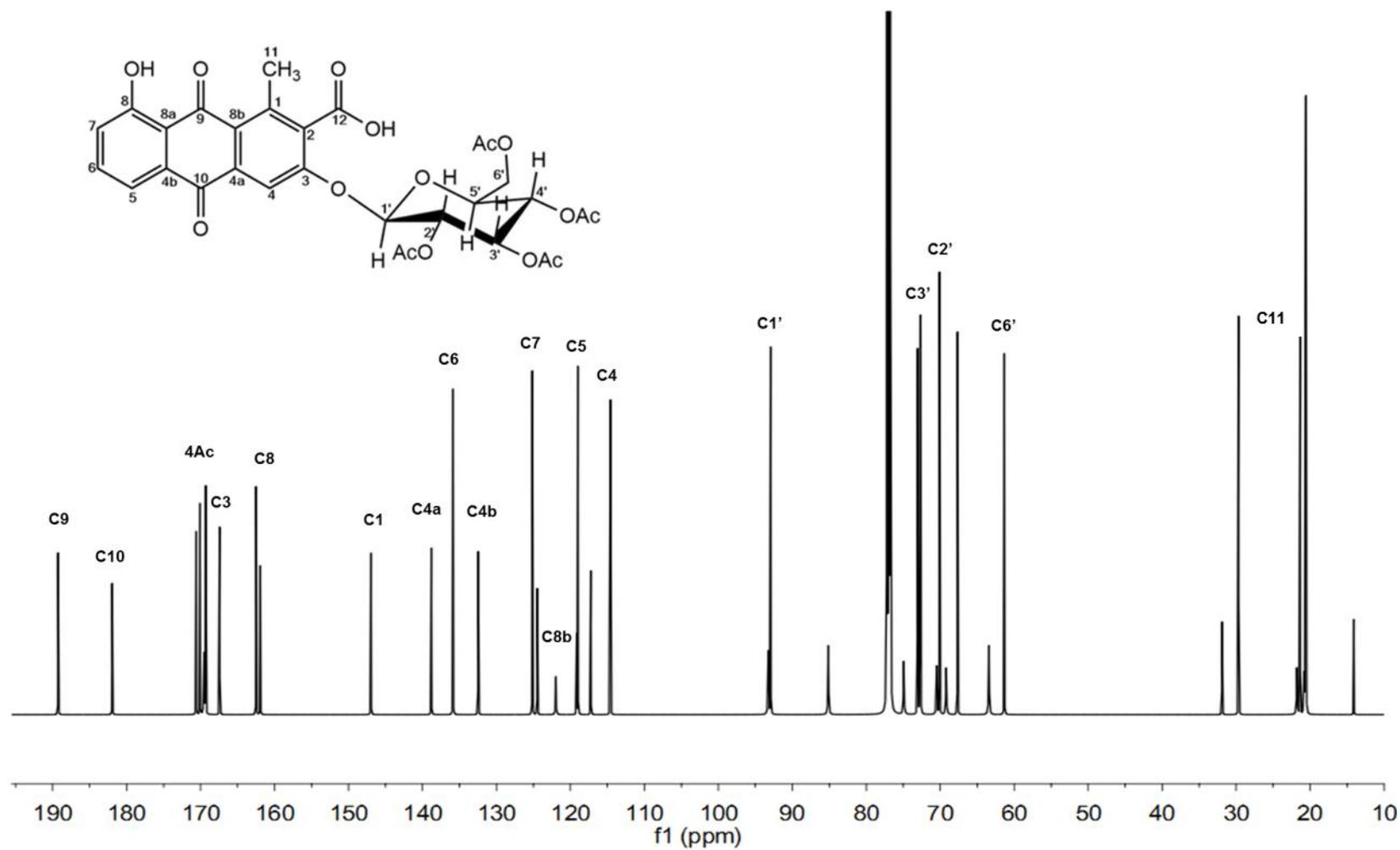


Figura 32. Estructura y espectro de RMN- ^{13}C del compuesto VI obtenido a 150 MHz en CD_3OD

Cuadro 9. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C del compuesto VI.

Posición	RMN- ¹ H [600 MHz, (CDCl ₃)] δ (m, J, I)	RMN- ¹³ C [150 MHz, (CDCl ₃)] (δ)
1	—	146.97 (C1)
2	—	124.48 (C2)
3	—	167.43 (C3)
4	7.75 (s, 1H, H4)	114.6 (C4)
4a y 4b	—	138.8 (C4a). 132.47 (C4b)
5	7.76 (d, 1H, H5)	119.16 (C5)
6	7.62 (t, 1H, J=8.1 Hz, H6)	135.87 (C6)
7	7.30 (d, 1H, J= 8.3 Hz, H7)	125.14 (C7)
8	12.77 (s, 1H, 8-OH)	162.49 (C8)
8a y 8b	—	117.25 (C8a) y 121.97 (C8b)
9	—	189.25 (C9)
10	—	181.94 (C10)
11	2.87 (s, 3H, H11)	21.54 (C11)
12	—	161.93 (C12)
1'	6.05 (dd, 1H, J=7.8, 1.2 Hz, H1')	92.91 (C1')
2'	5.21 (t, 1H, H2')	70.09 (C2')
2''	2.09 (s, 3H, 2''-OAc)	169.32 (2'-CO)
3'	4.34 (dd, 1H, H3')	61.35 (C3')
3''	2.07 (s, 3H, 3''-OAc)	170.60 (3'-CO)
4'	4.19 (m, 1H, H4')	67.66 (C4')
4''	2.06 (s, 3H, 4''-OAc)	169.52 (4'-CO)
5'	3.96 (m, 1H, H5')	73.07 (C5')
6'	5.33 (m, 2H, H6')	72.65 (C6')
6''	2.04 (s, 3H, 6''-OAc)	170.08 (6'-CO)
2'', 3'', 4'', 6''	—	20.62, 20.62, 20.57, 20.55 (CH ₃)*

El análisis del espectro de HMBC del compuesto VI (Figura 34, Anexo II) evidenció la unión entre el núcleo de antraquinona y la glucosa tetraacetilada con las siguientes correlaciones:

a) Una correlación a ³J_{CH} entre el protón anómero de la glucosa (H1') a δ 6.05 y el carbono C3 del núcleo de la antraquinona a δ 167.45 (Figura 34C). De acuerdo a la constante de

acoplamiento del protón anomérico ($J=7.6$ Hz) existe un acoplamiento axial-axial lo cual indica que la aglicona se encuentra en posición β .

b) Una correlación $^2J_{CH}$ entre el protón del grupo hidroxilo (OH) a δ 12.85 y el carbono C8 a δ 162.44, así mismo las correlaciones a $^3J_{CH}$ con los carbonos C7 y C8a (δ 125.04 y 117.21 respectivamente) sugieren que el grupo hidroxilo es un sustituyente en posición C8 de la antraquinona (Figura 34A).

c) Una correlación $^2J_{CH}$ entre los protones del grupo metilo (H11) a δ 2.90 con el carbono C1 a δ 147.31, así mismo las correlaciones a $^3J_{CH}$ con los carbonos C2 y C8b (δ 124.49 y 121.27 respectivamente) sugieren que el grupo metilo es un sustituyente en posición C1 del núcleo de la antraquinona (Figura 34D).

d) Una correlación $^2J_{CH}$ entre los protones de los grupos acetilos de la glucosa (H2'',3'' 4'' y 6'') a δ 2 con sus respectivos carbonilos (2'',3'' 4'' y 6''-CO) a δ 170 (Figura 34D).

e) Se observó las correlaciones a $^2J_{CH}$ y $^3J_{CH}$ entre los protones y carbonos que conforman el anillo aromático de la antraquinona (Figura 34B).

De acuerdo a los datos espectroscópicos analizados de RMN-1D (Cuadro 9) y RMN-2D, al compuesto VI se le asignó el nombre sistemático ácido-8-hidroxi-3-O-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-1-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidro-2-antracencarboxílico, con fórmula y peso molecular de $C_{30}H_{28}O_{15}$ y 642.15 g/mol respectivamente. Este compuesto es novedoso por lo tanto no se cuentan con registros sobre su bioactividad.

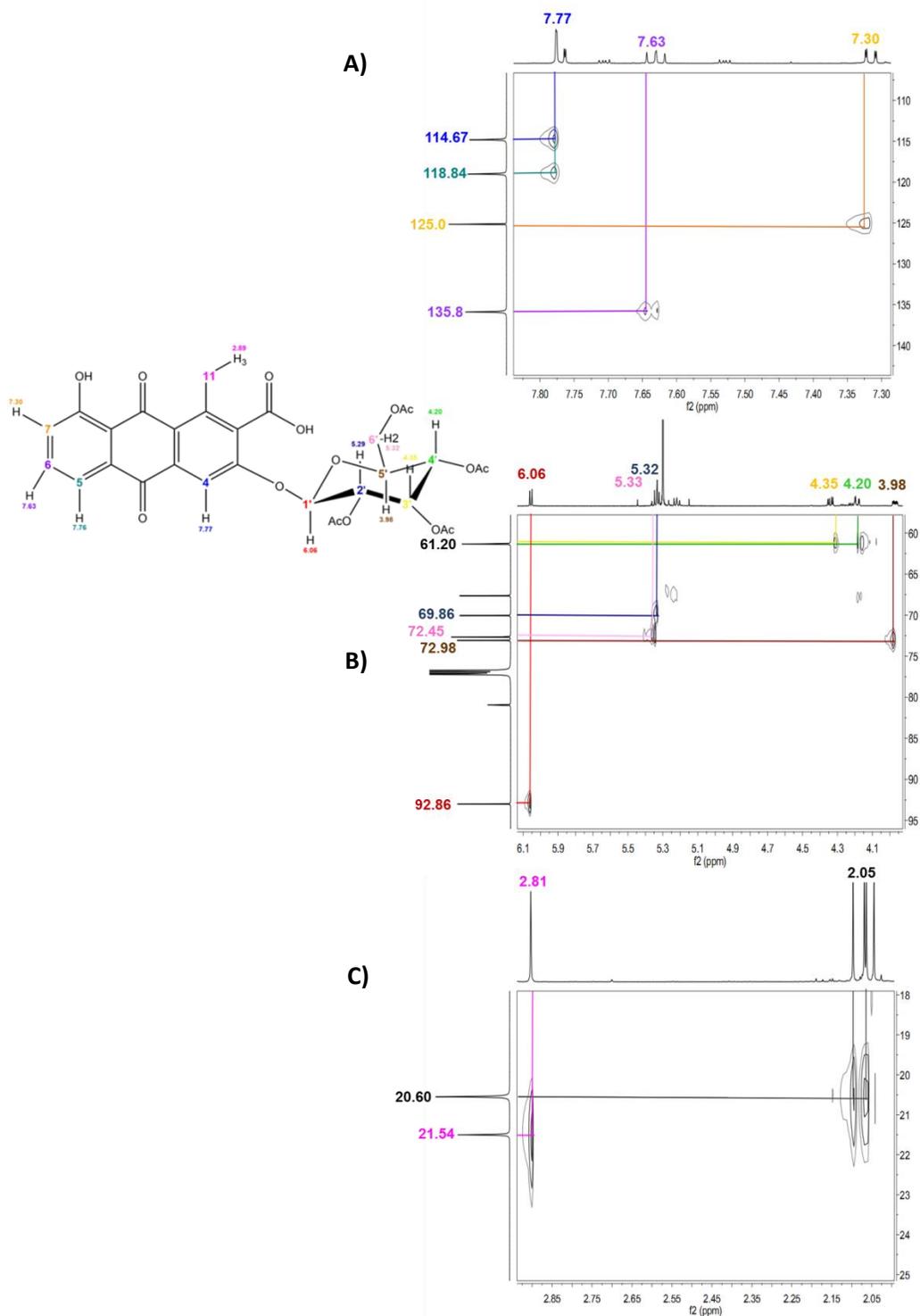


Figura 33. Espectro HSQC del compuesto VI obtenido a 600 MHz en $CDCl_3$.

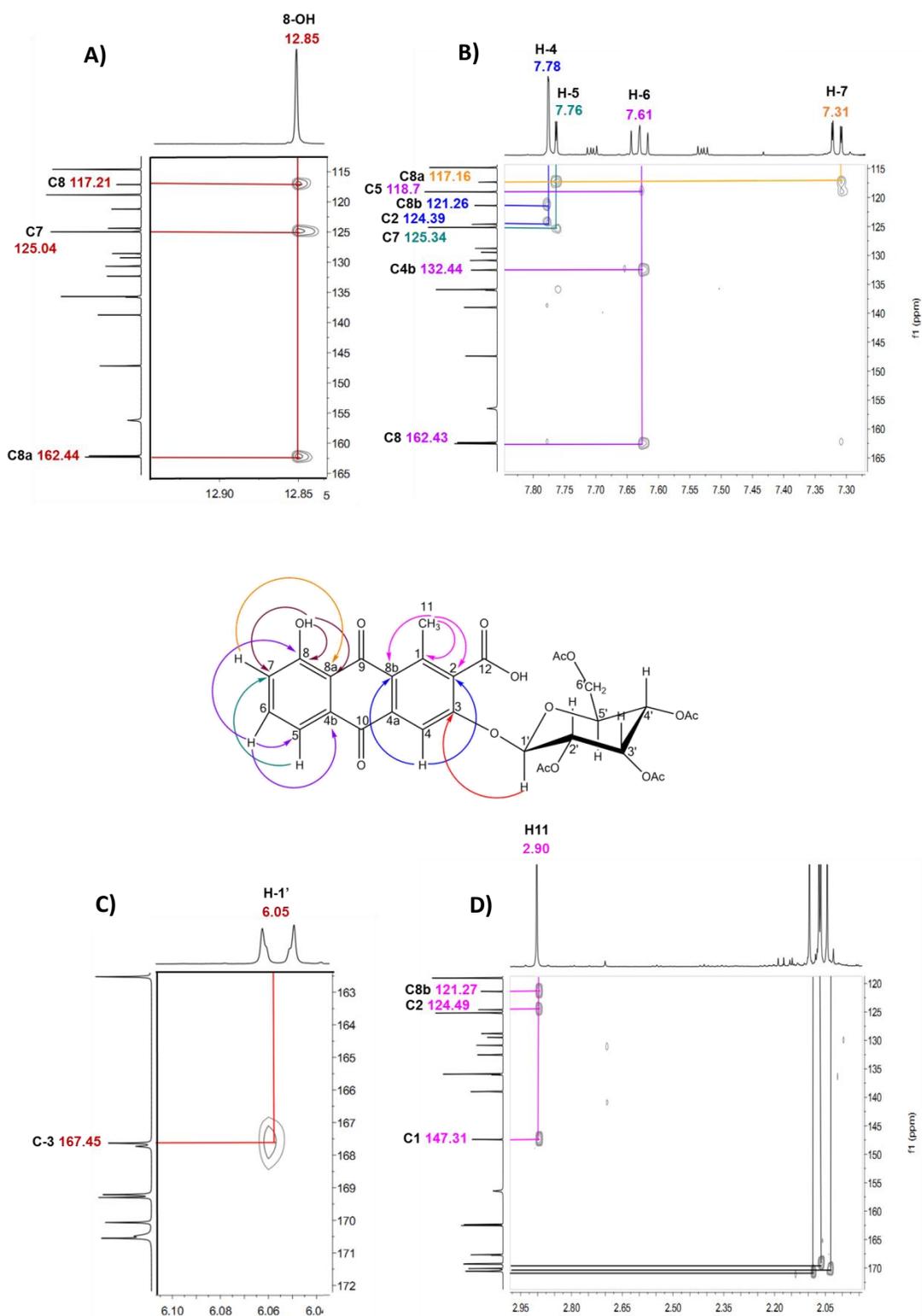


Figura 34. Espectro HMBC del compuesto VI obtenido a 600 MHz en CDCl_3 .

2.3.8 IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO IX

Se purificaron 27 mg del compuesto IX como cristales amarillos solubles en diclorometano con un rendimiento de reacción de 40.9 %. En cromatografía en capa fina se observó a un Rf de 0.6 utilizando como sistema de eluyente Hx:An (2:8), presentó una coloración naranja utilizando el revelador para quinonas Börntrager y se observó fluorescencia naranja a 365 nm. La elucidación estructural del compuesto se llevó a cabo por espectroscopía de RMN-¹H, RMN-¹³C, HSQC y HMBC.

El espectro de RMN-¹H del compuesto IX en CDCl₃ (Figura 35) presenta las señales características para una estructura antraquinónica glicosilada como lo son:

Una señal triplete a δ 7.62 (H6) en acoplamiento *orto* ($J_{orto}= 8.1$ Hz) con el protón H5. Así mismo, se observó una señal doble de dobles a δ 7.78 asignada al protón H7, que se encuentra sobrepuesta con una señal simple a δ 7.77 que corresponde al protón H4. También a δ 7.30 se observó una señal doble de dobles asignada al protón H5 en acoplamiento *orto* y *meta* con H6 y H7 respectivamente ($J_{orto}= 8.1$, $J_{meta} 1.2$ Hz), la señal doblete a δ 7.14 se asignó al protón H2 en el anillo aromático de la antraquinona. Una señal simple a δ 12.91 fue asignada al grupo hidroxilo (8-OH) comprometido en un enlace de hidrógeno con el carbonilo en posición C9. Por otra parte, la señal simple a δ 2.83 se asignó al protón H11.

La presencia de la glucosa tetraacetilada unida a la antraquinona se evidenció por tres señales a multipletes a δ 5.17, 4.24 y 4.03 asignados a los protones H4', H6' y H5' y por una señal multiplete mas desplazada a δ 5.34 asignada al protón anomérico H1' y a H2' y H3' en el anillo de la piranosa. Por último, a δ 2.05 se observó cuatro señales simples sobrepuestas que corresponden a los protones de los grupos acetilos de la glucosa.

En el espectro de RMN-¹³C del compuesto IX (Figura 36) se detectaron 29 carbonos, en conjunto con el espectro de HSQC (Figura 37, Anexo III) mostró la presencia de 6 grupos carbonilos, de los cuales, las señales a δ 189.93 y δ 182.39 se asignaron a los carbonos C9 y C10, y a δ 170 se observaron cuatro señales que corresponden a los grupos acetilos de la glucosa.

Así también se evidenció la presencia de 7 carbonos cuaternarios, las señales más desplazadas a δ 162.58 y δ 159.63 se asignaron a los carbonos C8 y C3 respectivamente y corresponden a carbonos que son base de alcohol.

Por otra parte, se evidenció la presencia de 5 grupos metinos aromáticos a δ 126.21, 118.86, 124.76, 135.84 y 111.76 asignadas a los carbonos C2, C4, C5, C6 y C7 respectivamente en la antraquinona (Figura 37A). Se observó la presencia de 4 grupos metinos unidos a grupos acetilos (C2', C3', C4' y C5'), un grupo metileno (C6') y el carbono anomérico C1' a δ 97.29 que conforman el anillo de la piranososa (Figura 37B). Finalmente se observó la presencia de 5 grupos metilos, de los cuales la señal a δ 23.89 se designó como C11 de la antraquinona y las 4 señales restantes a δ 20.51, 20.47, 20.46 y 20.45 asignadas a los carbonos C2'', C3'', C4'' y C5'' respectivamente, corresponden a los metilos de la glucosa tetraacetilada (Figura 37C).

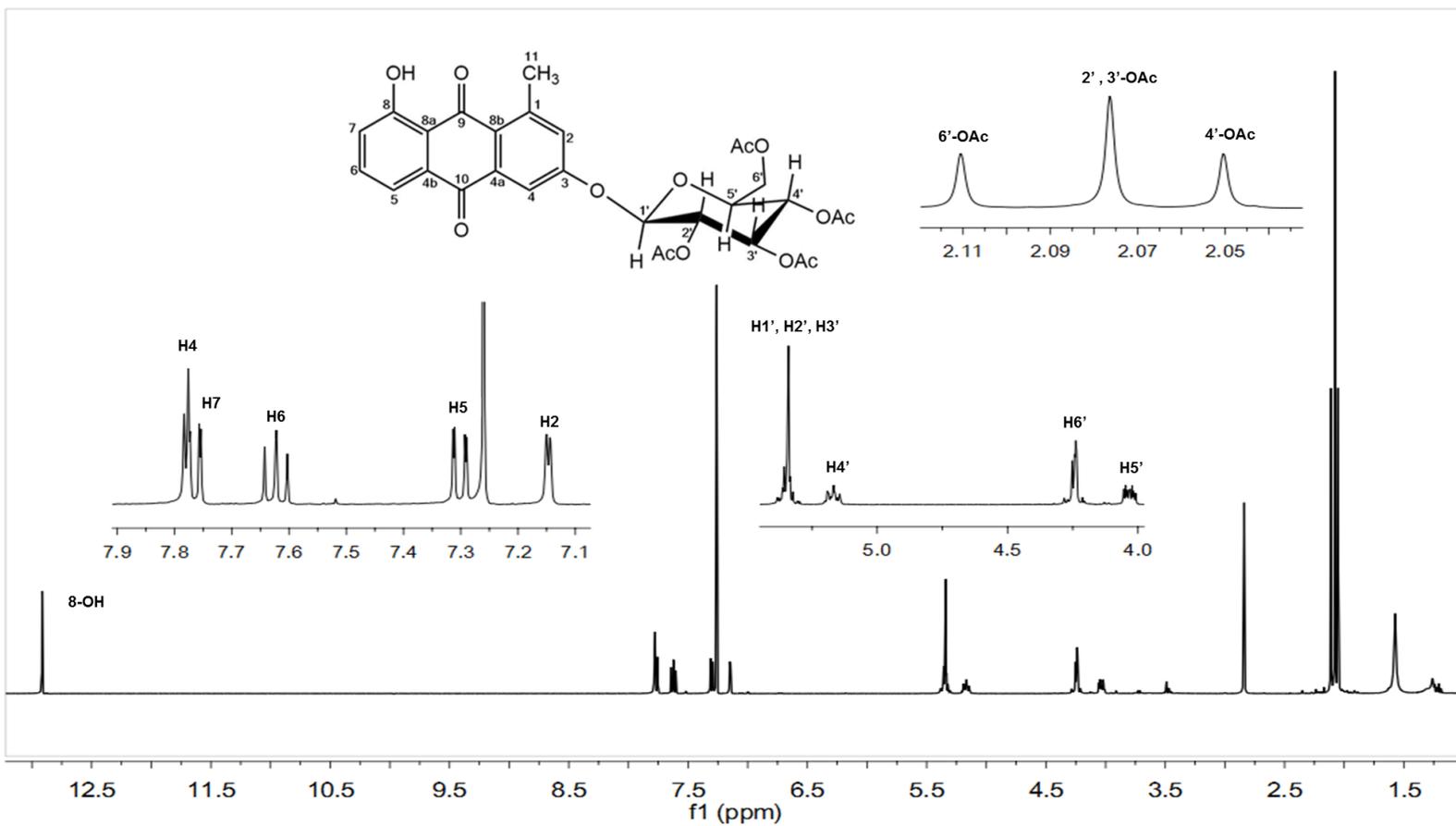


Figura 35. Estructura y espectro de RMN-¹H del compuesto IX obtenido a 400 MHz en CDCl₃

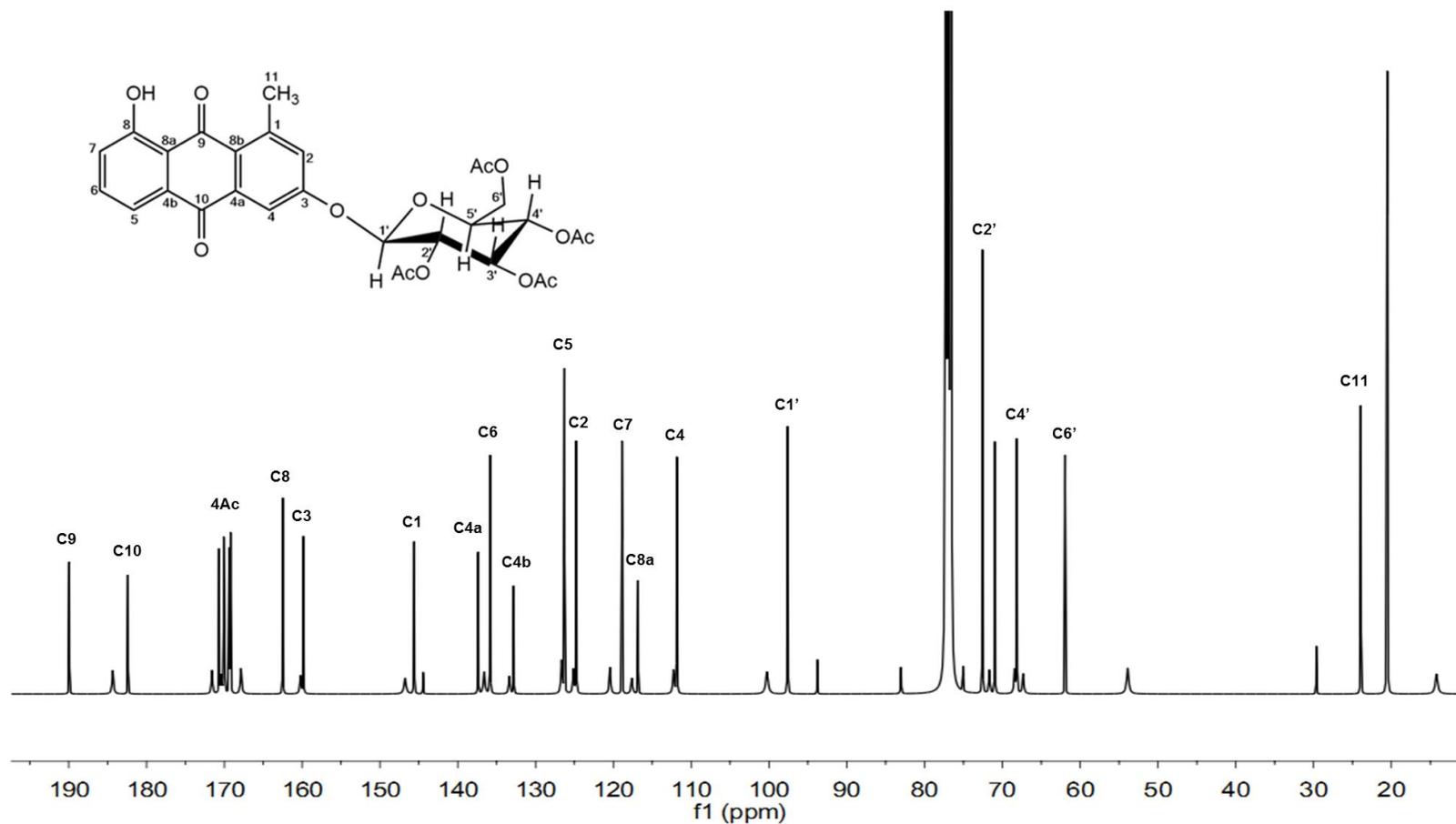


Figura 36. Estructura y espectro de RMN- ^{13}C del compuesto IX obtenido a 100 MHz en CDCl_3

Cuadro 10. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C del compuesto IX.

Posición	RMN- ¹ H [400 MHz, (CDCl ₃)] δ (m, J, I)	RMN- ¹³ C [100 MHz, (CDCl ₃)] δ
1	—	145.61 (C1)
2	7.14 (d, 1H, H2)	126.21 (C2)
3	—	159.63 (C3)
4	7.77 (s, 2H, 1H, 4H)	118.86 (C4)
4 ^a y 4b	—	137.83 (C4a). 132.69 (C4b)
5	7.30 (dd, J= 8.4, 1.2 Hz, 1H, H5)	124.76 (C5)
6	7.62 (t, 1H, J=8.16, H6)	135.84 (C6)
7	7.77 (dd, 2H, J= 9.5, 1.2 Hz, 1H, H7)	111.76 (C7)
8	12.91 (s, 1H, 8-OH)	162.58 (C8)
8a y 8b	—	116.60 (C8a) y 126.28 (C8b)
9	—	189.93 (C9)
10	—	182.39 (C10)
11	2.83 (s, 3H, H11)	23.89 (C11)
1'	5,34 (m, 3H, H1', H2' y H3')	97.29 (C1')
2'	5,34 (m, 3H, H1', H2' y H3')	75.45 (C2')
2''	2.11 (s, 3H, 2''-OAc)	167.70 (2''-CO)
3'	5,34 (m, 3H, H1', H2' y H3')	70.86 (C3')
3''	2.07 (s, 6H, 3''-OAc y 4''-OAc)	169.30 (3''-CO)
4'	5.17 (m, 1H, H4')	68.02 (C4')
4''	2.07 (s, 6H, 3''-OAc y 4''-OAc)	170.14(4''-CO)
5'	4.03 (m, 1H, H5')	72.49 (C5')
6'	4.24 (m, 2H, H6')	61.84 (C6')
6''	2.05 (s, 3H, 6''-OAc)	170.66 (6''-CO)
2''', 3''', 4''', 6'''	—	20.51, 20.47, 20.46, 20.45 (CH ₃)*

El análisis del espectro de HMBC del compuesto IX (Figura 38, Anexo IV) evidenció la unión entre el núcleo de antraquinona y la glucosa tetraacetilada con las siguientes correlaciones:

- a) Una correlación a $^3J_{CH}$ entre el protón anómero de la glucosa (H1') a δ 5.36 y el carbono C3 del núcleo de la antraquinona a δ 159.67 (Figura 38C). Debido a que el protón anomérico H1' se observó como un multiplete, no se determinó si la aglicona se encontraba en posición α o β .
- b) Una correlación $^2J_{CH}$ entre el protón del grupo hidroxilo (OH) a δ 12.92 y el carbono C-8 a δ 162.58, así mismo la correlación $^3J_{CH}$ con C8a a δ 116.58 sugieren que el grupo hidroxilo es un sustituyente en posición C8 de la antraquinona (Figura 38A).
- c) Una correlación $^2J_{CH}$ entre los protones del grupo metilo (H11) a δ 2.86 con el carbono C1 a δ 145.61, así mismo la correlación a $^3J_{CH}$ con C2 a δ 126.21 sugieren que el grupo metilo es un sustituyente en posición C1 del núcleo de la antraquinona (Figura 38D).
- d) Una correlación $^2J_{CH}$ entre los protones de los grupos acetilos de la glucosa (H2'',3'' 4'' y 6'') a δ 2.07 con sus respectivos carbonilos (2'',3'' 4'' y 6''-CO) a δ 170 aproximadamente (Figura 38D).
- e) Se observó las correlaciones a $^2J_{CH}$ y $^3J_{CH}$ entre los protones y carbonos que conforman el sistema aromático de la antraquinona (Figura 38B).

De acuerdo a los datos espectroscópicos de RMN-1D (Cuadro 10) y RMN-2D analizados, el compuesto IX se identificó como 8-hidroxi-3-O-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-1-metil-9,10-antraquinona, con fórmula y peso molecular de $C_{29}H_{28}O_{13}$ y 584.15 g/mol respectivamente. Este compuesto es novedoso por lo tanto no se cuentan con registros sobre su bioactividad.

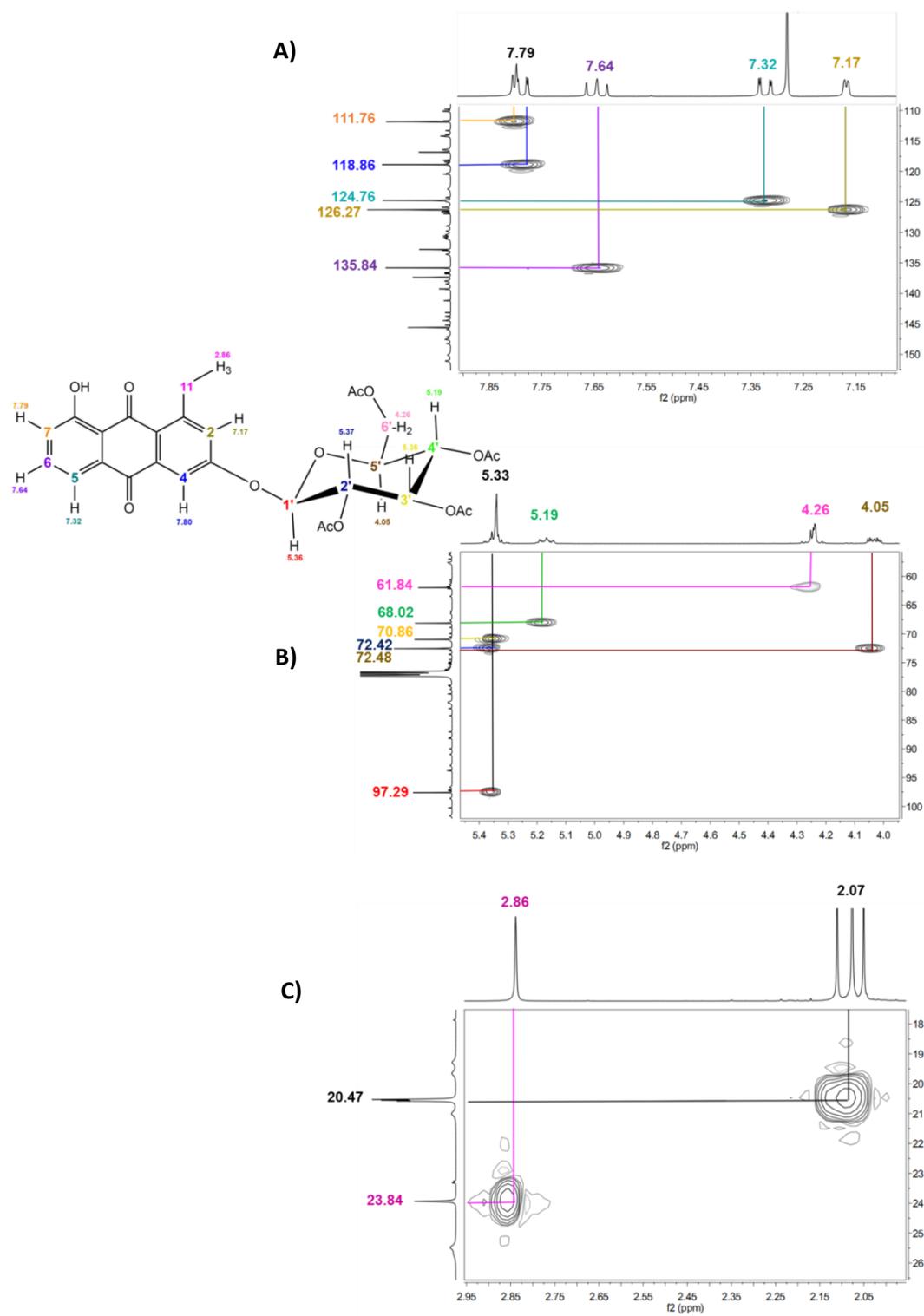


Figura 37. Espectro HSQC del compuesto XI obtenido a 400 MHz en CDCl_3 .

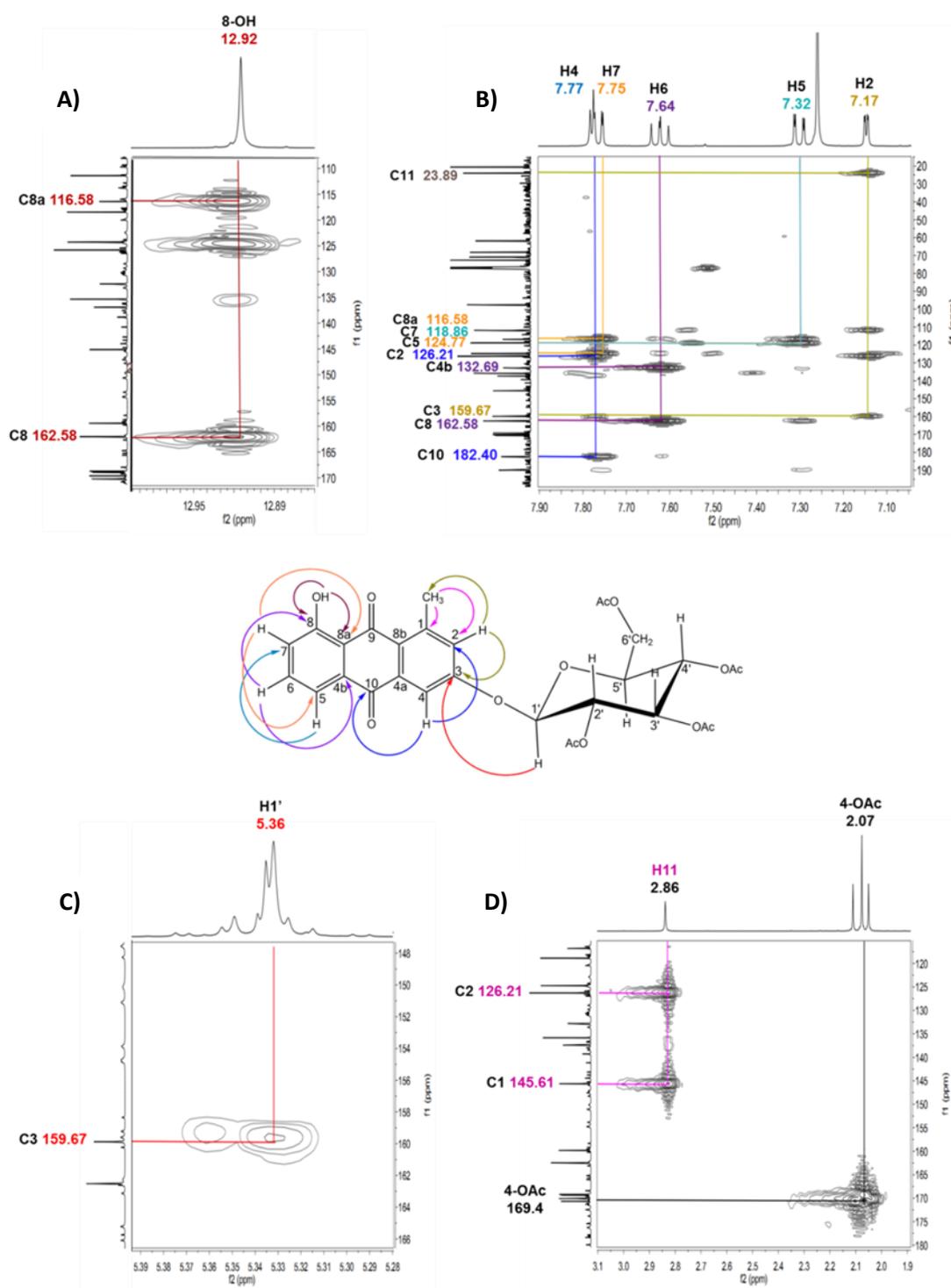


Figura 38. Espectro HMBC del compuesto IX obtenido a 400 MHz en CDCl_3

2.4 CONCLUSIONES

Se obtuvieron cinco derivados semisintéticos antraquinónicos metilados, hidroxilados y O-glucosilados (compuestos III, IV, V, VI y IX) a partir de los compuestos I y II que son productos naturales de la raíz de *A. vera*.

La hidrólisis del compuesto I fue la reacción con mayor rendimiento con el 79.2 %, a su vez la reacción con menor rendimiento (7.42 %) fue la hidrólisis del compuesto IV.

Se obtuvo mayor rendimiento de reacción de la O-glucosilación del compuesto IX (49.9 %) en comparación con el compuesto VI (14.84 %).

Los compuestos O-glucosilados VI, VII, VIII y IX son moléculas novedosas.

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS I Y II Y SUS DERIVADOS SEMISINTÉTICOS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA A(H1N1)pdm09.

3.1 INTRODUCCIÓN

La evaluación antiviral *in vitro* permite identificar moléculas pequeñas que tienen un efecto fenotípico general sobre la replicación del virus y posteriormente, a partir de ensayos secundarios se caracteriza el mecanismo de acción e identifica la proteína diana. Los ensayos antivirales *in vitro* pueden ser indirectos si se basan en la medición de los efectos de la replicación viral en la célula o a través de la detección directa del virus (Beyleveld *et al.*, 2013).

El ensayo de reducción del efecto citopático es generalmente el primer paso en el tamizaje de gran número de compuestos para determinar su bioactividad, se basa en la medición de efectos citopáticos como resultado de la replicación viral relacionado con el redondeamiento, lisis y apoptosis celular. Este método permite cuantificar de forma indirecta la infección por el virus de influenza, a través de la tinción de células viables. (Loregian *et al.*, 2014).

Los ensayos pueden realizarse bajo condiciones de replicación de un solo ciclo o multi-ciclo. Los ensayos de un solo ciclo utilizan una alta multiplicidad de infección (MOI) de esta forma el 100 % de las células son infectadas en la primera ronda de replicación capturando todos los pasos del ciclo de vida del virus desde la unión con el receptor celular hasta la expresión génica, por lo tanto, un inhibidor de la NA como el oseltamivir no tienen efecto en los ensayos de replicación de un solo ciclo porque no hay más células no infectadas en el cultivo. En contraste, utilizando MOI bajas de infección se permite el crecimiento del virus en varios ciclos. Teóricamente a una MOI de 0.001 el 1 % de las células son infectadas en la primera ronda de replicación, así mismo a una MOI más alta de 0.01 el 10 % de la monocapa celular se infecta en la primera ronda, por lo tanto se pueden capturar todas las etapas del ciclo de vida del virus y en estas condiciones el oseltamivir funciona como un control positivo, inhibiendo la liberación de nuevas partículas virales y limitando las rondas

secundarias de infección, de esta forma se observa la reducción en la replicación viral y efecto citopático en comparación con el control viral (Beyleveld *et al.*, 2013).

El ciclo de vida del virus de influenza tiene una duración de 8 a 10 h y puede ser dividido en tres etapas: a) Entrada viral (0-2h), b) Replicación y traducción del genoma viral (2-8h) y c) Liberación de la progenie viral (8-10 h) (Kwon *et al.*, 2010).

Cada una de las etapas puede ser el objetivo farmacológico de moléculas inhibidoras, para determinar esto se llevan a cabo ensayos de tiempo de adición, en donde el compuesto se evalúa en diferentes momentos de la infección: a) Pre-tratamiento, las células son tratadas 12 h con el compuesto antes de la infección, b) Co-tratamiento, el compuesto se incubaba con el virus 1 h antes de la infección (a 4 °C) y durante la infección por 1 h y c) Post-tratamiento, el compuesto se adiciona 1 h después de la infección viral (Kwon *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2014).

En los ensayos de tiempo de adición durante el pre-tratamiento se puede identificar la inhibición de la adsorción viral a través de la interacción del compuesto con el receptor celular AS. En el co-tratamiento se puede identificar compuestos que bloquean la entrada viral inhibiendo la unión de HA con AS, o en los procesos de internalización y fusión viral. Por otro lado, en el post-tratamiento se identifica la inhibición de etapas posteriores a la entrada viral como la replicación y transcripción de RNA, empaquetamiento de proteínas virales o liberación de progenie viral (Figura 39) (Kwon *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2014).

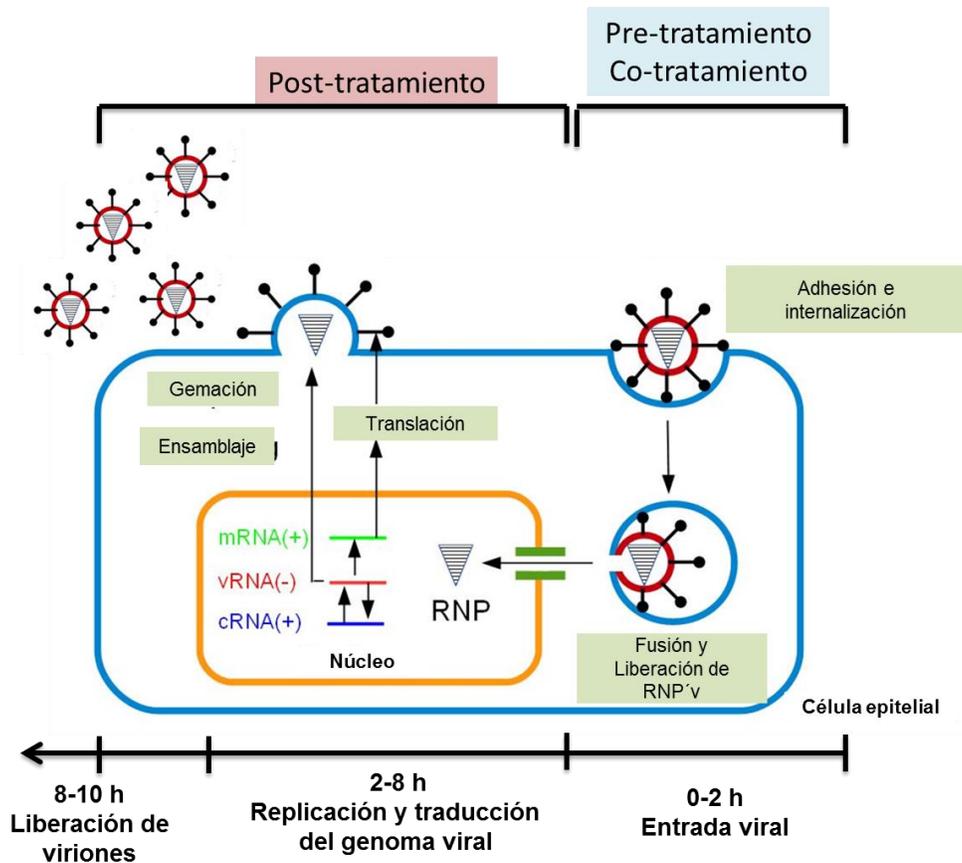


Figura 39 .Esquema general de las etapas del ciclo de vida del virus de la influenza y su detección mediante ensayos de tiempos de adición. En el pre-tratamiento y co-tratamiento se observa la inhibición de etapas relacionadas a la entrada viral como adsorción, internalización por endocitosis y fusión viral. Por otra parte, en el post-tratamiento se observa la inhibición de etapas posteriores a la infección, como replicación de ARN y liberación de progenie viral.

La actividad antiviral de cada compuesto evaluado se expresa como un índice de selectividad (IS) que es una relación entre la concentración citotóxica media (CC_{50}) y la concentración inhibitoria media (CI_{50}). En general, un $IS \geq 10$ es indicativo de una actividad antiviral promisorio. Los compuestos con actividad antiviral significativa pueden ser evaluados por ensayos directos y/o frente a otras cepas con el fin de determinar el espectro de actividad antiviral (Chattopadhyay *et al.*, 2009).

El ensayo en placa es uno de los métodos directos más fiables de titulación de partículas virales infecciosas en las muestras. La actividad antiviral del compuesto está relacionada

con la reducción de las unidades formadoras de placa (UFP) de virus en comparación con controles (Loregian *et al.*, 2014).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la actividad antiviral a nivel post-tratamiento de los compuestos antraquinónicos (I-IX) contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 utilizando las cepas A/Yucatán/2370/09 y A/México/InDRE797/10 susceptible y resistente a oseltamivir respectivamente.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

Para llevar a cabo los ensayos biológicos se utilizó un microscopio Invertido modelo TE2000-U (Nikon eclipse) y un lector de densidad óptica ELISA (Perkin Elmer) modelo Victor 2030.

Para el cultivo celular se utilizó medio mínimo esencial Eagle modificado por Dubelco (DMEM1X) marca Invitrogen, suero fetal bovino al 10 % (Invitrogen), L- glutamina 200 μ M (Sigma-Aldrich), bicarbonato de sodio al 7.5 %, antibióticos: penicilina y estreptomina (10,000 unidades/mL), solución de fosfatos PBS pH a 7.2 (Invitrogen); tripsina TPCK (Sigma-Aldrich), y solución de cristal violeta al 0.4 % en metanol (Sigma- Aldrich). Para los ensayos en placa se utilizó Medio Overlay.

3.2.2 LÍNEA CÉLULAR, VIRUS Y COMPUESTOS

Para realizar los ensayos antivirales se utilizó la línea celular de riñón canino Madin Darby (Madin-Darby Canine Kidney), así como la cepa viral de Influenza A/Yucatán/2370/09 (susceptible a oseltamivir) y la cepa A/México/InDRE797/10 (resistente a oseltamivir) proporcionado por el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”. Los bioensayos se realizaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.001 con la cepa susceptible y a una MOI= 0.01 con la cepa resistente. Adicionalmente, los virus se propagaron en células MDCK en presencia de tripsina (1 μ g/mL) y almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Se evaluaron nueve derivados antraquinónicos (compuestos I-IX), la glucosa tetraacetilada (X) y el control positivo carboxilato de oseltamivir (Roche). Se utilizó dimetil sulfóxido

(DMSO, Sigma –Aldrich) para la disolución de los compuestos orgánicos. Las alícuotas de los tratamientos no excedieron el 1 % de DMSO.

3.2.3 CRECIMIENTO DE CÉLULAS MDCK

Las células MDCK se sembraron en placas con capacidad celular de 2×10^7 células, en presencia de medio DMEM adicionado con antibióticos (penicilina-estreptomina) y HEPES 1M, L-glutamina al 1%, suero fetal bovino al 10 % y aminoácidos no esenciales al 1 %. Se incubaron a 37 °C y 5 % CO₂.

3.2.4 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Se sembraron las células MDCK en una placa de 96 pozos a una densidad celular de 1×10^5 células por pozo y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ por 24 h, lapso en el cual se observó más del 80 % de la confluencia de la monocapa celular. Posteriormente, las células se lavaron por duplicado con PBS estéril y se adicionó a cada pozo 100 µL de las diluciones de los compuestos en un rango entre 100 a 3.125 µM. Se incluyó un control de células sin tratamiento. Posteriormente, se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ por 72 h. Después del tiempo de incubación, se retiraron los inóculos y se adicionó 50 µL de cristal violeta al 0.4 % con metanol a cada pozo dejándose reposar por 30 min. Después las placas se lavaron con agua y se dejaron secar. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas Perkin-Elmer. El ensayo se realizó por triplicado.

Se determinó la viabilidad celular a partir de la relación proporcional entre la densidad óptica de las células tratadas con los compuestos y la densidad óptica de las células del control celular, el cual se tomó como el 100 % de las células viables. [%Viabilidad celular= $(DO_{\text{células tratadas}}/DO_{\text{control celular}}) \times 100$]. La concentración citotóxica media (CC₅₀) y la máxima concentración no citotóxica (MCNC) que se definen como la concentración del compuesto que reduce el número de células viables al 50 % y 10 % respectivamente, se obtuvo a partir de una curva de dosis-respuesta correlacionando la concentración de los compuestos contra el porcentaje de viabilidad celular.

El protocolo de ensayo de tinción con cristal violeta se basa en lo siguiente:

Las células de la monocapa unida a la placa de cultivo se despegan durante la muerte celular, esta característica puede ser utilizada para la cuantificación indirecta de células viables y determinar la citotoxicidad de los compuestos. El cristal violeta (cloruro de tris (4-dimetilamino) fenil metilo) es un colorante que se une a las proteínas y ADN de las células viables que se mantienen adheridas a la placa de cultivo, las células que sufren muerte celular pierden su adherencia y son eliminadas tras los lavados con PBS por lo tanto no se tiñen. Este protocolo es un método rápido y reproducible para la evaluación de la citotoxicidad de compuestos (Feoktistova et al., 2016 y Bonnekoh et al., 1989).

3.2.5 ENSAYO DE REDUCCIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO: POST-TRATAMIENTO

Se sembraron células MDCK en placas de 96 de pozos a una densidad de 1×10^5 células por pozo con medio DMEM y se incubaron a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂ por 24 h. Posteriormente, se removió el medio DMEM y se lavaron las células por duplicado con PBS estéril. Las células se infectaron con 50 µL de la dilución de virus y se incubaron por 1 h a 37 °C y 5 % CO₂. El medio fue removido y reemplazado por una mezcla de medio DMEM con el tratamiento a concentraciones de 100 a 3.12 µM y tripsina TPCK (200 µg/ml). La concentración inicial del compuesto se determinó con base a la MCNC previamente determinada. Se incubó por 72 h y al término de este tiempo se tiñeron las células con cristal violeta. Se incluyeron controles celulares y virales. El ensayo se realizó por triplicado.

El porcentaje de inhibición viral de los ensayos de reducción del efecto citopático se calculó por medio de la fórmula $[(A-B)/(C-B)] \times 100$ donde A es la densidad óptica (D.O) de las células tratadas con los compuestos, B es la DO del control del virus y C es la D.O del control celular. Se determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) la cual es definida como la concentración de un compuesto necesario para inhibir el 50 % de la replicación viral *in vitro* y se obtuvo por regresión lineal, adicionalmente a partir del cociente entre los valores de CC₅₀ e CI₅₀ se calculó el IS.

El ciclo de replicación del virus de la influenza es lítico, por lo que la liberación de la progenie de partículas virales provoca el redondeamiento y lisis de las células MDCK infectadas las cuales se despegan de la placa de cultivo. El cristal violeta se une a las proteínas y ADN de las células viables que se mantienen adheridas a la placa de cultivo, de esta forma, se

realiza la cuantificación indirecta de la infección viral y se determina el porcentaje de inhibición viral de los compuestos (Loregian *et al.*, 2014).

3.2.6 ENSAYO EN PLACA

Se sembraron células MDCK en placas de 12 de pozos a una densidad de 1×10^6 células por pozo con medio DMEM y se incubaron a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂ por 24 h. Posteriormente, se removió el medio DMEM y se hicieron lavados con PBS estéril. Se infectó con 200 µL de diluciones seriadas (1×10^{-1} - 1×10^{-6}) de la cosecha viral del post-tratamiento en medio DMEM, posteriormente se dejó en incubación por 1 h a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂. Después del tiempo de incubación, se desechó el sobrenadante y se adicionó medio Overlay en agar al 3 % y tripsina TPCK (2.5 µg/mL). Una vez gelificado el agar, se incubó por 72 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Al término de este tiempo se retiró el agar y se tiñó con cristal violeta por 30 min. Las unidades formadoras de placas (UFP/mL) se obtienen a partir de la fórmula: $UFP/mL = (\text{No. De placas}) \times (5) \times (\text{Dilución})$, a su vez, el porcentaje de inhibición de UFP es el resultado de: $[(\text{promedio del número de placas en el control}) - (\text{promedio del número de placas en la muestra})] \times 100 / \text{promedio del número de placas en el control}$. Se incluyó un control viral y un control positivo. El ensayo se realizó por triplicado.

3.2.7 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Se determinaron los valores de CC₅₀ e CI₅₀ por regresión lineal, así mismo los datos obtenidos del post-tratamiento y el ensayo en placa fueron analizados por el método estadístico ANOVA de una vía, se realizó el análisis múltiple Dunnet entre los tratamientos y el control viral.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad se define de forma general como los efectos adversos resultantes de la interferencia de estructuras y/o procesos esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o función, las células expuestas a un compuesto citotóxico pueden responder de diferentes maneras: a) por necrosis en la que pierden la integridad de la membrana resultando en lisis celular, b) por inhibición del crecimiento y división celular o c) por apoptosis, a partir de la activación de factores genéticos que programan la muerte celular (Zhang *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, fue necesario determinar previamente la máxima concentración no citotóxica (MCNC o CC₉₀) a la cual el compuesto no cause daño mayor al 10 % en la viabilidad celular evitando así falsos positivos en los ensayos de infección viral. En el cuadro 11 se muestra la actividad citotóxica en células MDCK de los compuestos I-IX, el compuesto X que es una molécula de glucosa tetraacetilada y del control positivo (carboxilato de oseltamivir). Los compuestos evaluados no mostraron citotoxicidad con valores de CC₅₀ >90 μ M.

Sin embargo, de acuerdo a los valores de MCNC se observó que los compuestos I, III y II son los más citotóxicos (Cuadro 11). El efecto citotóxico de los compuestos se observó como la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, pérdida de la confluencia de la monocapa por desprendimiento de células y vacuolización citoplasmática.

En la Figura 40 se representa estructuralmente los compuestos con mayor citotoxicidad y los no citotóxicos. Estos datos concuerdan con la literatura, ya que diversos estudios señalan que la toxicidad de las quinonas se debe principalmente a dos mecanismos (Rodríguez *et al.*, 2004):

- a) Actúan como electrófilos aceptores de Michael.
- b) Participan en reacciones redox catalizadas por flavoenzimas.

En las reacciones de adición de Michael el sistema α,β insaturado de la quinona actúa como electrófilo y puede unirse a nucleófilos esenciales en la célula como son los grupos tiol de

las proteínas, interfiriendo con los procesos normales de supervivencia celular. Sin embargo, los derivados de antraquinona por lo general no son susceptibles a reacciones de adición de Michael debido a que las posiciones α - y β - de la quinona son bloqueadas por dos anillos de benceno (Malik *et al.*, 2016). Por lo tanto, para este estudio, se sugiere que el principal mecanismo de citotoxicidad de los compuestos I, II y III podría ser través del ciclo redox de antraquinonas (Figura 41). Este proceso conlleva a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($OH\cdot$) los cuales son responsables de ruptura de cadenas de ADN y la destrucción de los lípidos insaturados, proteínas y otras macromoléculas vitales causando daño celular (Malik *et al.*, 2016).

Cuadro 11. Efecto citotóxico y antiviral en células MDCK contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09 en el ensayo de post-tratamiento de los compuestos I-X. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres réplicas independientes.

Compuesto	Citotoxicidad (μM)		Actividad anti-influenza			
	^a CC ₅₀	^b MCNC	^c CI ₅₀ (μM) A/Yucatán/ 2370/09	^d IS	CI ₅₀ (μM) A/México/ InDRE797/10	IS
I	94.08 \pm 7.43	32.4 \pm 1.72	^e NA	^f ND	NA	^f ND
II	>100	40.31 \pm 2.62	62.31 \pm 3.05	1.6	NA	^f ND
III	>100	37.59 \pm 6.06	NA	^f ND	NA	^f ND
IV	>100	>100	58.05 \pm 1.34	1.72	NA	^f ND
V	>100	>100	NA	^f ND	NA	^f ND
VI	>100	>100	NA	^f ND	NA	^f ND
VII	>100	>100	23.11 \pm 2.06	4.32	62.28 \pm 2.65	1.60
VIII	>100	>100	NA	^f ND	NA	^f ND
IX	>100	>100	9.28 \pm 2.27	10.77	19.47 \pm 0.93	5.14
X	>100	>100	NA	^f ND	NA	^f ND
CO	>100	>100	25.3 nM \pm 0.58	3.95	NA	^f ND

^aCC₅₀: Concentración citotóxica media, ^bMCNC: Máxima concentración no citotóxica, ^cCI₅₀: Concentración inhibitoria media, ^dIS: Índice de selectividad, ^eNA: No activo, ^fND: No determinado.

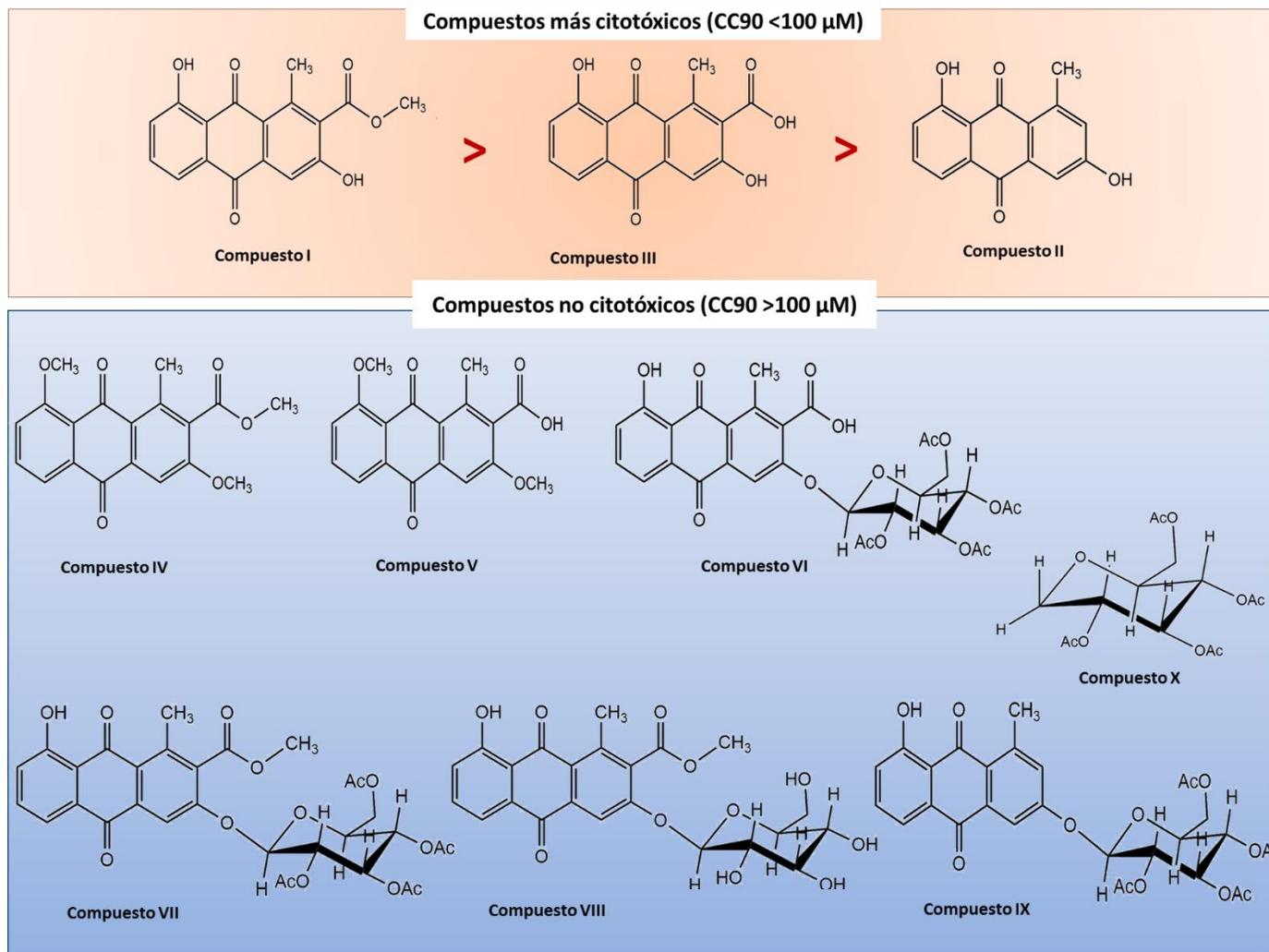


Figura 40. Compuestos citotóxicos y no citotóxicos con respecto a su CC₉₀ (MCNC) evaluados en células MDCK.

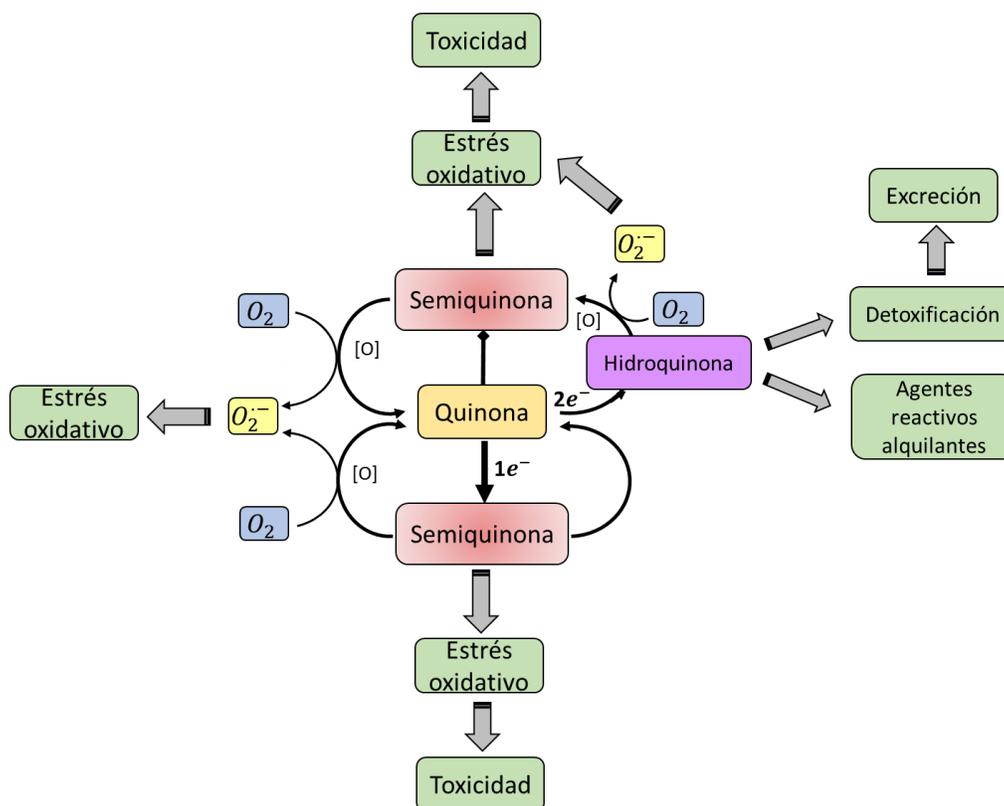


Figura 41. Mecanismo general del ciclo redox de quinonas (Malik *et al.*, 2016). La semiquinona formada como producto de la reducción por un electrón, bajo condiciones aeróbicas se oxida rápidamente transfiriendo el electrón adicional al oxígeno molecular produciendo el radical anión super óxido ($O_2^{\cdot-}$) y generando su respectiva quinona, la formación de radical anión superóxido desencadena una cascada de reacciones resultando en estrés oxidativo y citotoxicidad celular. La inestabilidad de la semiquinona también puede ocasionar estrés oxidativo. Por otra parte, en las reacciones redox catalizadas por enzimas que transportan dos electrones, se producen hidroxiquinonas que pueden excretarse o formar agentes reactivos alquilantes que causen daño celular.

El potencial de reducción óptimo para que una antraquinona participe en el ciclo redox es entre -0.27 y -0.16 V. La 9,10 Antraquinona (9-10-AQ) es la estructura más simple y sin grupos sustituyentes en los anillos bencénicos de esta clase de compuestos quinónicos, el potencial de reducción de la 9-10 AQ es de $E^\circ = -0.390$ V siendo demasiado bajo para permitir la transferencia de un electrón, por lo que la reducción de esta molécula resulta difícil (Rodríguez *et al.*, 2014, Takkis *et al.*, 2009). Por otro lado, esta antraquinona es un

deficiente/pobre aceptor de Michael, por lo que en base a estos argumentos la 9, 10 –AQ no muestra citotoxicidad asociada con el ciclo redox o el mecanismo electrofílico. En relación a esto, en un estudio se determinó la nula toxicidad *in vitro* de la 9-10 –AQ a concentraciones mayores de 100 μM en células de *Sacharomyces cerevisiae*, justificando su poca toxicidad con las bases teóricas ya mencionadas (Rodríguez y col, 2014).

Los grupos funcionales tienen efecto electrónico en el potencial de redox de antraquinonas. En un estudio se evaluó el potencial redox de 50 derivados antraquinónicos con diferentes grupos sustituyentes electrodonadores y electroextractores. De forma general, se concluyó que las sustituciones de grupos metilos (electrodonadores) disminuyen el potencial de reducción de la AQ siendo proporcional al número de sustituyentes metilo, así mismo se observó que la posición de los grupos metilo no tienen influencia en el potencial redox. La disminución del potencial de reducción de los derivados metilados de AQ puede deberse a la poca afinidad del electrón en la quinona metilada. Esto nos permite sugerir que la citotoxicidad de los derivados semisintetizados no es influenciada por el grupo metilo en posición C1, por lo que el efecto tóxico de los compuestos I, II y III está correlacionado a los otros grupos sustituyentes. Por otra parte, los sustituyentes metoxilos no tuvieron un cambio significativo en el potencial redox comparada con la antraquinona no sustituida (9,10-AQ). Estos argumentos se relacionan con la respuesta no citotóxica de los derivados antraquinónicos IV y V. Contrario a los grupos electroextractores como ceto ($\text{C}=\text{O}$), ácido carboxílico (COOH) y éster (COOCH_3) que contribuyen a aumentar el potencial de reducción de la AQ. Otros reportes sugieren que las sustituciones de grupos ésteres tienden a aumentar más el potencial de reducción en comparación con los grupos carboxilos. Así mismo estos datos se relacionan con la mayor respuesta citotóxica del compuesto I en comparación con el compuesto III (Bachman *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2008).

Varios estudios sostienen que la introducción de grupos hidroxilo en posiciones 1, 4, 5 y 8-OH consideradas como posiciones α en la estructura de la AQ, estabilizan los correspondientes productos de reducción, radical semiquinona ($\text{Q}^{\bullet-}$) y quinona dianión (Q^{2-}) por enlaces de hidrógeno entre los oxígenos quinónicos y los sustituyentes –OH, incrementando así el potencial de reducción. En un estudio donde se evaluó la citotoxicidad de nueve compuestos antraquinónicos aislados de *Morinda parvifolia*, se encontró que las antraquinonas con mayor número de sustituyentes OH en posición alfa fueron las más

citotóxicas. En relación a esto, se puede sugerir que los sustituyentes OH en los derivados antraquinónicos sintetizados pueden aumentar la citotoxicidad como se observó con el compuesto II (Kang, J. *et al.*, 2016; Guin *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 1999).

Adicionalmente se observó que los compuestos VII y VIII que son glucósidos del compuesto I y los compuestos VI y IX que son glucósidos de los compuestos III y II respectivamente no son citotóxicos, esto concuerda con lo reportado por Frackowiak y cols donde se concluyó que la glucosilación de antraquinonas puede reducir el efecto citotóxico de la aglicona (Frackowiak, A *et al.*, 2010).

Con base en lo anteriormente descrito, se pudo correlacionar que el aumento en el potencial redox de la estructura básica de la antraquinona (9,10-AQ) a partir de sustituyentes –COOH, –COOCH₃, y –OH aumenta la probabilidad de transferencia de electrón haciendo al derivado antraquinónico participe en el proceso redox biológico y por consecuencia desencadenando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) responsable de la citotoxicidad celular, esto sugiere la razón del porqué los derivados I, II, III fueron más citotóxicos en comparación con los demás derivados (compuestos IV-IX).

3.3.2 ACTIVIDAD ANTIVIRAL

La actividad antiviral de los compuestos antraquinónicos fue evaluado por ensayos de reducción del efecto citopático (REC) a nivel post-tratamiento, en el cual las células MDCK se incubaron con el virus A/Yucatán/2370/09 a una MOI =0.001 y con la cepa resistente A/México/InDRE797/10 a una MOI=0.01 durante 1 h a 37 °C. Bajo estas condiciones de tiempo y temperatura se favoreció la adhesión e internalización del virus a las células, por lo que, el tratamiento posterior a este paso permite inducir de forma general si el compuesto puede inhibir etapas posteriores a la adsorción viral, tales como replicación/traducción, o liberación viral (Kwon *et al.*, 2010).

Se observó que los compuestos II, IV, VII, y IX disminuyeron significativamente la replicación viral con respecto al control viral en la cepa A/Yucatán/2370/09 a CI₅₀ de 62.31, 58.05, 23.11 y 9.28 µM respectivamente (Figura 42). Por otro lado, los compuestos VII y IX tuvieron una actividad antiviral significativa con IC₅₀ de 62.28 y 19.47 µM respectivamente contra la cepa resistente A/México/InDRE797/10 (Figura 43). El compuesto IX fue el más

activo tanto en la cepa susceptible como en la cepa resistente. Resulta interesante señalar que los compuestos VII y IX fueron menos activos contra la cepa resistente A/México/InDRE797/10. Por otro lado, los compuestos II y IV que mostraron cierta actividad contra la cepa susceptible A/Yucatán/2370/09 no resultaron activos contra la cepa resistente.

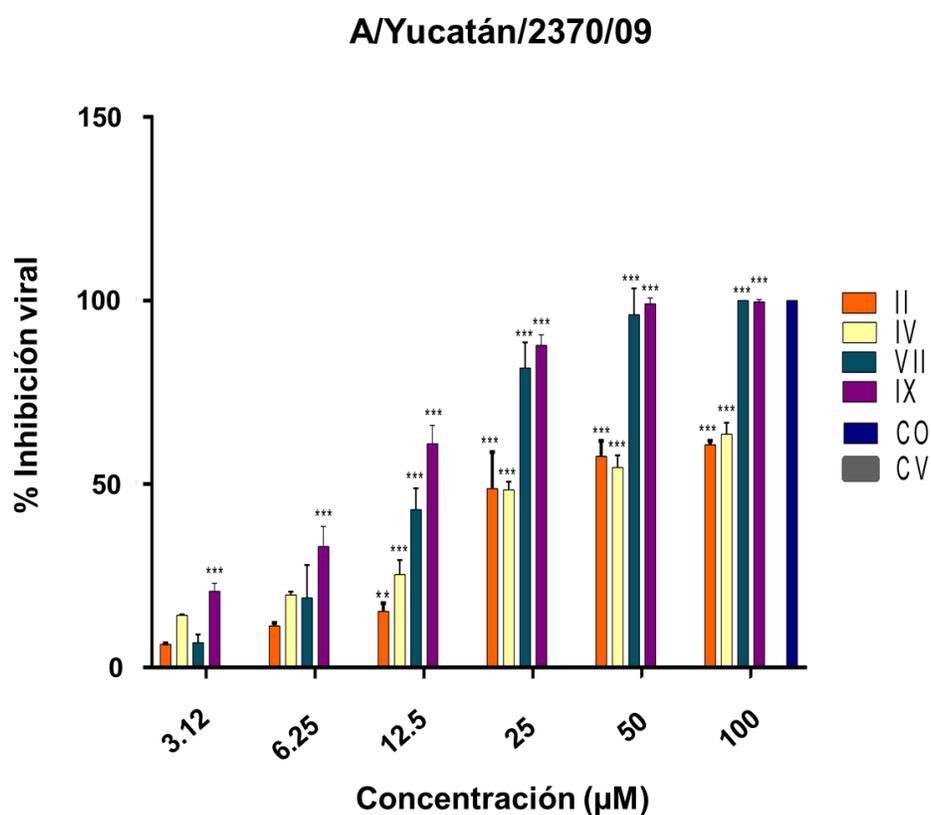


Figura 42. Efecto en el rendimiento viral del virus A/Yucatán/2370/09 (H1N1)pdm tratados con el compuesto II, IV, VII, IX y el carboxilato de oseltamivir (CO) después de 72 horas de incubación en el ensayo de post-tratamiento. Los valores de inhibición viral representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia significativa entre los compuestos evaluados y el control viral (CV) *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

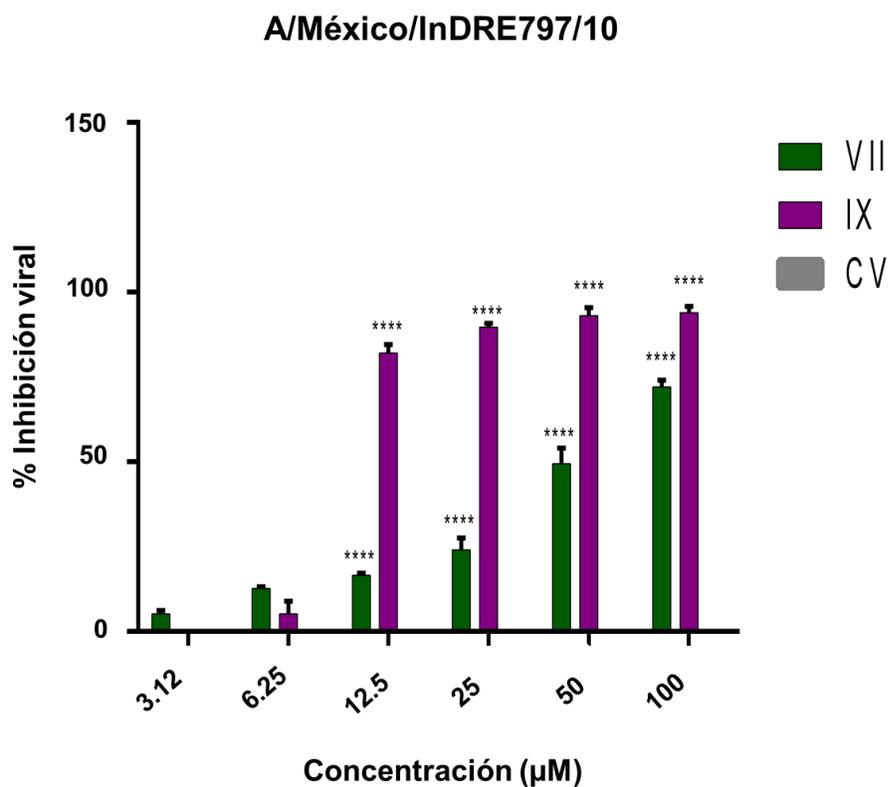


Figura 43. Efecto en el rendimiento viral del virus A/México/InDRE797 tratados con los compuestos VII, IX y el carboxilato de oseltamivir (CO) después de 72 horas de incubación en el ensayo de post-tratamiento. Los valores de inhibición viral representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia significativa entre los compuestos evaluados y el control viral (CV) **** $p < 0.0001$.

Los compuestos más activos VII y IX se evaluaron por ensayo en placa para confirmar el efecto antiviral contra la cepa susceptible. En este método, se titularon partículas infecciosas de las muestras de cosechas virales obtenidas directamente del post-tratamiento. (Figura 44).

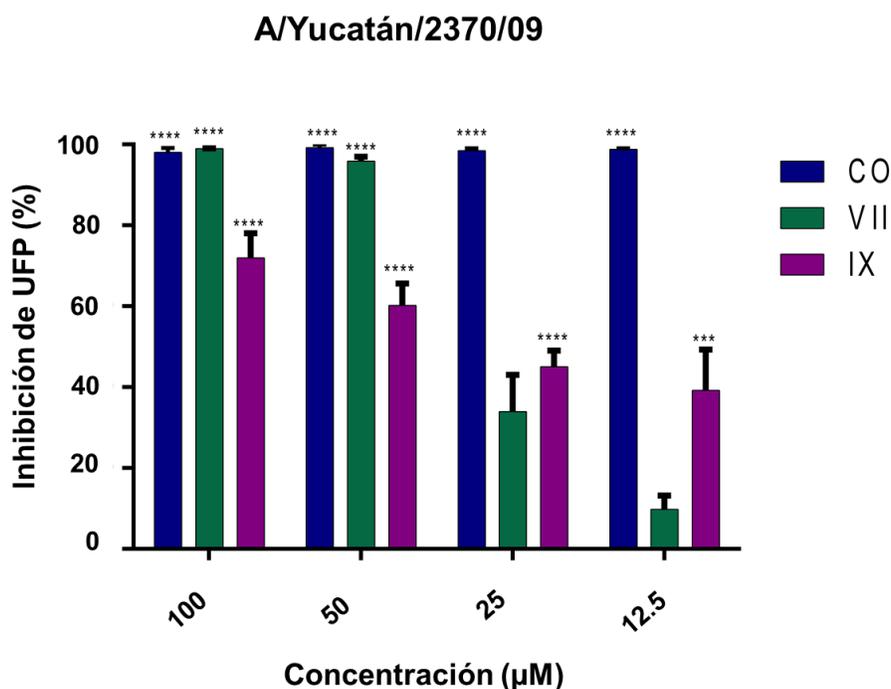


Figura 44. Efecto en el rendimiento viral del virus A/Yucatán/2370/09 (H1N1) pdm tratados con el compuesto VII, IX y el carboxilato de oseltamivir (CO) después de 72 horas de incubación. Los valores del porcentaje de inhibición de UFP (%) representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco representa la diferencia significativa entre los compuestos evaluados y el control viral *** $p < 0.001$.

Como se observa en la figura 44 el comportamiento del compuesto VII es dosis-respuesta, el cual redujo significativamente el título viral a las concentraciones de 100 y 50 μM , sin embargo la actividad antiviral disminuyó drásticamente a las concentraciones más bajas evaluadas. Por otra parte, el compuesto IX también tuvo un comportamiento dosis-respuesta, la actividad antiviral se mantuvo en un rango entre 30-70 % y resultó ser menos activo que el compuesto VII.

Adicionalmente para evaluar la actividad anti-NA del compuesto VII, se realizó un ensayo de inhibición de NA utilizando el kit NA-Star, sin embargo, debido a la pobre solubilidad del compuesto en la solución amortiguadora de pH del ensayo, el experimento no pudo realizarse exitosamente (datos no mostrados), por lo tanto con base en los resultados sólo pudo sugerirse que el compuesto VII tiene actividad antiviral significativa y posiblemente

inhibe alguna etapa posterior a la infección viral como lo sugiere el ensayo de post-tratamiento.

Por otro lado, el compuesto IX mostró menor tendencia a reducir el título viral en comparación con el compuesto VII y el CO, sin embargo, a todas las concentraciones evaluadas el compuesto tuvo actividad antiviral significativa. Estos resultados conllevan a deducir que el compuesto IX tiene un efecto parcial en la inhibición post-infección. Esta afirmación también tiene soporte al no observarse correlación directa entre la reducción del efecto citopático y la reducción del número de unidades formadoras de placas (UFP). Pudiese ser que el compuesto presente por 72 h en el medio celular del ensayo de post-tratamiento en algún momento interaccione con la superficie celular o el virus limitando la adsorción o entrada viral en etapas secundarias de infección. De esta forma, se sugiere que el efecto antiviral observado en el pos-tratamiento puede ser el resultado del modo de acción del compuesto VII a nivel pre y post-infección.

Con respecto al análisis de la relación estructura actividad de los compuestos antraquinónicos evaluados en el ensayo de post-tratamiento, se tienen los siguientes señalamientos:

- a) El residuo de glucosa tetraacetilada en posición C-3 de los compuestos VII y IX tiene un rol importante en la actividad antiviral.
- b) La glucosa tetraacetilada (compuesto X) por sí misma no tiene efecto anti-influenza lo cual sugiere que la unión O-glucosídica con la antraquinona es importante en la actividad antiviral.
- c) Entre los derivados glucosilados, las propiedades lipofílicas de las moléculas parecen afectar la actividad antiviral ya que el compuesto polar VIII que expone un residuo de glucosa (con los grupos OH no acetilados) no es activo, en contraste con los compuestos tetraacetilglucosilados VII y IX, en donde el compuesto IX es el más lipófilico y activo entre ambos.

d) Entre los derivados antraquinónicos no glucosilados, el aumento en la lipofilidad de los compuestos parece incrementar la actividad antiviral, ya que solo los compuestos más hidrofóbicos II y IV fueron activos contra la cepa susceptible.

Una probable explicación al modo de acción observado de los compuestos VII y IX puede deberse a la similitud estructural entre el residuo de glucosa tetraacetilada que es una piranosa y el receptor ácido siálico lo cual pudiese contribuir a aumentar la interacción de los compuestos con la HA y la sialidasa viral NA comprometiendo su actividad antiviral a nivel pre y post-infección (Nishikawa *et al*, 2012).

Por otro lado, en la literatura se ha reportado que las antraquinonas pueden actuar en etapas pre-infección interfiriendo con la integridad de la membrana plasmática de virus envueltos como el virus de la Influenza A (Sydiskis, *et al.*, 1991). Así mismo, se ha reportado su actividad como inmunomoduladores, estimulando al sistema inmune y limitando la replicación viral.

En un trabajo realizado por Uddin y cols (2016) se reportó la bioactividad de antraquinonas O-glucosiladas como inhibidores potentes de neuraminidasa bacteriana (NAB) las cuales resultaron ser más activas que sus correspondientes agliconas. Los resultados de este estudio permiten sugerir la posible actividad de antraquinonas O-glucosiladas como inhibidores de NA viral (Nishikawa *et al*, 2012).

Actualmente, los estudios de antraquinonas glicosiladas con actividad antiinfluenza son limitados, sin embargo, de forma general se han reportado una amplia variedad de compuestos glicosilados con actividad antiviral, entre ellos, el lignano (+)-pinoresinol 4-O-[6''-O-vanilloil]- β -D-glucopiranoside mostró actividad antiviral significativa contra el virus de la influenza A H1N1 inhibiendo la exportación nuclear de RNP virales (Parhira *et al*, 2014). Así también, el flavonoide glicosilado quercetina-7-O-glucósido es activo contra los virus de la influenza A y B a través de la inhibición de la RNA polimerasa viral (Gansukh *et al*, 2016).

Diversos reportes sugieren el amplio espectro bioactivo de moléculas glicosiladas por lo tanto resulta importante la evaluación de glucósidos novedosos como el compuesto VII y IX contra patógenos que representen un problema de salud público como el virus de la influenza A.

3.4. CONCLUSIONES

Las compuestos antraquinónicos evaluados no tuvieron respuesta citotóxica significativa en células MDCK. De acuerdo a la MCNC los compuestos I, II y III fueron los más citotóxicos.

En relación al análisis de estructura-actividad se sugiere que los sustituyentes con grupos electrostractores carboxilo y éster, así como hidroxilos en posición alfa contribuyen a aumentar el potencial redox de los derivados antraquinónicos aumentando su citotoxicidad. Por lo que es probable que el mecanismo de acción citotóxico sea por la generación de especies reactivas de oxígeno a partir del ciclo redox. Los derivados O-glucosilados resultaron ser menos citotóxicos que su correspondiente agliconas.

Los compuestos O-acetilglucosilados VII y IX fueron los más activos contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09. El compuesto IX fue el más activo contra la cepa susceptible y resistente a oseltamivir. Se sugiere que el sustituyente acetilglucosa en la posición C-3 de la antraquinona tiene un rol importante en la actividad antiviral.

Los resultados obtenidos del ensayo en placa contra la cepa susceptible A/Yucatán/2370/09 sugieren que estos derivados pueden actuar en etapas de pre y pos-infección, sin embargo, sería necesario realizar más pruebas biológicas para determinar el modo de acción de los compuestos VII y IX.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Con base en los resultados obtenidos se encontró que la modificación estructural de los compuestos antraquinónicos I y II tiene un efecto en su actividad biológica. En el caso de la citotoxicidad, de acuerdo con los valores de máxima concentración no citotóxica se observó que los derivados con grupos ésteres, ácidos carboxílicos y grupos hidroxilo resultaron ser más citotóxicos que sus análogos metoxilados y O-glucosilados, esto indica que la sustitución de ciertos grupos funcionales en el núcleo antraquinónico puede aumentar o disminuir la actividad citotóxica de un compuesto.

Por otro lado, en los ensayos antivirales se observó que los derivados O-tetraacetil glucosilados (Compuestos VII y IX) fueron significativamente activos contra las cepas A/Yucatán/2370/09 y A/México/InDRE797/10 susceptible y resistente a oseltamivir respectivamente, esto permite sugerir que el residuo tetraacetilglucosídico tiene un rol importante en la actividad antiviral.

La gran mayoría de estudios antivirales de compuestos antraquinónicos han sido evaluados contra el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), citomegalovirus (CMV), y virus de la polio (PV), con menos frecuencia se hallan estudios contra virus respiratorios como el virus de la influenza. Pese a esto, se ha evidenciado la actividad antiviral de antraquinonas aisladas de la corteza de *Morida citrifolia* y derivados hidroantraquinónicos aislados del hongo endófito *Nigrospora sp* contra influenza A (H1N1) y H3N2 (Shih-Wen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Por otra parte algunos estudios han determinado el posible modo de acción de las antraquinonas mediante su interacción con la membrana plasmática del virus. También se han relacionado con la capacidad de inducir a la expresión de genes IFN- β , IFN- γ , PKR en células infectadas los cuales son proteínas del sistema inmune que interfieren en la replicación viral; y se ha sugerido la posibilidad de actuar como inhibidores de la NA (Shih-Wen *et al.*, 2014; Sydiski *et al.*, 1991, Uddin *et al.*, 2016).

Se sugiere que la similitud estructural entre el receptor ácido siálico y el residuo tetraacetilglucosídico de los compuestos VII y IX puede estar relacionado con su actividad antiviral, posiblemente a nivel pre y post-infección, debido a que ambas moléculas tienen un núcleo estructural ciclohexano oxigenado (Itzstein, 2012).

También resulta interesante señalar que la glucosa tetraacetilada (compuesto X) por sí misma es inactiva, sólo en unión con la antraquinona presenta actividad antiviral, esto permite sugerir que la estructura antraquinónica pudiese presentar de interacciones hidrofóbicas con la diana molecular sobre la que esté actuado. Sin embargo, se necesitan más estudios que provean evidencia científica.

En el ensayo en placa, el compuesto VII inhibió más del 90% del título viral a las concentraciones más altas evaluadas en el post-tratamiento lo cual podría deberse a un posible modo de acción a nivel post-infección, a su vez, el compuesto IX solo inhibió parcialmente el título viral en un rango del 30 al 70 % en todas concentraciones evaluadas, por lo tanto cabe la posibilidad que este compuesto interactúe en otras etapas del ciclo de replicación, probablemente a nivel pre-infección. Sin embargo, para determinar el modo de acción de los compuestos VI y IX es necesario una serie de ensayos más específicos y complementarios. No obstante, en este estudio se evidenció la actividad anti-influenza moderada *in vitro* de derivados antraquinónicos O-glucosilados novedosos, contribuyendo al conocimiento de bioactividad antiviral de antraquinonas, cuyos registros en literatura son escasos.

Basándose en los resultados obtenidos existe evidencia suficiente para aceptar la hipótesis de investigación debido a que los compuestos II, IV, VII y IX presentaron actividad anti-influenza contra la cepa A/Yucatán/2370/09 susceptible a oseltamivir, mientras que los compuestos VII y IX mostraron ser más activos contra la cepa resistente A/México/InDRE797/10. Por lo que, las modificaciones estructurales de Aloesaponarina I y II a partir de reacciones de metilación, hidrólisis y O-glucosilación tiene efecto en la actividad contra el virus de la influenza A(H1N1)pdm09

4.2 CONCLUSIÓN GENERAL

Se aislaron los compuestos I y II a partir de las raíces de *Aloe vera* y llevaron a cabo sus modificaciones estructurales obteniendo cinco derivados hidroxilados, metoxilados y O-glucosilados (compuestos III-VI y IX). Los compuestos VII y VIII se proporcionaron por el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Se semisintetizaron dos productos novedosos: ácido-8-hidroxi-3-O-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-1-metil-9,10-dioxo-9,10-dihidro-2-antraceno carboxílico (compuesto VI) y 8-hidroxi-3-O-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil-1-metil-9,10-antraquinona (compuesto IX)

Los derivados antraquinónicos no tuvieron una citotoxicidad significativa en células MDCK, de acuerdo a la máxima concentración no citotóxica se observó que los compuestos I, II y III fueron los más citotóxicos.

Los compuestos VII y IX fueron significativamente activos contra el virus de influenza A(H1N1)pdm09. Estos compuestos fueron más activos contra la cepa A/Yucatán/2370/09 susceptible a oseltamivir en comparación contra la cepa resistente A/InDRE797/México/10. Se sugiere que el compuesto VII tiene actividad antiviral a nivel post-infección y que el compuesto IX pudiese actuar en etapas de pre y post-infección.

4.3 PERSPECTIVAS

Los compuestos VI, VII, VIII y IX que son compuestos novedosos deben ser evaluados por otras técnicas espectroscópicas y espectrométricas o por difracción de rayos X para determinar la configuración estructural absoluta.

Realizar otras modificaciones químicas en el núcleo estructural de la antraquinona que impliquen diglucosilaciones, sustituciones con aminoazúcares como glucosaminas y modificaciones en el anillo de la piranososa con el fin de potenciar la actividad antiviral.

Realizar ensayos antivirales que permitan deducir el modo de acción de los compuestos novedosos VII y IX así como evaluar contra otros subtipos de virus de influenza A e influenza B para determinar el espectro de acción.

ANEXOS

Anexo I .Datos espectroscópicos del HSQC del compuesto VI.

Posición	H δ (ppm)	C δ (ppm)	Posición	H δ (ppm)	C δ (ppm)
4	7.77	114.67	2'	5.32	69.86
5	7.76	118.84	3'	4.35	61.19
6	7.63	135.8	4'	4.20	61.24
7	7.30	125.00	5'	3.98	72.98
11	2.89	29.68	6'	5.33	72.45
1'	6.06	92.86	2'', 3'', 4'' y 6''-CH ₃ *	2.07, 2.07, 2.04 y 2.04	20.61, 20,61, 20.59 y 20.59

Anexo II. Datos espectroscópicos del HMBC del compuesto VI.

Posición	H δ (ppm)	HMBC (¹ H- ¹³ C)	
		² J _{CH}	³ J _{CH}
4	7.78	–	C8b, C2
5	7.76	–	C8a, C7
6	7.61	C5	C4b, C8
7	7.31	–	C8a
8-OH	12.85	C8	C7, C8a
11	2.90	C1	C2, C8b
1'	6.05		C3
2'	5.31	C1'	
3'	4.33		3'-OAc
4'	4.18	C5'	C6'
2'', 3'', 4'' y 6''-CH ₃ *	2.08	2', 3', 4' y 6'-OAc	

Anexo III. Datos espectroscópicos del HSQC del compuesto IX.

Posición	H δ (ppm)	C δ (ppm)	Posición	H δ (ppm)	C δ (ppm)
2	7.17	126.27	2'	5.37	75.45
4	7.80	118.86	3'	5.36	70.86
5	7.32	124.76	4'	5.19	68.02
6	7.64	135.84	5'	4.05	72.49
7	7.79	111.76	6'	4.26	61.84
11	2.86	23.89	2'', 3'', 4'' y 6''-CH ₃ *	5.33	72.45
1'	5.36	97.49			

Anexo IV. Datos espectroscópicos del HMBC del compuesto IX

Posición	H δ (ppm)	HMBC (¹ H- ¹³ C)	
		² J _{CH}	³ J _{CH}
2	7.17	C3	C4, C11
4	7.77	C3	C10, C2
5	7.32	–	C7, C8a
6	7.64	–	C4b, C8
7	7.75	–	C5, C8a
8-OH	12.92	C8	C8a
11	2.86	C1	C2
1'	5.36	C2'	C3
2'	5.36	C3'	–
3'	5.36	C4'	3'-OAc
4'	5.19	C3', C5'	C2'
5'	4.05	C6'	C1'
6'	4.26	C5'	C4, 6'-OAc
2'', 3'', 4'' y 6''-CH ₃ *	2.07	2', 3', 4' y 6'-OAc	–

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelmohsen, U., C. Cheng, C. Viagelmann, T. Zhang, T. Grkovic, S. Ahmed, R. Quinn, U. Hentschel y R. Edrada-Ebel (2014). Dereplication Strategies for Targeted Isolation of New Antitrypanosomal Actinosporins A and B from a Marine Sponge Associated-*Actinokineospora* sp. EG49, *Marine Drugs*, 12, 1220-1244.
- Abdessemed, D y A. Dibi (2013). Secondary metabolite from *Gladiolus segetum*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5, 939-941.
- Ahlawat, K., B. Khatkar (2011). Processing, food applications and safety of *aloe vera* products: a review. *Journal of food science and technology*, 48, 525-533.
- Álvarez, L., M. López y A. Moreno (2012). *Aloe vera* (Sábila): cultivo y utilización, Ediciones Mundi-Prensa, 49-65.
- Amoo, S., A. Aremu y J. Van Staden (2012). *In vitro* plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111, 345-358.
- Arias, C., M. Escalera-Zamudio y M. Soto-Del Río. (2009). Molecular Anatomy of 2009 Influenza Virus A (H1N1). *Archives of Medical Research*, 40, 643-654.
- Bachman, J., L. Curtis y R. Assary (2014). Investigation of the redox chemistry of anthraquinone derivatives using density functional theory, *Journal Physical Chemistry A*, 118, 8852-8860.
- Bartel, P., C. Zhu, S. Jays, I. Lampel, C. Donald, C. Neal, W. Strohl y Beale (1990). Biosynthesis of Anthraquinones by Interspecies Cloning of Actinorhodin Biosynthesis Genes in *Streptomyces*: Clarification of Actinorhodin Gene Functions. *Journal of Bacteriology*, 11, 4816-4826.
- Bermudez, A., M. Oliveira y Velazquez, D (2005). La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 30: 453-459.

- Bernini, R., F. Crisante y M. Ginnasi (2011). A convenient and safe O-methylation of flavonoids with dimethyl carbonate (DMC). *Molecules*, 16, 1418-1425.
- Betancourt, M. y P. Kuri (2010). Situación actual de la influenza A(H1N1) en el mundo. *Gaceta médica de México*, 146, 137-140.
- Beyleveld, G., K. With, J. Ayllon y L. Megan (2013). New-generation screening assays for the detection of anti-influenza compounds targeting viral and host functions. *Antiviral Reserch*, 100, 120-132.
- Bonnekoh, B., A. Wevers, F. Jugert, H. Merk y G. Mahrle (1989). *Archives of Dermatological Research*, 281, 487-90.
- Calixto, J. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 131–134.
- Cao, Y., D. Rabinowitz, D. Dixon y T. Netzel (2009). Synthesis, Electrochemistry, and Hydrolysis of Anthraquinone Derivatives. *Synthetic Communications*, 39, 4230-4238.
- CDC Centros para el control y prevención de las enfermedades, 2014. Medicamentos antivirales para la influenza: resumen para médicos clínicos. [Online] (Actualizado 3 Noviembre 2016).
- Disponible en: <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>
- [Acceso 18 Noviembre 2016].
- Chang, L., S. Shin-Ru, P. Shao., D. Huang y L. Huang (2009). Novel Swine-origin Influenza Virus A (H1N1): The First Pandemic of the 21st Century. *Journal of the Formosan Medical Association*, 108, 526-532.
- Chattopadhyay, D., M. Sarkar, T. Chatterjee, R. Sharma, P. Bag, S. Chakraborti y M. Khan (2009). Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. *New Biotechnoly*, 25, 347-368.

- Chen, W., B. Van Wyk, I. Vermaak y A. Viljoen (2012). Cape aloes—A review of the phytochemistry, pharmacology and commercialisation of *Aloe ferox*. *Phytochemistry Letters*, 5, 1-12.
- Chien, S., Y. Wu, Z. Chen y W. Yang (2015). Naturally occurring anthraquinones: chemistry and therapeutic potential in autoimmune diabetes. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 17, 357-365.
- Chinchilla, N., C. Carrera, A. Durán, M. Macías, A. Tores y F. Macías (2013). *Aloe barbadensis*: how a miraculous plant becomes reality. *Phytochemistry Reviews*, 12, 581–602.
- Clancy, S. (2008) Genetics of the influenza virus. *Nature Education*, 1, 83-87.
- Collí, P. (2014). Estudio de los compuestos fenólicos presentes en las raíces de *Aloe vera* para su potencial aplicación como colorantes y agentes antimicrobianos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán. México. pp. 8-10, 46-69.
- Crisci, E., T. Mussáa, L. Fraile y M. Montoya (2013). Review: Influenza virus in pigs. *Molecular Immunology*, 55, 200- 211.
- Cui, H., K. Shaaban, S. Qin (2006). Two Anthraquinone Compounds from a Marine *Actinomyce*te Isolate M097 Isolated from *Jiaozhou Bay*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1377-1379.
- Ding, Y., J. Dou, Z. Teng, T. Wang, N. Lu, H. Wang y C. Zhou (2014). Antiviral activity of baicalin against influenza A (H1N1/H3N2) virus in cell culture and in mice and its inhibition of neuraminidase. *Archives of Virology*, 159, 3269-3278.
- El-Fattah, H. (1997). Chemistry of *Asphodelus fistulosus*. *International Journal of Pharmacognosy*, 35, 274-277.
- Feoktistova, M., P. Geserick y M. Leverkus. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells (2016). *Cold spring harbor protocols*, 1, 343-346.

- Fiore, A., A. Fry, D. Shay, L. Gubareve, J. Bresse y T. Uyeki (2011). Antiviral Agents for the Treatment and Chemoprophylaxis of Influenza. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60, 1-25.
- Frackowiak, A., P. Skibinski, W. Gawel, E. Czarny y R. Gancarz (2010). Synthesis of glycoside derivatives of hydroxyanthraquinone with ability to dissolve and inhibit formation of crystals of calcium oxalate. Potential compounds in kidney stone therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 1001-1017.
- Gansukh, E., Z. Kazibwe, M. Pandurangan, G. Judy y D. Kim (2016). Probing the impact of quercetin-7-O-glucoside on influenza virus replication influence. *Phytomedicine*, 23, 958-967.
- Gantait, S., U. Sinniah y P. Das (2014). *Aloe vera*: a review update on advancement of in vitro culture. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B- Soil & Plant Science*, 64, 1-12.
- Gatherer, D. (2009). The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *Journal of Clinical Virology*, 45, 174-178.
- Gessler, N y A. Egorova y T. Belozeraia (2013). Fungal anthraquinones. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49, 109-123.
- Girarda, M., J. Tamb, O. Assossou y M. Kieny (2010). The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*, 28, 4895–4902.
- Gramer, M. (2005). Defining swine influenza virus. *Journal of Swine Health and Production*, 13, 157-160.
- Grienke, U., M. Schmidtke, S. Grafenstein, J. Kirchmair, K. Liedl y J. Rollinger (2012). Influenza neuraminidase: a druggable tarjet for natural products. *Natural Products Reports*, 29, 11-36.
- Gouvea, D., L. Gobbo y N. Lopes (2012). The influence of biotic and abiotic factors on the production of secondary metabolites in medicinal plants, en: *Plant Bioactives and*

- Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives, Cechinel, F. John Wiley & Sons. pp. 419-422.
- Goverdina, C., H. Deeksen, M. Naayer, T. Beek, A. Capelle, I. Haaskman, H. Doren y A. Groot (2013). Chemical and enzymatic hydrolysis of anthraquinones glycosides from *Madder roots*. *Phytochemical analysis*, 14, 137-144.
- Guin, P., S. Das y P. Mandal (2010). Electrochemical Reduction of Quinones in Different Media: A Review. *International Journal of Electrochemistry*, 2011, 816202-816222.
- Gupta, R., L. Jensen, y S. Brunak (2002). Orphan protein function and its relation to glycosylation. *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings*, 38, 276-94.
- Hamman, J. (2008). Composition and Applications of *Aloe vera* Leaf Gel. *Molecules*, 13, 1599-1616.
- Hilleman, M. (2002). Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control, *Vaccine*, 20, 3068-3087.
- Hou, Y., S. Cao, J. Peggy, A. Brodie y Martin. W. B. Callmender (2009). Antiproliferative and antimalarial anthraquinones of *Scutia myrtina* from the Madagascar forest. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 2871–2876.
- Howaida, I., M. Shaaban, K. Shaaban, N. Abu-Gabal, N. Shalaby y H. Laatsch (2009) New bioactive compounds from *Aloe hijazensis*. *Natural Product Research*, 23, 1035–1049.
- Huang, R. (2016). Secondary Metabolites from an Endophytic Fungus *Nigrospora sp.* *Chemistry of Natural Compounds*, 52, 697-699.
- Hussain, H., A. Al-Harrasi, I. Green, Z. Hassan y I. Ahmed (2015). Recent Advances in the Chemistry and Biology of Natural Dimeric Quinones. 46: 447-517. (2015). *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Science.
- Imai, M., Kawaoka, Y. (2014). The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. *Current Opinion in Virology*, 2, 160–167.

- Induli, M., M. Cheloti, A. Wasuna, I. Wekesa, J. Wanjohi, R. Byamukama, M. Heydenrich, M. Makayoto y A. Yenesew (2012). Naphthoquinones from the roots of *Aloe secundiflora*. *Phytochemistry Letters*, 5, 506–509.
- Itzstein, M. (2012). Influenza virus sialidasa-A drug discovery target. Springer, Australia. pp. 3, 77-97, 969-971.
- Jacobsson, M., J. Malmberg y U. Ellervick (2006). Aromatic O-glycosylation. *Carbohydrate research*, 341, 1266-1281.
- Johnson, I., R. Gandhidasan, y R. Murugesu (1999). Citotoxicity and superoxide anion generation by some naturally occurring quinones. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1072–1078.
- Kang, J., P. Zhang, Z. Gao, J. Zhang, Z. Yan, H. Wang y R. Chen (2016). Naphthohydroquinones, naphthoquinones, anthraquinones, and a naphthohydroquinone dimer isolated from the aerial parts of *Morinda parvifolia* and their cytotoxic effects through up-regulation of p53. *Phytochemistry*, 130, 144-151.
- Kim, H., H. Lee y E. Kim (2012). Heterologous Expression of a Model Polyketide Pathway in Doxorubicin-overproducing *Streptomyces* Industrial Mutants. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40, 10-16.
- Kuri, P., M. Betancourt, O. Velázquez, C. Álvarez y R. Tapia (2006) Pandemia de influenza: la respuesta de México. *Salud Pública de México*, 48, 72-79.
- Kwon, H., H. Kim y S. Yoon (2010). In Vitro inhibitory activity of *Alpinia katsumadai* extracts against influenza virus infection and hemagglutination. *Virology Journal*, 7, 307-314.
- Lamoureux, G. y C. Agüero (2009). A comparison of several modern alkylating agents. *Special Issue Reviews and Accounts*, 1, 251-264.
- Lee, T., A. Das y C. Khosla (2007). Structure-activity relationships of semisynthetic mumbaistatin analogs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 5207-5218.

- Lewis, H., S. Shaffer, W. Trieschmann y H. Cogan (1930). Industrial and Engineering Chemistry, 22, 34-36.
- Loregian, A., B. Mercorelli, G. Nannetti, C. Compagnin y G. Palú (2014). Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. Cell and Molecular Life Science, 71, 3659-3683.
- Lu, X., L. Xia, L. Wang y D. Ruden (2012). Hsp90 inhibitors and drug resistance in cancer: the potential benefits of combination therapies of Hsp90 inhibitors and other anti-cancer drugs. Biochemical Pharmacology, 83, 995-1004.
- Malik, E. y E. Muller (2016). Anthraquinones As Pharmacological Tools and Drugs. Medicinal Research Reviews, 36, 705-748.
- Medina, R. y A. García-Sastre (2011). Influenza A viruses: new research developments. Nature Reviews Microbiology, 9, 590-603.
- Moghaddasi, S y K. Sandeep (2011). *Aloe vera* their chemicals composition and applications: A review. International Journal of Biological and Medical Research, 2, 466-471.
- Moscona, A. (2005). Neuraminidase inhibitors for influenza. The New England Journal of Medicine, 353, 1363-1373.
- Nayak, D., R. Balogun, H. Yamada, Z. Zhou y S. Barman. Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Research, 2009, 143, 147–161.
- Neumann, G., T. Noda, Y. Kawaoka (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature, 459, 931-939.
- Nishikawa, T., K. Shimizu, T. Tanaka, K. Kuroda, T. Takayama, T. Yamamoto, N. Hanada y Y. Hamada (2012). Bacterial Neuraminidase Rescues Influenza Virus Replication from Inhibition by a Neuraminidase Inhibitor. Plos One, 7, 45371.
- Nitsch-Osuch, A. y L. Bernadeta (2014). Influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors. Acta Biochimica Polonica, 61, 505–508.

- Pandey, M.; M. Debnath, S. Gupta y S. Chikara (2011). Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeutics. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3, 113-117.
- Parhira, S., Z. Yang, G. Zhu, Q. Chen, B. Zhou, Y. Wang, L. Liu, L. Bai y Z. Jiang (2014). In vitro anti-influenza virus activities of a new lignan glycoside from the latex of *Calotropis gigantea*. *PLoS One*, 9, 104-129.
- Patel, D., K. Patel y S. Dhanabal (2012). Phytochemical standardization of *Aloe vera* extract by HPTLC techniques. *Journal of Acute Disease*, 1, 45-50.
- Punpanich, W y T. Chotpitayasunondh (2012). A review on the clinical spectrum and natural history of human influenza. *International Journal of Infectious Diseases*, 16, 714–723.
- Rhada, H. y N. Laxmipriya (2014). Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5, 21-26.
- Rodriguez, C., M. Shinyashiki, J. Froines, R. Yu, J. Fukuto y A. Cho (2004). An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicology*, 201, 185-196.
- Runstadler, J., N. Hill, T. Hussein, W. puryear y M, Keogh (2013). Connecting the study of wild influenza with the potential for pandemic disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, 162–187.
- Salazar, M., O. López-Ortega, G. Ávila, J. Ramirez y M. Castro (2010). El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza. *Gaceta Médica de México*. 146, 199-206.
- Salim, A., X. Xiao, K. Cho, A. Piggott, E. Lacey, J. Hancock Y R. Capon (2014). Rare *Streptomyces sp.* polyketides as modulators of K-Ras localisation. *Organic Biomolecules Chemistry*, 12, 4872-4878.

- Samji, T. (2009). Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 82, 153-159.
- Samson, M., et al. (2013). Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res*, 98(2): 174-185.
- Schmidt, B., D. Ribnicky, A. Poulev, S. Logendra, W. cefalu y I. Raskin (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolim*, 57, 3-9.
- Schultz, T., Sinks, G., Cronin, M. (1997). Quinone-induced toxicity to *Tetrahymena* : structure-activity relationships. *Aquatic Toxicology*, 39: 267-278.
- Secretaria de Salud, 2014. Manual de Vigilancia Epidemiológica de Influenza [Online] (Actualizado 5 Febrero 2014).
Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>
[Acceso 11 Noviembre 2015].
- Shan Han, Y., R. Heijden y R. Verpoort (2001). Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the *Rubiaceae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, 201-220.
- Shih-Wen, L., T. Yang, C. Iai, S. Huang, J. Liao, L. Wan, Y. Lin y W. Lin (2014). Antiviral activity of aloe-emodin against influenza A virus via galectin-3up-regulation. *European Journal of Pharmacology*, 73, 125–132.
- Sydiski, R., D. Owen, L. Lohr y A. Rosler (1991). Inactivation of Enveloped Viruses by Anthraquinones Extracted from Plants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 2463-2466.
- Takeshi, I y Takashi O. (1991). High Yield Production of Anthraquinone by Cell Suspension Cultures of *Crocus sativus* L. *Plant Tissue Culture Letters*, 8, 171-174.
- Takkis, K., S. Sild y U. Maran (2009). The QSAR Modeling of Cytotoxicity on Anthraquinones. *QSAR & Combinatorial Science*, 28, 829-833.

- Teich, L., K. Daub, V. Krugel, L. Nissler, R. Gebhardt y K. Eger (2004). Synthesis and biological evaluation of new derivatives of emodin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 5961–5971.
- Theodorou, V., K. Skobridis, A. Tzakos y V. Ragoussis (2007). *Tetrahedron Letters*, 48, 8230-8233.
- Trópicos (2015). *Aloe vera* (L.) Burm. f. [online].
Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/18403421>
[Acceso 17 de Septiembre de 2015].
- Uddin, Z., Y. Song, M. Curtis, J. Kim, H. Yuk y K. Park (2016). Potent bacterial neuraminidase inhibitors, anthraquinone glucosides from *Polygonum cuspidatum* and their inhibitory mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 283–292.
- Usama, W., A. Mohamed y H. Laatschz (2006). A new a-methylantraquinone glucoside from *Emex spinosus*. *Natural Product Research*, 20, 742-747.
- Van-Wyk, B., A. Yenesewt y E. Dgne (1995). Chemotaxonomic Survey of Anthraquinones and Pre-anthraquinones in Roots of *Aloe Species*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23, 267-275.
- Wade, L (2004). *Química Orgánica*. Pearson Education S.A., Madrid. pp. 969-971, 1075-1080.
- Wang, J., X. Qin, Z. Chen, Z. Ju, W. He, Y. Tan, X. Zhou, Z. Tu, F. Lu y Y. Liu (2016). Two new anthraquinones with antiviral activities from the barks of *Morinda citrifolia* (Noni). *Phytochemistry Letters*, 15, 13-15.
- Wang, Z., D. Song, Y. Liu, Q. Qi y P. Yu (2014). Solation, Purification, Analysis, Bioactivities Analysis of Antagonistic Substance in *Streptomyces termitum* Strain ACT-2. *Journal of Microbiology*, 4, 53-57.

- Wilksa, S., M. Graaf, D. Smith y D. Burker (2012). A review of influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties. *Vaccine*, 30, 4369-4376.
- Wyk, B., A. Yenesew y E. Dadne (1995). Chemotaxonomic Survey of Anthraquinones and Pre-anthraquinones in Roots of *Aloe Species*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23, 267-275.
- Yagi, A., K. Makino y I. Nishioka (1974). Studies on the Constituents of *Aloe saponaria* Haw. I. The structures of tetrahydroanthracene derivatives and related anthraquinones. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 22, 1159-1166.
- Yu, B y J. Sun (2010). Glycosylation with glycosyl N-phenyltrifluoroacetimidates (PTFAI) and a perspective of the future development of new glycosylation methods. *Chemical Communication*, 46, 4668-4679.
- Zhang, S., R. Huang, F. Li, H. Wei, X. Fang, X. Xie, D. Lin, S. Wu y J. He U(2016). Antiviral anthraquinones and azaphilones produced by an endophytic fungus *Nigrospora sp.* from *Aconitum carmichaeli*. *Fitoterapia*, 112, 85-89.
- Zhang, J., Q. Wang, H. Fang, W. Xu, A. Liun y G. Du (2008). Design, synthesis, inhibitory activity, and SAR studies of hydrophobic *p*-aminosalicylic acid derivatives as neuraminidase inhibitors). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 3839–3847.