

ÍNDICE

ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	XI
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XV

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO1

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Influenza	4
2.1.1. Estructura del virus de Influenza A	6
2.1.2. Epidemiología	8
2.1.3. Tratamientos	9
2.1.4. Extractos vegetales como tratamientos contra Influenza	12
2.2. Terpenos.....	12
2.2.1. Actividad anti-influenza de terpenos	13
2.3. <i>Diospyros anisandra</i> Blake.....	17
2.3.1. Género <i>Diospyros</i>	17
2.3.2. Descripción botánica y distribución de <i>Diospyros anisandra</i>	18
2.3.3. Fitoquímica de <i>Diospyros anisandra</i>	19
2.3.4. Usos etnobotánicos y actividad biológica	21
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25

CAPÍTULO II. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS TERPÉNICOS DE CORTEZA DE *Diospyros anisandra*27

1. INTRODUCCIÓN	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27

2.1.	Material y equipo de laboratorio para la obtención de los extractos y aislamiento de compuestos terpénicos.....	27
2.2.	Equipo para la elucidación estructural.....	28
2.3.	Material vegetal.....	29
2.4.	Procesamiento de corteza.....	29
2.4.1.	Obtención del extracto hexánico de corteza.....	29
2.4.2.	Fraccionamiento del extracto orgánico hexánico DC	30
2.4.3.	Aislamiento y purificación de las fracciones con compuestos terpénicos	32
2.4.3.1.	Fraccionamiento de DCs14-15.....	32
2.4.3.2.	Fraccionamiento de DCu-5 y DCi-7c	34
2.4.3.3.	Fraccionamiento de DCt-7.....	35
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1.	Análisis de la muestra DCs14-15	37
3.2.	Análisis de la muestra DCu-5	40
3.3.	Análisis de la muestra DCi-7c.....	46
3.4.	Análisis de la muestra DCt-7	52
4.	CONCLUSIONES.....	60

CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL E INHIBICIÓN DE NEURAMINIDASA DE COMPUESTOS TERPÉNICOS AISLADOS DE LA CORTEZA DE *Diospyros anisandra*.....

1.	INTRODUCCIÓN	61
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	62
2.1.	Material y equipo de laboratorio	62
2.2.	Cultivo celular y Cepa viral	63
2.3.	Enzima Neuraminidasa y Sustrato 4-MUNANA	63
2.4.	Muestras a evaluar.....	63
2.5.	Bioensayo de citotoxicidad	64
2.5.1.	Análisis de datos	65
2.6.	Evaluación de la actividad antiviral: Reducción del Efecto Citopático (REC)	65
2.6.1.	Análisis de datos	66
2.7.	Ensayo de Inhibición de la actividad de Neuraminidasa (NA).....	66
2.7.1.	Análisis de datos	67

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
3.1. Evaluación de citotoxicidad y de Reducción del Efecto Citopático.....	68
3.2. Evaluación de inhibición de la actividad de Neuraminidasa (NA).....	72
5. CONCLUSIONES.....	77
 CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	79
1. DISCUSIÓN GENERAL	79
2. CONCLUSIONES GENERALES	80
3. PERSPECTIVAS	81
 BIBLIOGRAFÍA	82

ABREVIATURAS

^{13}C -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
^1H -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
2D	Segunda dimensión
4-MUNANA	Sal sódica del ácido 2'-(4-metillumbeliferilo)- α -D-N-ácido acetilneuramínico
ACE2	Enzimas convertidoras de angiotensina 2
AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Ácido siálico
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Tipo de Cultivo)
ATR	Reflectancia total atenuada
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCE	Cromatografía en columna de exclusión o permeación
CCF	Cromatografía en columna Flash
CCG	Cromatografía en columna por gravedad
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades)
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CE_{50}	Concentración inhibitoria efectiva del virus al 50%

CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria celular del 50%
CICY	Centro de Investigación Científica de Yucatán
CLV	Cromatografía líquida al vacío
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica humana
COSY	Correlated Spectroscopy (Espectroscopia por correlación)
CPP	Cromatografía por placa preparativa
DL ₅₀	Dosis letal al 50%
DMAPP	Pirofosfato de 3,3'-dimeetilalilo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio Eagle modificado de Dulbecco)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
EPZ	Epóxido de zeylanona
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
FT-IR	Infrarrojo por transformada de Fourier

GISRS	Global Influenza Surveillance and Response System (Sistema Global de Vigilancia y Respuesta a la Influenza)
HA	Hemaglutinina
HMDB	Human Metabolome Database
HSV-1	Virus de herpes simple
Hx	Hexano
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité Internacional de Taxonomía de Virus)
IS	Índice de selectividad
ITIS	Integrated Taxonomic Information System (Sistema Integrado de Información Taxonómica)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
MDCK	Madin-Darby canine kidney (Madin-Darby de riñón canino)
MeOH	Metanol
MOI	Multiplicidad de infección
MU	4-metilumbeliferona
NA	Neuraminidasa
NANA	<i>N</i> -acetil- α - <i>D</i> -neuramínico
NP	Nucleoproteína

NS1 y NS2	Proteína no estructural 1 y 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PA	Polimerasa ácida
PB1 y PB2	Polimerasa básica 1 y 2
PBS	Phosphate buffered saline (amortiguador fosfato salino)
PEI	Porcentaje de inhibición de eclosión
REC	Reducción del efecto citopático
SDBS	Spectral Database for Organic Compounds (Base de datos espectral para compuestos orgánicos)
S-proteína	Proteína de espiga
T _R	Tiempo de retención
UCI	Unidades de cuidados intensivos
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
vRNP	Complejo de ribonucleoproteína viral
δ	Desplazamiento

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Gráfica de la curva epidémica de casos confirmados a influenza por semana epidemiológica en México (Secretaria de Salud, 2021).	6
Figura 1.2. Esquema de una partícula de virus de influenza A.	7
Figura 1.3. Estructura de tres triterpenos aislados de <i>Ganoderma pfeifferi</i> y un monoterpeno de <i>Melaleuca alternifolia</i> (Garozzo <i>et al.</i> , 2011; Niedermeyer <i>et al.</i> , 2005)	14
Figura 1.4. Estructura de dos triterpenos derivados del ácido betulónico y dos saponinas triterpénicas derivados del ácido 3-O- β -chacotriosil ursólico (Liao <i>et al.</i> , 2019; Baltina <i>et al.</i> , 2003).	17
Figura 1.5. Flores, frutos, hojas y ramas de <i>Diospyros anisandra</i> Blake (Fotografías: Germán Camevali Fernández-Concha; Herbario CICY, 2010)	18
Figura 1.6. Distribución en México de <i>Diospyros anisandra</i> Blake (Herbario CICY, 2010)	19
Figura 1.7. Estructuras de naftoquinonas aisladas de la corteza de <i>D. anisandra</i> (Cetina-Montejo, 2019; Uc-Cachón <i>et al.</i> , 2013b).....	20
Figura 1.8. Estructuras de triterpenos aislados de la corteza de <i>D. anisandra</i> (Uc-Cachón <i>et al.</i> , 2012).....	20
Figura 1.9. Estructuras de sesquiterpenos aislados de la corteza de <i>D. anisandra</i> (Arjona-Canul, 2011).....	21
Figura 1.10. Diagrama de estrategia experimental	26
Figura 2.1. CCD del fraccionamiento de DC.....	30
Figura 2.2. Diagrama de identificación y aislamiento de compuestos terpénicos en la corteza de <i>D. anisandra</i>	31
Figura 2.3. Fraccionamiento para obtener DCs14-15	33
Figura 2.4. Fraccionamiento para obtener DCu-5 y DCi-7c	34

Figura 2.5. Fraccionamiento para obtener DCt-7.....	36
Figura 2.6. Cromatograma de gases de la fracción DCs14-15	37
Figura 2.7. Espectro de fragmentación de masas de DCs14-15.....	38
Figura 2.8. Estructura de 7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1 β ,11-diol	38
Figura 2.9. Espectro H ¹ -RMN de la muestra DCs14-15 con la estructura de 7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1 β ,11-diol indicando los protones de las señales características	39
Figura 2.10. Cromatograma de gases de la fracción DCu-5	41
Figura 2.11. Estructura de <i>D</i> -Friendoolean-14-en-3-ona (taraxerona)	41
Figura 2.12. Espectro de fragmentación de masas de DCu-5	42
Figura 2.13. Espectro H ¹ -RMN de la muestra DCu-5 con la estructura de taraxerona indicando los protones de las señales características	44
Figura 2.14. Espectro 2D COSY de la muestra DCu-5 completo y su acercamiento en la zona con las señales principales.....	45
Figura 2.15. Cromatograma de gases de la fracción DCi-7c	47
Figura 2.16. Estructura de taraxerol	47
Figura 2.17. Espectro de fragmentación de masas de DCi-7.....	48
Figura 2.18. Espectro H ¹ -RMN de la muestra DCi-7c con la estructura de taraxerol indicando los protones de las señales características.....	50
Figura 2.19. Espectro 2D COSY de la muestra DCi-7c. Espectro 2D COSY completo y su acercamiento en la zona con las señales principales.	51
Figura 2.20. Estructura del ácido betulínico.....	53
Figura 2.21. Espectro FT-IR de la muestra DCt-7	54

Figura 2.22. Espectro H^1 -RMN de la muestra DCt-7 con la estructura del ácido betulínico indicando los protones de las señales características	55
Figura 2.23. Espectro C^{13} -RMN de la muestra DCt-7 con la estructura del ácido betulínico indicando los protones de las señales características	58
Figura 2.24. Espectro 2D COSY de la muestra DCt-7. Espectro 2D COSY completo y su acercamiento en la zona con las señales principales	59
Figura 3.1. Placas de 96 pocillos en prueba de citotoxicidad.....	64
Figura 3.2. Efecto citotóxico de los compuestos triterpénicos aislados de <i>Diospyros anisandra</i>	68
Figura 3.3. Efecto antiviral contra el virus de influenza A/Yucatán/2370/09 H1N1pdm09 en ensayo REC de los compuestos triterpénicos aislados de <i>Diospyros anisandra</i>	70
Figura 3.4. Estructura de a) taraxerol y b) taraxerona	70
Figura 3.5. Estructura de Mahanina y su compuesto metilado en C7, Quercetina y su glucósido en C3, y Curcumina.....	71
Figura 3.6. El sustrato MUNANA escindido por NA para liberar NANA y el compuesto fluorescente MU (Grienke <i>et al.</i> , 2012)..	72
Figura 3.7. Cinética enzimática	73
Figura 3.8. Actividad enzimática relativa de NA con las muestras obtenidas del extracto hexánico de la corteza de <i>D. anisandra</i> ensayadas a solo una concentración	74
Figura 3.9. Comportamiento de la actividad enzimática relativa de NA con la muestra DCt-7 y Quercetina a diferentes concentraciones	75
Figura 3.10. Actividad enzimática relativa de NA de Quercetina a 60 $\mu\text{g/mL}$, mezclas 1:1 de lupeol:taraxerol, 1:1:1 de lupeol:taraxerol:DCt-7 y 1:1 de taraxerol:DCt-7 a 50 $\mu\text{g/mL}$ de cada muestra	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Casos y defunciones positivas a influenza por temporada estacional (Secretaría de Salud, 2021)	6
Cuadro 1.2. Frecuencia de resistencia después del tratamiento con antivirales (Mifsud <i>et al.</i> , 2019).....	11
Cuadro 1.3. Terpenos sintéticos con actividad anti-influenza	16
Cuadro 1.4. Taxonomía de <i>Diospyros anisandra</i> Blake (California Academy of Sciences, National Geographic Society).....	19
Cuadro 2.1. Peso de hoja, corteza, raíz y ramas secundarias de <i>Diospyros anisandra</i>	29
Cuadro 2.2. Fracciones obtenidas de la CLV del extracto hexánico de corteza.....	30
Cuadro 2.3. Comparación de los datos de H^1 -RMN de la muestra DCs14-15 con 7- <i>epi</i> -selin-4(15)-en-1 β ,11-diol (Arjona-Canul, 2011).	39
Cuadro 2.4. Comparación de los datos de H^1 -RMN de la muestra DCu-5 con taraxerona (Hernández-Chávez, 2011; Tareq <i>et al.</i> , 2009).	43
Cuadro 2.5. Comparación de los datos de H^1 -RMN de la muestra DCi-7c con taraxerol (Hernández-Chávez, 2011; Tareq <i>et al.</i> , 2009).	49
Cuadro 2.6. Comparación de los datos del espectro FT-IR de la muestra DCt-7 con Ácido betulínico (SDBS, 2021; Pai <i>et al.</i> , 2011).	54
Cuadro 2.7. Comparación de los datos de H^1 -RMN de la muestra DCt-7 con ácido betulínico (Pérez-Valera, 2018; Uc-Cachón, 2012).	56
Cuadro 2.8. Comparación de los datos de C^{13} -RMN de la muestra DCt-7 con ácido betulínico (Pérez-Valera, 2018; Uddin <i>et al.</i> , 2011).	57
Cuadro 3.1. Efecto citotóxico y actividad antiviral de los compuestos triterpénicos aislados de <i>Diospyros anisandra</i>	69

Cuadro 3.2. Valores de concentración de enzima, sustrato y buffer de acuerdo a lo reportado por distintos autores en ensayos de inhibición enzimática empleando NA de <i>C. perfringens</i>	73
--	----

RESUMEN

Los terpenos pertenecen a un grupo numeroso de metabolitos secundarios, algunos de los cuales han presentado actividad antiviral contra la influenza A. *Diospyros anisandra* (Fam. Ebenaceae) es una especie endémica de la península de Yucatán, rica en terpenos; entre los terpenos identificados en estudios previos (1 β -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno, teucdiol A, selin-4(15)-en-1 β ,11-diol, 1 β ,6 α -dihidroxi-4(15)-eudesmeno y 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 β ,11-diol), ninguno ha sido evaluado contra cepas del virus de influenza A para determinar una posible actividad antiviral. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antiviral contra el virus de influenza A de los terpenoides aislados de corteza de *D. anisandra*.

Para el aislamiento de los terpenos se partió del extracto hexánico de hojas, raíz y corteza de *D. anisandra*, el cual fue fraccionado por diversas técnicas cromatográficas y las fracciones analizadas por CG-EM. Comparando el patrón de fragmentación obtenido en la base de datos del software NIST MS Search 2.0 y en la literatura se identificó en hoja los terpenos betulina y lupeol; en raíz taraxerol, lupeol y β -sitosterol; asimismo, en corteza se identificó 1 β -hidroxi-4(15),5E,10(14)-germacatrieno en DC; estigmasterol, γ -sitosterol y lupeol en la fracción DC5; γ -sitosterol en DC7; taraxerol en DC6-3; estigmastan-3,5-dieno, estigmasterol y γ -sitosterol en DCf-2; teucdiol A en DCd-1; y 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 β ,11-diol en DCe-2. Los compuestos 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 β ,11-diol, ácido betulínico, taraxerol y taraxerona fueron purificados y caracterizados mediante RMN-¹H, RMN-¹³C, FT-IR y COSY. Los terpenoides γ -sitosterol, estigmasterol, estigmastan-3,5-dieno, taraxerona y taraxerol no se han reportado anteriormente en *D. anisandra*.

Los compuestos taraxerol, taraxerona y la fracción rica en terpenos (DCt-7) fueron evaluados en cuanto a su citotoxicidad (en células MDCK) y actividad antiviral con la cepa del virus de influenza A/Yucatán/2370/09 H1N1pdm09 empleando el ensayo de reducción del efecto citopático (REC). Como resultado se encontró que ni taraxerol (CI₅₀ >117.37 μ M), taraxerona (CI₅₀ >117.92 μ M) y DCt-7 (CI₅₀ >50 μ g/mL) presentaron actividad citotóxica. Asimismo, en el ensayo REC taraxerol (CE₅₀ >117.37 μ M), taraxerona (CE₅₀ >117.92 μ M) y DCt-7 (CE₅₀ >50 μ g/mL) presentaron baja actividad antiviral.

En el ensayo de inhibición de NA se evaluaron los tres compuestos terpenoides y tres fracciones obtenidos del extracto hexánico de corteza de *D. anisandra*: lupeol (identificado en fracciones

hexánicas de hoja y corteza), taraxerol, taraxerona, DCt7, DCI11-12 (fracción semipura), DCs14-15 (fracción con compuesto mayoritario 7-*epi*-selin-4(15)-en-1 β ,11-diol). Además, como control positivo se empleó Carboxilato de Oseltamivir (CO) y Quercetina (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$ pureza). Ninguna de las muestras presentó mayor actividad que CO y quercetina, utilizada como control positivo.

.

ABSTRACT

Terpenes belong to a large group of secondary metabolites, some of which have shown antiviral activity against influenza A. *Diospyros anisandra* (Fam. Ebenaceae) is an endemic species of the Yucatan peninsula, rich in terpenes; among the terpenes identified in previous studies (1 β -hydroxy-4 (15), 5E, 10 (14) -germacatriene, teucdiol A, selin-4 (15) -en-1 β , 11-diol, 1 β , 6 α -dihydroxy- 4 (15) -eudesmen and 7-epi-selin-4 (15) -en-1 β , 11-diol), none have been tested against influenza A virus strains for possible antiviral activity. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the antiviral activity against the influenza A virus of the terpenoids isolated from the bark of *D. anisandra*.

For the isolation of the terpenes, we started from the hexane extract of leaves, roots and bark of *D. anisandra*, which was fractionated by various chromatographic techniques and the fractions analyzed by GC-MS. Comparing the fragmentation pattern obtained in the database of the NIST MS Search 2.0 software and in the literature, the terpenes betulin and lupeol were identified in leaves; in root taraxerol, lupeol and β -sitosterol; likewise, in the stem bark 1 β -hydroxy-4 (15), 5E, 10 (14) -germacatriene was identified in DC; stigmasterol, β -sitosterol and lupeol in fraction DC5; β -sitosterol at DC7 fraction; taraxerol at DC6-3; stigmastan-3,5-diene, stigmasterol and β -sitosterol in DCf-2; teucdiol A at DCd-1; and 7-epi-selin-4 (15) -en-1 β , 11-diol in DCe-2. The compounds 7-epi-selin-4 (15) -en-1 β , 11-diol, betulinic acid, taraxerol and taraxerone were purified and characterized by NMR-¹H, NMR-¹³C, FT-IR and COSY. The terpenoids β -sitosterol, stigmasterol, stigmastan-3,5-diene, taraxerone, and taraxerol have not been previously reported in *D. anisandra*.

The compounds taraxerol, taraxerone and the fraction rich in terpenes (DCt-7) were evaluated for their cytotoxicity (in MDCK cells) and antiviral activity with the influenza virus strain A / Yucatán / 2370/09 H1N1pdm09 using the cytopathic effect reduction (CPE) assay. As a result, it was found that neither taraxerol (IC₅₀ >117.37 μ M), taraxerone (IC₅₀ >117.92 μ M) and DCt-7 (IC₅₀ 50 μ g/mL) presented cytotoxic activity. Likewise, taraxerol (EC₅₀ >117.37 μ M), taraxerone (EC₅₀ >117.92 μ M) and DCt-7 (EC₅₀ >25 μ g/mL) showed low antiviral activity.

In the NA inhibition test, the three terpenoid compounds and three fractions obtained from the hexane extract of *D. anisandra* bark were evaluated: lupeol (identified in hexane fractions of leaf and bark), taraxerol, taraxerone, DCt7, DCI11-12 (fraction semi-pure), DCs14-15 (fraction with majority compound 7-epi-selin-4 (15) -en-1 β , 11-diol). In addition, Oseltamivir carboxylate (CO) and Quercetin (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$ purity) were used as positive control. None of the samples presented greater activity than CO and quercetin, used as a positive controls.