



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO SIQUÍMICO A PARTIR  
DE *Liquidambar styraciflua***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ATZIN HERNÁNDEZ FLANDES**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ARMANDO DANIEL CABRERA ORTIZ

**VOCAL:** Profesor: CARLOS ANTONIO RIUS ALONSO

**SECRETARIO:** Profesor: ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA

**1er. SUPLENTE:** Profesor: JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ

**2° SUPLENTE:** Profesor: OCTAVIO FUENTES RAMIREZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 204,  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, POSGRADO DE LA FACULTAD  
DE QUÍMICA. UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. CARLOS ANTONIO RIUS ALONSO**

---

**SUSTENTANTE:**

**ATZIN HERNÁNDEZ FLANDES**

---

# Índice

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	3
LISTA DE CUADROS	4
LISTA DE FIGURAS	5
I. INTRODUCCIÓN	7
II. HIPÓTESIS	9
III. MARCO TEÓRICO	10
<b>Capítulo 1. El estudio de la influenza en la actualidad. La preocupación de una inminente pandemia</b>	<b>10</b>
1.1 La gripe o influenza	10
1.2 Deriva y cambio antigénico.	13
1.3 Tropicismo.	16
1.4 Ciclo de replicación.	17
1.5 Virus de influenza A(H5N1)	19
1.6 Virus de Influenza A(H1N1)	20
1.7 Diagnóstico	21
<b>Capítulo 2. Control, tratamiento y perspectivas</b>	<b>23</b>
2.1 Vacunación	23
2.2 Antivirales	25
2.2.1 Inhibidores del canal iónico M2	25
2.2.1.1 Resistencia a inhibidores de M2	27
2.2.2 Inhibidores de la neuraminidasa	28
2.2.2.1 Resistencia de inhibidores de la NA	31
2.3 Posibles opciones terapéuticas futuras	32
2.3.1 Inhibidores diméricos de la NA	32
2.3.2 Análogos de nucleósidos	32
2.3.3 Inductores de interferón	33
2.3.4 Inhibidores de la RNA polimerasa	33
2.3.5 siRNA	34
2.3.6 Proteínas de fusión de sialidasa y sialilglicopómeros	34
<b>Capítulo 3. Oseltamivir: Un problema de abasto</b>	<b>36</b>
3.1 Oseltamivir	36

3.2	Ácido siquímico	43
3.2.1	Síntesis de ácido siquímico	44
3.2.2	Fuentes vegetales de ácido siquímico	45
3.3	Ácido salicílico, inductor de metabolitos secundarios	50
IV.	OBJETIVOS	53
V.	METODOLOGÍA	54
	<b>Reactivos y disolventes utilizados</b>	<b>54</b>
	<b>Recolección del material vegetal</b>	<b>55</b>
	<b>Tratamiento del material vegetal</b>	<b>57</b>
	<b>Recristalización del ácido siquímico</b>	<b>58</b>
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
VII.	CONCLUSIONES	70
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	71
	ANEXO	83

## Lista de siglas y abreviaturas

Abreviatura/Sigla	Significado
$\mu\text{M}$	Microlitro
Ac <sub>2</sub> O	Anhídrido acético
AcOH	Ácido acético
AJ	Ácido jasmónico
AS	Ácido salicílico
BOC	Ditercbutildicarbonato
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
DANA	Ácido 2-desoxi-2,3-didehidro-N-acetilneurámico
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPSP	Enolpiruvil-siquimato-3-fosfato
EPSPS	Enolpiruvil-siquimato-3-fosfato sintetasa
EtOH	Etanol
FANA	Ácido 2-desoxi-2,3-didehidro-N-trifluoroacetilneurámico
GTP	Guanosin trifosfato
HA	Hemaglutinina
HAI	Inhibición de la hemoaglutinación
IMF	Inosina 5'-monofosfato
Kg	Kilogramo
M	Molar
M1	Proteína de matriz
M2	Canal de protones M2
mg	Miligramo
MN	Microneutralización
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mTOR	Proteína objetivo de rapamicina en mamíferos
NA	Neuraminidasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
NANA	Ácido siálico ó ácido N-acetilneuramínico
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
PA	Polimerasa ácida
PB1	Polimerasa básica 1
PB2	Polimerasa básica 2
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNP	Ribonucleoproteína
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
SA $\alpha$ 2,3Gal	Enlace de ácido siálico $\alpha$ 2,3 galactosa
SA $\alpha$ 2,6Gal	Enlace de ácido siálico $\alpha$ 2,6 galactosa
SGP	Sialilglicopolímeros
Shi	Ácido siquímico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
siRNA	RNA pequeño de interferencia
SNC	Sistema nervioso central

## **Lista de cuadros**

<b>Cuadro 1.1. Pandemias ocurridas desde fines del siglo XIX.....</b>	<b>12</b>
<b>Cuadro 1.2. Métodos de diagnóstico de influenza .....</b>	<b>22</b>
<b>Cuadro 3.1. Metodologías de síntesis de oseltamivir .....</b>	<b>39</b>
<b>Cuadro 3.3. Elicitores de plantas.....</b>	<b>51</b>
<b>Cuadro 4.1. Ensayo de afinidad por el ácido oxálico con la resina IRA-400..</b>	<b>62</b>
<b>Cuadro 4.2. Rendimiento de ácido crudo de las partes aéreas de Liquidámbar .....</b>	<b>63</b>
<b>Cuadro 4.3. Rendimiento de ácido crudo de las hojas de liquidámbar con la aplicación exógena de ácido salicílico .....</b>	<b>64</b>
<b>Cuadro 4.4. Datos de RMN-<sup>1</sup>H del ácido crudo extraído de las hojas de liquidámbar durante la aplicación de AS.....</b>	<b>64</b>
<b>Cuadro 4.5. Impurezas encontradas en el extracto ácido.....</b>	<b>66</b>
<b>Cuadro 4.6. Impurezas encontradas en el extracto ácido Datos de RMN-<sup>1</sup>H con sus respectivas constantes de acoplamiento del ácido siquímico recristalizado comparado con ácido siquímico al 99% de Aldrich.....</b>	<b>69</b>

# Lista de figuras

Figura 1.1. Estructura del virus de influenza A	11
Figura 1.2. Distribución interespecie del virus de influenza tipo A	12
Figura 1.3. Deriva antigénica	14
Figura 1.4. Cambio antigénico	15
Figura 1.5. Enlaces de ácido siálico SA $\alpha$ 2,3Gal y SA $\alpha$ 2,6Gal.	16
Figura 1.6. Ciclo de replicación del virus de influenza	18
Figura 1.7. Origen del virus de influenza A(H1N1)/2009	21
Figura 2.0. Diagrama del proceso de manufacturación y distribución de la vacuna trivalente	24
Figura 2.1. Derivados de amantadina y Diagrama tridimensional del dominio transmembranal de M2	27
Figura 2.2. Inhibidores de la neuraminidasa	29
Figura 2.3. Interacciones entre el ácido N-acetil-neuramínico y el sitio activo de la neuraminidasa	30
Figura 2.4. Mecanismo de resistencia a oseltamivir	31
Figura 3.0. Hidrólisis del ácido siálico y diseño de inhibidores de la NA	36
Figura 3.1. Proceso de síntesis de oseltamivir desarrollado por Roche	37
Figura 3.2. Síntesis de oseltamivir propuesta por Corey y cols.	40
Figura 3.3. Síntesis de oseltamivir propuesta por Hayashi y cols.	42
Figura 3.3. Ruta del ácido siquímico	43
Figura 3.2.2. Síntesis de Ácido siquímico mediante la reacción de Diels-Alder	45
Figura 3.2.3. Illicium verum	46
Figura 3.2.4. Ginkgo biloba	48
Figura 3.2.5. Liquidambar styraciflua	49
Figura 5.0. Muestra caracterizada en el Herbario Nacional (MEXU)	56
Figura 6.0. Espectro RMN- <sup>1</sup> H Extracto ácido sin la utilización de N <sub>2</sub>	61
Figura 6.1. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del extracto ácido con la utilización de N <sub>2</sub>	61



Figura 6.2. Estructura de ácido oxálico	62
Figura 6.3. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del extracto ácido de la semana 2	65
Figura 6.4. Espectro de masas del extracto ácido de la semana 2 en introducción directa.	66
Figura 6.5. Espectro de masas de ácido siquímico al 99%	67
Figura 6.6. Espectro RMN- <sup>1</sup> H de las hojuelas negras	68
Figura 6.7. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del ácido siquímico recristalizado	69

## **ANEXO**

Figura 6.8. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del ácido siquímico al 99%	83
Figura 6.9. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del extracto estándar	84
Figura 6.10. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del extracto ácido de la semana 1	85
Figura 6.11. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del extracto ácido de la semana 3	86
Figura 6.12. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del extracto ácido de la semana 4	87
Figura 6.13. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del extracto ácido de la semana 5	88
Figura 6.14. Espectro RMN- <sup>1</sup> H del extracto ácido de la semana 6	89
Figura 6.15. Espectro de Infrarrojo del ácido siquímico recristalizado	90

## I. Introducción

Se estima que cada año alrededor del 10 a 20% de la población mundial se enferman por el virus de la influenza. De estos casos, aproximadamente entre 250, 000 y 500, 000 acabarán en defunciones, únicamente debido a la influenza estacional [6]. Sin embargo, en la actualidad este tema presenta varias preocupaciones que le han dado relevancia. Una de ellas es la cepa A(H5N1) que se ha dispersado desde China hasta Europa y que cuenta con alrededor del 60% de letalidad una vez desarrollada la enfermedad.

Otra es la aparición de la cepa A(H1N1) durante abril del 2009 en México, aunque esta cepa no resultó tener la misma tasa de mortalidad que su homóloga, sí fue más contagiosa.



Existen dos mecanismos que propician la mutación en los virus de influenza, a tal grado que pueden reinfectar a un individuo previamente expuesto y provocan que las vacunas desarrolladas para este sean inefectivas después de determinado tiempo.

Pese a que se ha intentado disminuir el impacto de este virus mediante el desarrollo de nuevos fármacos y la búsqueda de nuevas dianas de acción, hasta el momento las únicas opciones terapéuticas las constituyen los inhibidores de la neuraminidasa. Específicamente oseltamivir y zanamivir, debido a que los virus actuales son resistentes a los adamantanos, los fármacos de elección anteriormente utilizados para combatirlos.

En mayo del 2012, en la revista Nature se publicó un artículo controversial. En el que mediante el empleo de la técnica de genética reversa, Kawaoka et al., logró recombinar los virus A(H5N1) y A(H1N1) del 2009, la comunidad científica se refirió a esta nueva cepa como “el supervirus”. Si bien el trabajo generó preocupación por la liberación de la información, proporcionó valiosos datos, uno de ellos fue que la nueva cepa recombinante era susceptible a oseltamivir y el otro las mutaciones que les proporcionan afinidad por los receptores humanos a las nuevas cepas [16].

Fue debido a las razones anteriormente expuestas que el costo del oseltamivir se multiplicó y que su precursor de síntesis el ácido siquímico también. Actualmente la mayor fuente comercial de ácido siquímico es el anís estrella, seguido de la fermentación de microorganismos genéticamente modificados (principalmente E. coli).

Se han sugerido otros medios para mitigar este problema, desde la búsqueda de nuevas síntesis que no involucren al ácido siquímico hasta la investigación de fuentes alternativas de este, como el árbol de Glinkgo, las hojas de pino y las semillas de Liquidámbar [71].

El propósito de este trabajo fue indagar la propuesta de una fuente complementaria de ácido siquímico, el follaje de *Liquidambar styraciflua*, debido a que existen investigaciones previas sobre los frutos. Por lo que durante un año se hicieron extracciones acuosas de las partes aéreas del árbol y se determinaron los rendimientos de ácido siquímico de éstas, para establecer la temporada más indicada para la extracción como para conocer si las hojas de este árbol pudieran funcionar como fuente. Agregado a esto, se intentó aumentar la producción de ácido siquímico mediante la aplicación de un elicitor, ácido salicílico. La forma en que se realizó el experimento fue mediante la extracción y purificación del ácido siquímico (ver parte experimental) y su identificación por métodos espectrométricos.

## II. Hipótesis

Dado que el árbol *Liquidambar styraciflua* tiene un período de floración, producción y maduración de sus frutos, es posible que a su vez exista una temporada del año en la que el rendimiento de ácido siquímico sea mayor en dichas partes aéreas. Así también, es posible extraer ácido siquímico de las hojas de *Liquidambar styraciflua*, en las cantidades suficientes para proponerlo como una posible fuente alternativa al anís estrella, (*Illicium verum*).

La aplicación exógena de ácido salicílico (AS) estimula el sistema de defensa de las plantas, a su vez produce cambios metabólicos y bioquímicos entre los que está involucrada la producción de metabolitos secundarios. El ácido siquímico es un conocido precursor de metabolitos primarios y secundarios en las plantas. Por lo que es posible aumentar indirectamente las proporciones de ácido siquímico, induciendo la producción de metabolitos secundarios derivados de ésta ruta en el árbol *Liquidambar styraciflua*, mediante la aplicación de AS.

### III. Marco teórico

#### Capítulo 1. El estudio de la influenza en la actualidad. La preocupación de una inminente pandemia

##### 1.1 La gripe o influenza

La gripe (influenza) es una infección viral. Produce fiebre, secreción nasal, tos dolor de cabeza, malestar general e inflamación del revestimiento de la nariz, las vías respiratorias, ocasionalmente, se manifiesta con conjuntivitis. El virus se transmite inhalando microgotas provenientes de la tos o los estornudos de una persona infectada o bien teniendo contacto con las secreciones [1, 2].

La influenza ha estado con la humanidad desde hace mucho tiempo; de hecho su nombre proviene de las antiguas creencias de influencias malignas o sobrenaturales [3].

Los virus de influenza se clasifican en 3 tipos: A, B y C. Estos son los únicos que infectan a humanos de los cinco géneros existentes dentro de la familia *Orthomixoviridae*. Son virus con genoma de una cadena sencilla de RNA en sentido inverso, segmentado en 7 fragmentos en el caso del tipo C y 8 fragmentos para los virus tipo A y B que forman complejos con proteínas (NP, PA, PB1 y PB2). Para constituir una ribonucleoproteína (RNP) dispuesta en forma helicoidal (Figura 1.1).

Las infecciones por influenza del tipo B involucran principalmente a niños y adolescentes que en ocasiones pueden evolucionar en infecciones serias. Aunque está involucrado en epidemias periódicas, la tasa de hospitalización es cuatro veces menor respecto al virus de la influenza A.

El virus de influenza C también tiene la capacidad de producir epidemias y está asociado a enfermedades respiratorias moderadas, aunque raramente puede llegar a provocar infecciones severas del tracto respiratorio bajo. Sin embargo, es menos común que el virus tipo A y se estima que en la etapa adulta la mayoría de los individuos (96%) presenta anticuerpos para él [4, 5]. Así los virus de influenza, se calcula, que cada año enferma alrededor del 10 al 20% de la población mundial, de este porcentaje al rededor de 5 millones se convierten en casos graves que resultan aproximadamente de 250 a 500 mil defunciones. Dichos

casos son conocidos como influenza estacional. Usualmente, la mayor tasa de mortalidad corresponden al virus tipo A. Particularmente, las personas mayores de 65 años presentan mayor riesgo. La tasa de mortalidad anual relacionada con influenza en estas personas resulta en 1 por cada 2200 en EUA, mientras que los años en que se presentan epidemias esta tasa cambia a 1 por cada 300 [6].

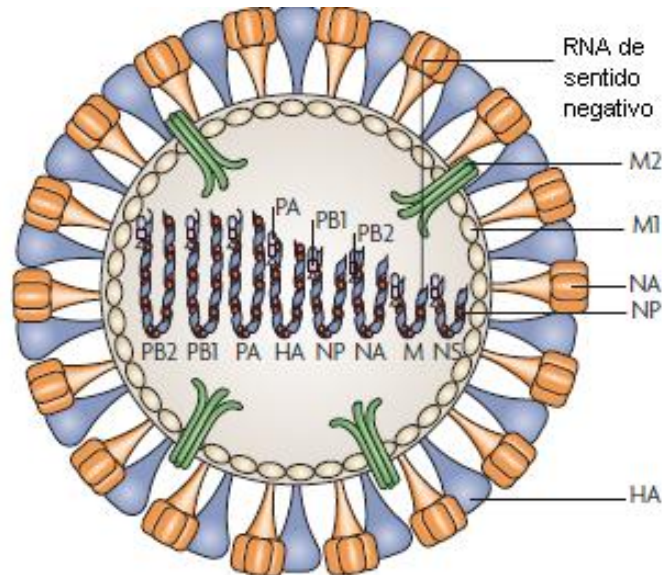


Figura 1.1 Estructura del virus de influenza A. Aunque se desconoce la organización de los fragmentos del genoma en el interior del virus, convencionalmente se enlistan de mayor a menor tamaño. Modificado de Nelson y Colmes, Nature 2007; 8:198.

Las organizaciones nacionales e internacionales para la protección de la salud ponen especial atención al virus de la influenza tipo A debido a la alta capacidad que tiene de generar pandemias, que son sus manifestaciones más severas (Cuadro 1.1). Aunque dichos eventos se presentan en intervalos de 10 a 40 años, únicamente se tiene registros confiables a partir de la ocurrida en 1918/1919 conocida como influenza española. Esta pandemia no tuvo precedente en cuanto a su severidad. Como medio de comparación el SIDA mató a 25 millones de personas en los primeros 25 años, mientras que la influenza española lo hizo en 25 semanas [2]. La mortalidad de esta enfermedad fue calculada por arriba del 2.5% en EUA. El agente causante de esta pandemia fue un virus tipo A del subtipo H1N1 confirmado por Taubenberger y colaboradores [92].

<b>Cuadro 1.1 Pandemias ocurridas desde fines del siglo XIX</b>			
<b>Años</b>	<b>Descripción viral</b>	<b>Cambio antigénico (fuente)</b>	<b>Impacto clínico</b>
1989	H3N2	Desconocido	Grave
1900	H3N8	Desconocido	Moderado
1918 - 1956	H1N1 "Española"	HA, NA (posiblemente aviar)	Muy grave, 50 millones de muertos en el primer año
1957 - 1968	H2N2 "Asiática"	Nuevos HA, NA, PB1 (aviar)	Grave
1968 -	H3N2 "Hong Kong"	Nuevo HA**, PB1(aviar)	Moderada
1977 -	H1N1 "Rusa"	Idéntica a la cepa de 1956	Relativamente leve
2009 -	H1N1 2009	Antigénicamente similar a la cepa porcina clásica A(H1N1), triple rearreglante del virus A(H1N1) de origen norteamericano que ha circulado entre los cerdos hace varias décadas	Moderada (en evolución)
Tomado de Córdova, J et al. La epidemia de influenza A(H1N1) en México. México: Editorial médica panamericana. 2010: 250			

Aunque la patogenicidad de este virus es multigénica. Las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) son las principales determinantes. La designación de los virus de influenza A se apoya en las relaciones antigénicas de estas proteínas. Las cepas de influenza A que son estacionales desde 1977 son A(H1N1 y H3N2). Hasta ahora se tienen tipificadas las siguientes variedades de HA (H1 a H17) y NA (N1 a N9) [7].

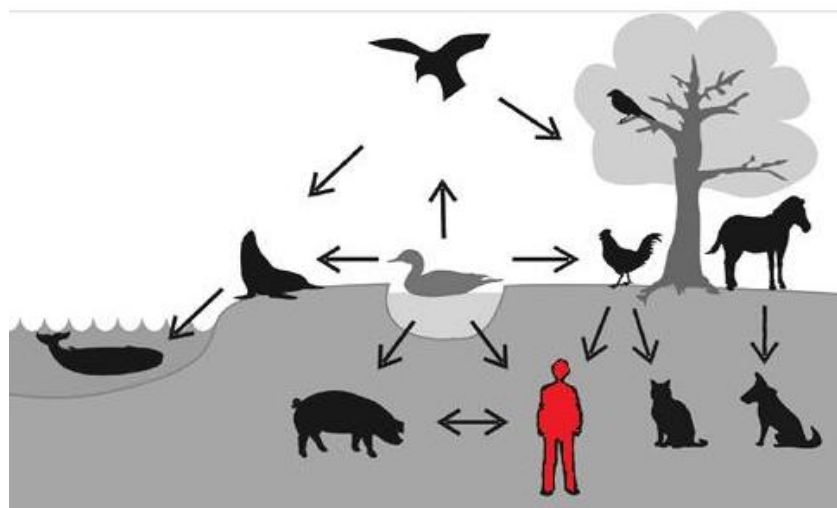


Figura 1.2 Distribución interespecie del virus de influenza tipo A en la naturaleza.

El intestino de las aves acuáticas silvestres es el reservorio más grande de estos virus y son excretados en altas concentraciones en las heces. En ellos circulan todos los subtipos de HA y NA. La mayoría de los virus de influenza no son patógenos para las aves acuáticas y se piensa que son la fuente de los virus transmitidos a otros animales como las aves de corral, los mamíferos acuáticos y terrestres [3].

Los virus de la influenza A han sido capaces de romper la barrera ínterespecífica y uno de los factores que lo ha permitido es la convivencia cercana del hombre con las aves, tanto de corral como silvestres (Figura 1.2).

## 1.2 Deriva y cambio antigénico.

En contraste con otros virus respiratorios, los virus de influenza poseen dos mecanismos diferentes que les permiten reinfectar a los humanos previamente expuestos. El primero de estos mecanismos es llamado deriva antigénica (antigenic drift) y ocurre en virus de tipo A y B debido a mutaciones puntuales provocadas por la infidelidad de la RNA polimerasa viral, se estima que para el virus AH1N1 del 2009 ocurre en  $3.66 \times 10^{-3}$  /cambios/nucleótido/año [8][11].

Este tipo de mutaciones se genera constantemente y en los genes de las proteínas HA y NA se acumulan hasta llegar el punto en que el sistema inmune de personas previamente infectadas ya no las reconoce o lo hacen ineficazmente. Esto implica que se tenga que revisar la composición de la vacuna estacional cada año. Más específicamente la hemaglutinina, que es el principal antígeno de neutralización del virus (Figura 1.3) [2].

El segundo mecanismo denominado cambio antigénico (antigenic shift) sucede cuando dos subtipos diferentes de virus infectan a un mismo huésped, dada la naturaleza segmentada del virus los genes de estos patógenos se mezclan y provocan una nueva escala de virus con diversas combinaciones de genes (Figura 1.4).



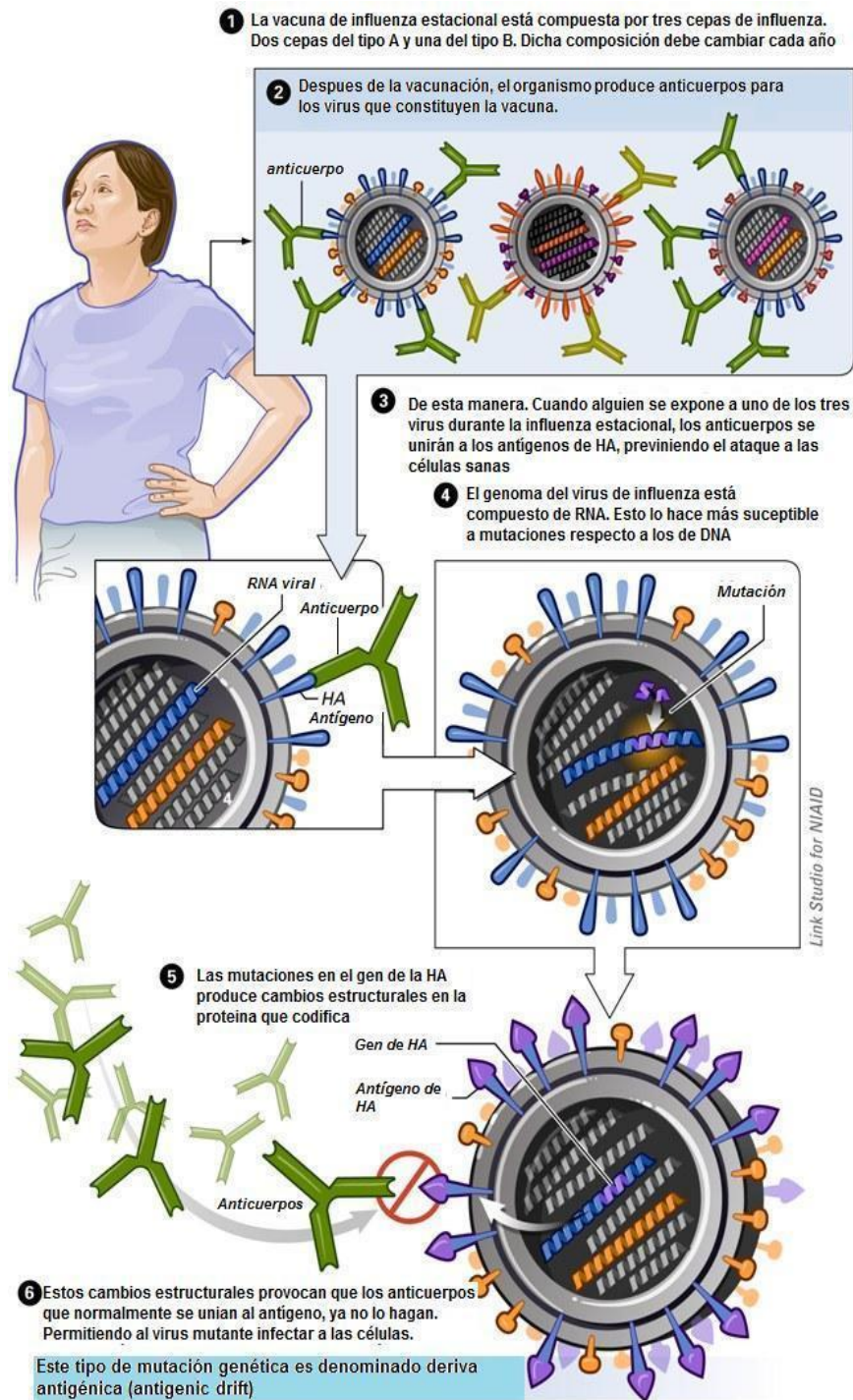


Figura 1.3 Deriva antigénica (antigenic drift). Figura disponible en [http://www.globalsecurity.org/security/ops/hsc-scen-3\\_flu-antigenic.htm](http://www.globalsecurity.org/security/ops/hsc-scen-3_flu-antigenic.htm).

Estas nuevas cepas pueden introducir proteínas inmunológicamente distintas en la población y si se presenta el contagio de persona a persona, el desenlace es una pandemia. En el siglo pasado hubo, tres de estos cambios

antigénicos que provocaron las pandemias de 1918, 1957 y 1968. Las cepas de 1957 y 1968 resultaron del intercambio de genes entre virus de tipo humano y aviar.

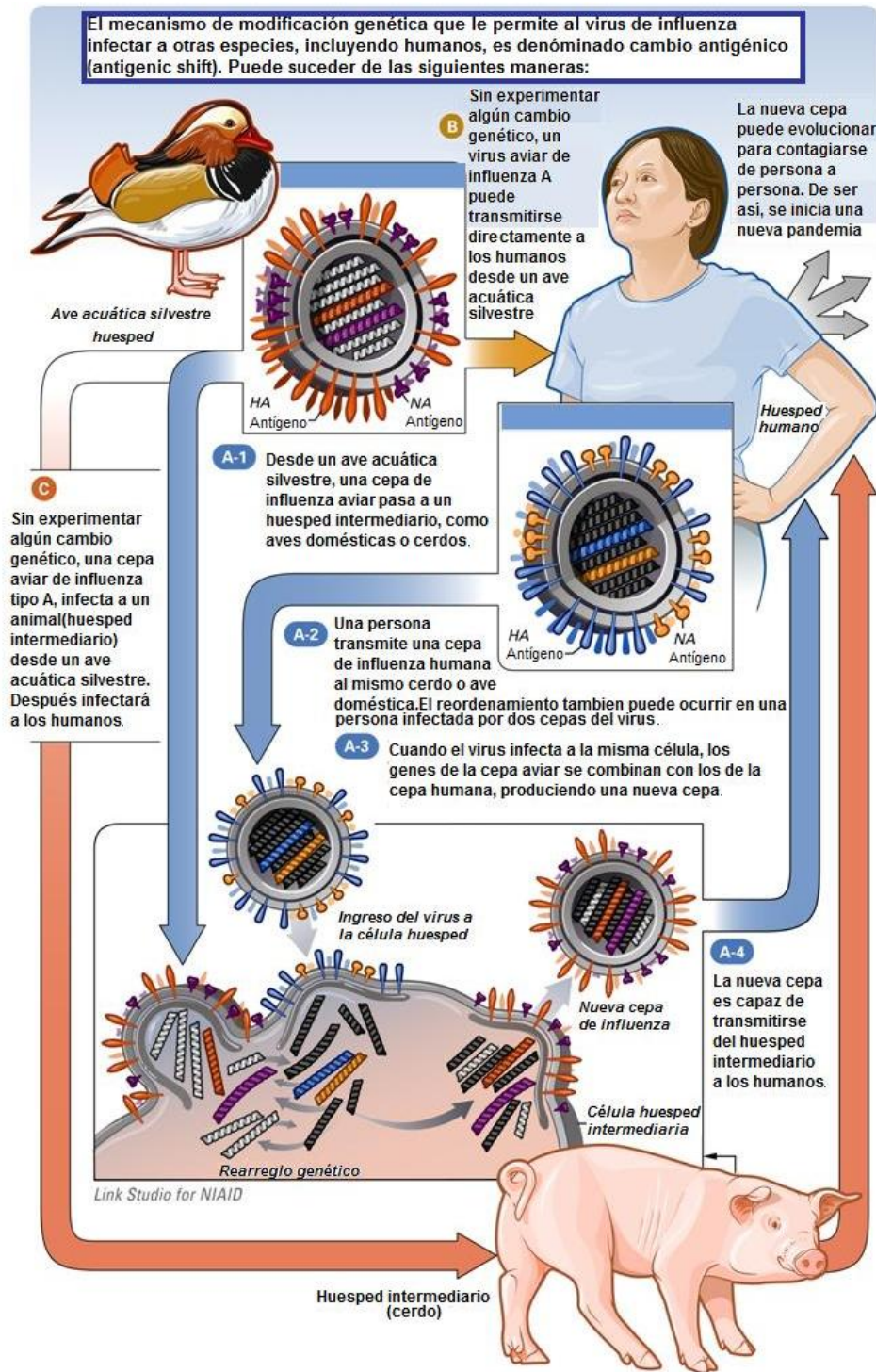
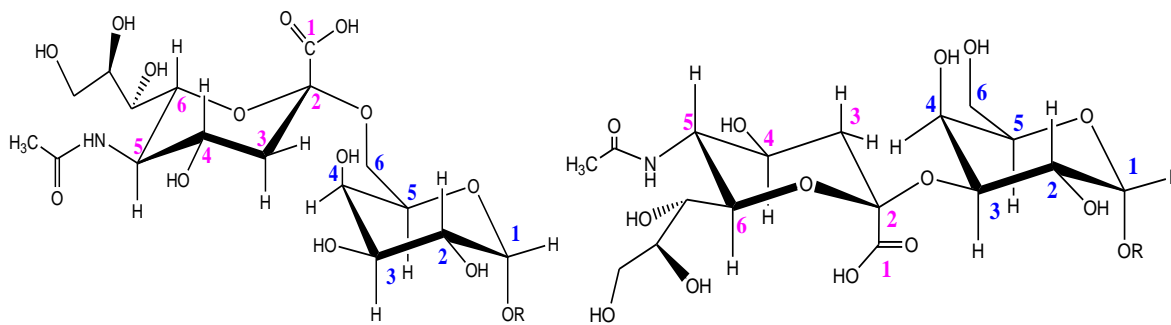


Figura 1.4 Cambio antigénico (antigenic shift). Figura disponible en <http://www.niaid.nih.gov/topics/flu/research/basic/pages/antigenicshiftillustration.aspx>.

### 1.3 Tropismo.

El virus normalmente ingresa al organismo por la nariz o la boca e infecta a las células que recubren al tracto respiratorio. La especificidad ligando-receptor de la proteína HA es la responsable del grado de restricción del huésped. Los virus aislados en humanos se unen principalmente al ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico(NANA) en unión  $\alpha$ -2,6(SA $\alpha$ 2,6Gal), mientras que, los virus aviarios a enlaces de ácido siálico  $\alpha$ -2,3 (SA $\alpha$ 2,3Gal) [9].



Ácido siálico- $\alpha$ 2,6-Galactosa

Ácido siálico- $\alpha$ 2,3-Galactosa

Figura 1.5 enlaces de ácido siálico SA $\alpha$ 2,3Gal y SA $\alpha$ 2,6Gal.

Esto se debe a que los enlaces de NANA que recubren la tráquea humana tienen principalmente sialiloligosacáridos con enlaces SA $\alpha$ 2,6Gal [10]. En cambio, el intestino de las aves acuáticas contiene principalmente enlaces de tipo SA $\alpha$ 2,3Gal [11].

La proteína HA como lo indica su nombre tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos, ya que la membrana de estos es rica en una sialoglicoproteína llamada glicoforina. Esta propiedad de hemoaglutinación ha sido utilizada para la clasificación de los diferentes tipos de influenza. Se piensa que, esta afinidad por los enlaces de NANA explica en parte la alta patogenicidad y la baja infectividad de las cepas de origen aviar, pues los sialiloligosacáridos con SA $\alpha$ 2,3Gal se expresan en el tracto respiratorio bajo (bronquiolos y alvéolos) en humanos, por lo que están menos accesibles al virus pero se está más susceptible a una infección grave cuando se llegase a presentar [12].

Cabe comentar que en las células epiteliales de la tráquea del cerdo existen ambos tipos de enlaces de ácido siálico, lo que predispone a este animal a ser infectado naturalmente por virus de origen humano, aviar y, por supuesto,

porcinos. Esto lo convierte en una incubadora de nuevos virus debido a la recombinación genética que puede haber entre estos como consecuencia del cambio antigénico [11].

#### 1.4 Ciclo de replicación.

Una vez que el virus se une al receptor de ácido siálico en la célula, se adentra en el citoplasma mediante el proceso de endocitosis clásica mediada por clatrina [13].

El pH disminuye en el endosoma lo que provoca un cambio estructural en la hemaglutinina. Después de este proceso la proteína es susceptible de sufrir un proceso de lisis proteolítica.

La proteína HA se sintetiza como una proteína precursora llamada H0, una vez que se corta en una región específica que contiene un aminoácido básico, (lisina o arginina), produce las subunidades H1 y H2. Este corte proteolítico expone un péptido hidrofóbico en el amino terminal de H2 que es responsable de mediar la fusión de las membranas celular y viral durante la endocitosis.

Al mismo tiempo, la proteína M2 funciona como canal iónico y permite la entrada de protones hacia el interior del virus. La acidificación interna favorece la ruptura de las interacciones proteína-proteína permitiendo que el complejo de ribonucleoproteína formado por el genoma, la polimerasa viral y la proteína NP se libere de la matriz del virus e ingrese al núcleo para iniciar su replicación y transcripción.

Las proteínas PB1 y PA forman un complejo que funciona como RNA polimerasa viral. El gen de la subunidad PB1 de la polimerasa viral contiene un segundo marco de lectura abierto que da lugar a la proteína PB1-F2. No todas las cepas de influenza la expresan, pero se ha encontrado que se inserta en la membrana de las mitocondrias e induce la muerte celular por apoptosis.

En las infecciones por virus con genoma de RNA, se genera RNA de doble cadena durante la replicación de este, lo cual estimula la activación de factores de transcripción que provocan la producción de INF- $\beta$ . La proteína NS1 se une al RNA

de doble cadena y antagoniza la respuesta de  $\text{INF-}\beta$  en la célula, pues previene la activación de la proteína quinasa dependiente de RNA (PKR).

Los mRNA virales son traducidos por la célula y los nuevos virus son ensamblados en el citoplasma y salen mediante gemación por la membrana plasmática, que a su vez ha sido modificada previamente por la inserción de las proteínas HA, NA y M2 [8].

La función de la proteína NA es remover el ácido siálico de los sialioligosacáridos, sirviendo esta actividad para dos propósitos: (a) remover el NANA de la HA, NA y la superficie de la célula para facilitar la liberación del virus; (b) eliminar el NANA de la capa de mucina del tracto respiratorio, que se cree le permite llegar a la superficie de las células epiteliales (Figura 1.6).

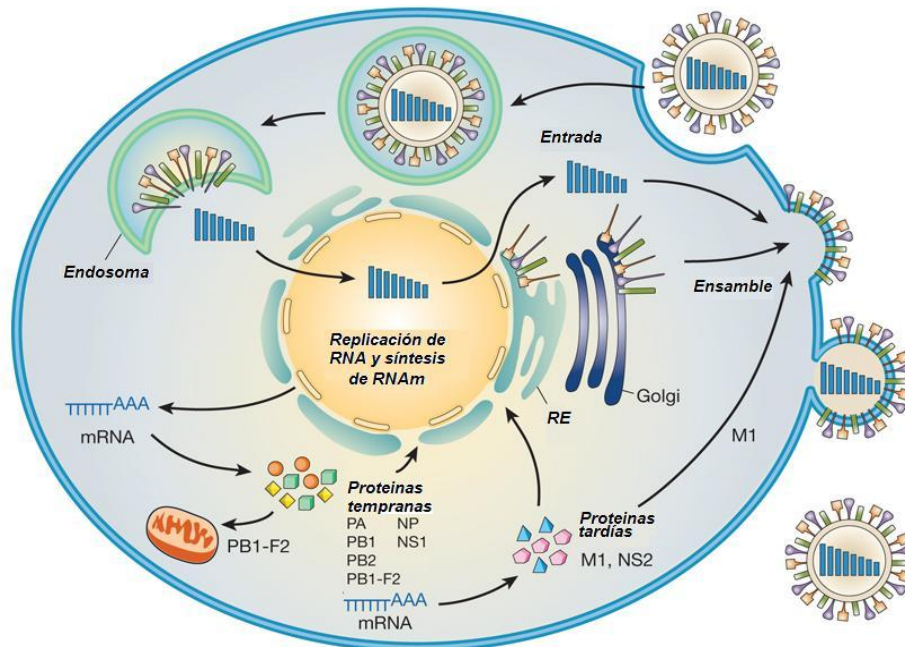


Figura 1.6 Ciclo de replicación del virus de influenza. Modificado de Neumann et al. Nature 2009; 459: 932.

## 1.5 Virus de influenza A(H5N1)

El primer reporte de una infección fatal en humanos con virus de influenza aviar ocurrió en 1997, en Hong Kong, 18 personas se infectaron resultando en 6 fallecimientos [14].

Aunque después hubo brotes esporádicos. Este brote se mantuvo controlado mediante el sacrificio de aves de corral. Sin embargo, tuvo un resurgimiento en el 2003, en esta ocasión el virus se expandió al sureste de Asia, África y Europa. Específicamente, este virus tiene una alta tasa de rearreglo y presenta características que merecen atención:

- Llega a ser letal para aves de corral y aves acuáticas silvestres (reservorio natural).
- Se replica y crea infecciones mortales en ratones, sin la necesidad de adaptarse previamente.
- Infecta a varias especies de mamíferos con resultados fatales
- Estudios hechos en hurones indican que su patogenicidad aumenta con el tiempo. Esto indica la adquisición de mutaciones que incrementan su patogenicidad en mamíferos, a su vez se han identificado y realizado en el laboratorio mutaciones en la HA que le permiten cambiar la especificidad hacia el enlace SA $\alpha$ 2,6Gal [15] [16].
- Su transmisión a humanos está asociado con una infección respiratoria severa con un alto índice de mortalidad [17].

Hasta el 10 de agosto del 2012 se habían registrado 594 infecciones en humanos, de las cuales 349 resultaron en fallecimientos [18].

El subtipo H5N1 presenta poca difusión entre humanos, el virus no se ha adaptado lo suficiente para desencadenar una pandemia. Contrario a la cepa A H1N1/2009 que se puede contagiar fácilmente entre personas pero presenta baja tasa de mortalidad. Las infecciones por virus A(H5N1) están relacionadas con leucopenia, neumonía severa y altos niveles de citocinas.

Varios reportes indican que la cepa A(H5N1) se replica en el tracto respiratorio bajo y que la carga viral se correlaciona con el desenlace de la infección [19].

### 1.6 Virus de Influenza A(H1N1)

El 23 de abril del 2009 se reportó la presencia de un nuevo virus de influenza, descrito como de origen porcino en la mayoría de las muestras enviadas a Winnipeg, Canadá y Atlanta, Estados Unidos [5].

Dicho informe dio explicación a la ocurrencia de casos de neumonías graves en adultos y jóvenes que se reportaban en varios estados del país. Una epidemia por un nuevo virus de influenza no estaba dentro de las expectativas y nunca se había considerado en México. Al final del mes de abril del mismo año, la diseminación y capacidad de contagio persona-persona del nuevo virus llevó a la OMS a declarar un nivel cinco en la alerta de pandemia (contagio persona-persona en al menos dos países y signos de una inminente pandemia). México estableció una campaña para educar a la población en las medidas sanitarias y de prevención. Finalmente, el 10 de agosto del 2010 se declaró el fin de la pandemia 2009/2010 de la cual se contabilizaron 18,449 muertes hasta el día 1 de agosto del 2010 [20].

El agente causante de dicha pandemia fue un virus de influenza A del subtipo H1N1, para determinar su origen se efectuó la secuenciación de cada uno de los fragmentos genómicos y posteriormente, se realizó el análisis comparativo con las secuencias ya conocidas. De esta manera, se producen una serie de árboles filogenéticos de cada uno de los fragmentos. A este tipo de virus se les conoce de manera general como virus rearreglantes, refiriéndose a ellos como dobles o triples si su material genético derivó de dos o tres diferentes virus de influenza.

De los análisis anteriores se concluyó que el genoma de este nuevo virus proviene de una variante de virus de influenza “similar al de las aves” que afecta cerdos eurasiáticos, que a su vez proviene de una triple rearreglante aislada e identificada en los 90’s en el norte de EUA. Cabe señalar que esta última derivó de un virus clásico de cerdos y de uno humano tipo H3N2 [21]. Estos trabajos filogenéticos han permitido rastrear los orígenes del virus pero no así el tiempo de gestación (Figura 1.7).

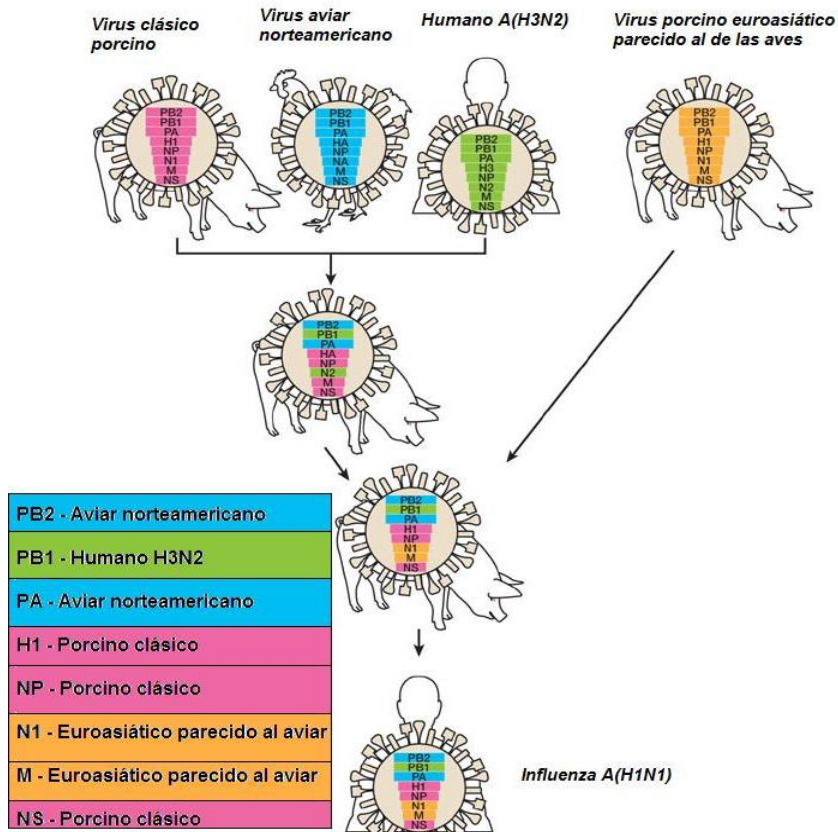


Figura 1.7 Origen del virus de influenza A(H1N1)/2009. Se muestra el porque su descripción original era de “cuadruple rearreglante”. Modificado de Neumann et al. Nature 2009; 459: 934

## 1.7 Diagnóstico

El diagnóstico para los casos de influenza no es necesario para iniciar un tratamiento; se utiliza principalmente para confirmar los subtipos de virus de influenza que circulan en la población en una determinada estación y la selección de las cepas para la elaboración de vacunas. También es importante entre los periodos epidémicos anuales, específicamente en la caracterización de los brotes.

Dado que hay una mayor concentración del virus intracelularmente, la mejor muestra son las secreciones que contienen células infectadas tomadas de un sitio accesible como la nasofaringe y orofaringe durante los primeros tres días del inicio de los síntomas [5].



**Cuadro 1.2 Métodos de diagnóstico de influenza**

<b>Método</b>	<b>Tipos de virus que detecta</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Cultivo celular (aislamiento)</b>	A y B	Estándar de oro. Sensible y específico. Vital para la vigilancia virológica y la elaboración de vacunas.	Los resultados no están en tiempos clínicamente relevantes. Laborioso. Depende de la calidad de las muestras.	3 -14 Días
<b>RT-PCR</b>	A, B y C	Altamente sensible y específico. Resultados rápidos y puede detectar otros virus que no se aíslan.	Puede no identificar a las nuevas cepas circulantes o pandémicas.	< 1 Día
<b>Inmunofluorescencia</b>	A y B	Se puede realizar a partir de la muestra clínica. Específico y rápido	Requiere personal especializado. Depende de la calidad de la muestra.	Aprox. 4 horas
<b>Pruebas rápidas</b>	A y/o B	Específico, simple y rápido. Los resultados positivos son útiles para la vigilancia de la influenza estacional	Poca sensibilidad. Los resultados negativos requieren confirmación.	30 – 60 min.
<b>Serología (HAI, MN, Fijación del complemento)</b>	A, B y C	Puede detectar infecciones negativas al aislamiento. Útil como herramienta de investigación y vigilancia	El diagnóstico es únicamente retrospectivo. Limitada utilidad clínica. Sensibilidad y especificidad variables	2 - 4 semanas
<b>Microscopía electrónica</b>	A, B y C	Rápida en situaciones de emergencia. Solo se requiere una muestra del paciente.	Requiere de fuerte inversión en equipo e infraestructura. Necesita personal especializado.	Aprox. 1 hora

Abreviaturas: RT- PCR, reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa; HAI, inhibición de la hemoaglutinación; MN, microneutralización. Tomado de Córdova, J., et al. La epidemia de influenza A(H1N1) en México. México: Editorial médica panamericana. 2010: 92

## Capítulo 2. Control, tratamiento y perspectivas

### 2.1 Vacunación

Una de las medidas adoptadas mundialmente para reducir la incidencia de influenza estacional es la aplicación de la vacuna trivalente, que se produce con los virus mutados que mostraron ser predominantes en la temporada del año anterior. Una vacuna es el mejor método de profilaxis ante una infección. Y en el caso particular de estas, necesitan ser revisadas en periodos entre 1 a 3 años debido al proceso de deriva antigénica del virus (Figura 2.0).

Por otro lado, en lo que respecta a la reciente pandemia del 2009/2010, no existe evidencia que permita determinar la magnitud de la respuesta inmune generada por la vacuna estacional con cepa A(H1N1) para la prevención contra el nuevo virus pandémico, de lo que se concluye que es necesario contar con una vacuna específica.

Las cepas utilizadas para la elaboración de las vacunas en los programas de vacunación anual se determinan con base en las recomendaciones de la OMS en conjunto con otros laboratorios de referencia internacionales. Estas cepas (virus semilla) consisten en virus rearreglantes entre los patógenos de origen silvestre y la cepa A/PR/8/34. Este último virus le permite desarrollar un alto grado de crecimiento en la cavidad alantoidea de embriones de pollo, que es el medio de cultivo utilizado [22].

Posteriormente, los viriones son purificados del fluido y concentrados mediante centrifugación o cromatografía en columna e inactivados con  $\beta$ -propiolactona y formalina. Después la membrana viral es desintegrada con detergentes. El mayor componente de la vacuna es la hemaglutinina del virus. Adicionalmente, se realizan otras técnicas, como genética reversa, para disminuir la virulencia de algunas cepas. Este tipo de vacuna se denomina por su composición, de antígeno de superficie o inactivada. En Europa ya son producidas dos vacunas en cultivos celulares de mamíferos aunque todavía no han sido aprobadas para su comercialización [23], [2].

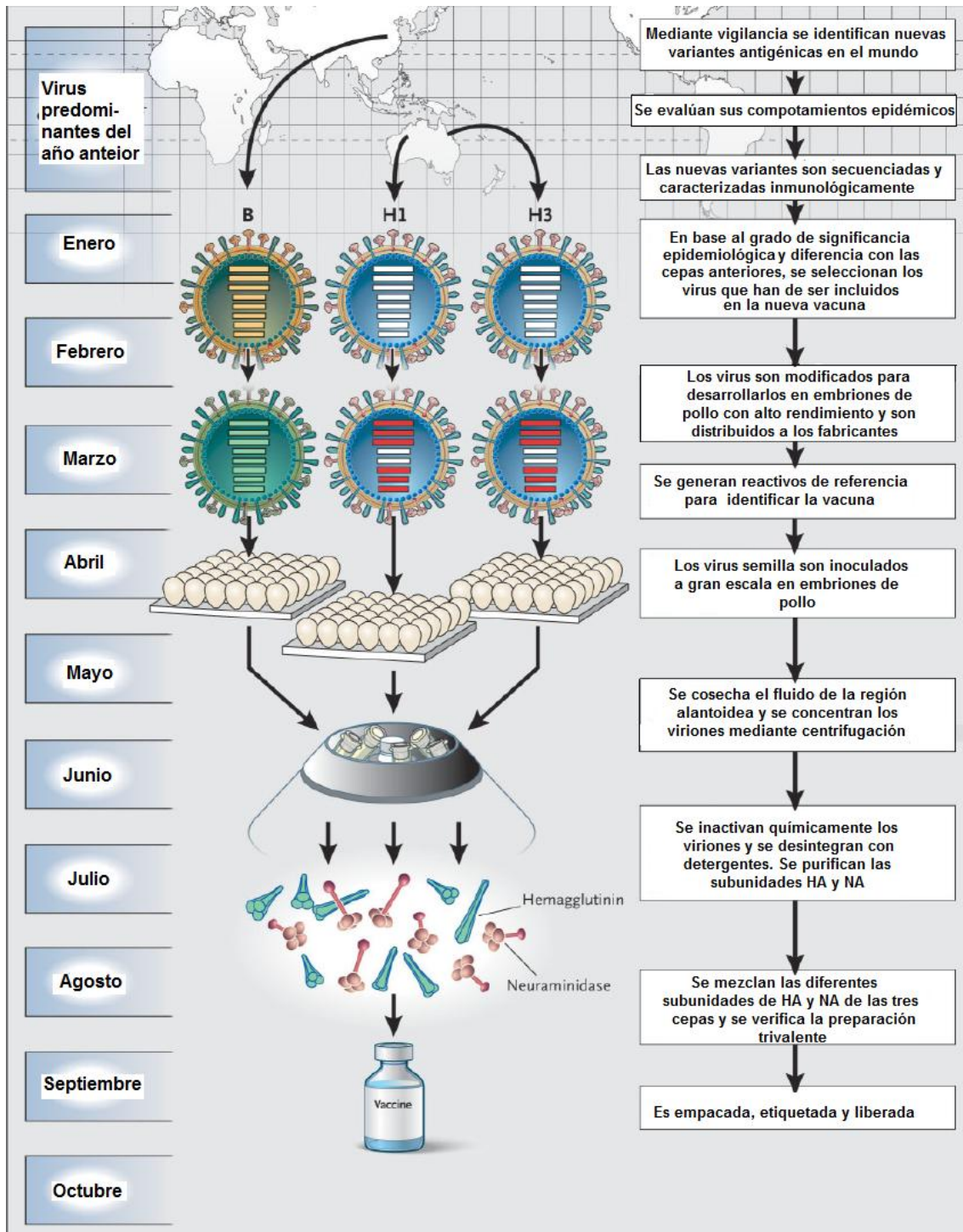


Figura 2.0 Diagrama del proceso de manufacturación y distribución de la vacuna trivalente. Modificado de Tenor, J. The New Eng. Jour. Of Med. 2004; 351: 2037.

Durante la pandemia del 2009, la selección de las cepas empleadas para la producción de las vacunas contra la influenza A(H1N1) de tipo pandémico quedó determinada por el NIBSC en Reino Unido [24], [25].

Aunque afortunadamente este agente presenta baja mortalidad, se mantiene la preocupación de que los virus A(H1N1) y A(H5N1) lleguen a mutar y aumenten su patogenicidad o transmisibilidad, de ocurrir esto, será un evento más complicado de manejar.

Se recomienda que durante el periodo estacional, los grupos de riesgo como las personas mayores de 65 años, personas con enfermedades metabólicas y/o padecimientos crónicos, niños de 6 a 23 meses, médicos residentes, grupos de enfermeras, mujeres que pretendan estar embarazadas durante el periodo estacional etc., sean los primeros en ser vacunados. En el caso de suceder una pandemia los grupos de menor riesgo podrían tener la opción de recibir vacunas de virus vivos atenuados y, de esta manera, inmunizar a un mayor número de personas [26].

Por otro lado, la producción de una vacuna para un nuevo virus de proporción pandémica, a futuro, puede llegar a tardar un periodo de entre 6 – 8 meses, una vez sucedido el primer brote, debido a las características antigénicas que debe cumplir y al prolongado tiempo de evaluación de su seguridad. Tiempo en que el nuevo virus se distribuiría mundialmente, diezmando los sistemas de salud y la economía mundial [27].

## **2.2 Antivirales**

Como parte de las estrategias de contención ante una posible pandemia, varios países han preparado reservas de antivirales. Estos son adamantanos (rimatidina y amantadina) e inhibidores de la neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir).

La importancia de los antivirales radica en la disponibilidad adecuada. Ya que, en la ausencia de una vacuna efectiva, estos podrían representar la respuesta a una pandemia de influenza.

### **2.2.1 Inhibidores del canal iónico M2**

Hay dos inhibidores del canal iónico M2 que están indicados en la clínica para la influenza. Amantadina (clorhidrato de 1-adamantanamina) es una

estructura tricíclica de diez carbonos con un grupo amino primario. Se sabe que tiene actividad antiinfluenza A desde 1960; fue aprobada inicialmente para la prevención del virus de influenza A(H2N2) en Estados Unidos durante 1966, una década después, su uso se extendió para todos los subtipos de influenza [28].

El segundo inhibidor es rimantadina, se trata de un derivado de la amantadina que incorpora un metilo entre el grupo amino y la misma estructura tricíclica, esta fue aprobada en 1993 (Figura 2.1). Los dos compuestos mantienen su actividad antiviral después de almacenamientos prolongados (> 25 años) [29].

Ambos antivirales inhiben la replicación *in vitro* de los virus de influenza A en bajas concentraciones ( $\leq 1\mu\text{g/ml}$ ). Aunque aún es tema de debate cual es el sitio de unión de estos fármacos, se sabe que su mecanismo de acción es sobre la función del canal iónico M2, por lo que indirectamente afecta el desnudamiento del genoma viral y la importación de las ribonucleoproteínas hacia el núcleo. Este efecto es el mismo para todos los tipos de influenza A. El canal M2 es una proteína integral de la membrana del virus que contiene 96 aminoácidos y se divide en tres dominios. Este canal se expresa como un homotetrámero en la membrana plasmática de las células infectadas y, de esta manera, incorporada a los viriones de influenza [30].

La utilidad clínica de estos inhibidores como agentes antivirales está limitada a la prevención y tratamiento de las infecciones de virus de influenza únicamente del tipo A. La administración profiláctica de amantadina reduce la frecuencia de infecciones en un 15 - 40% [31]. Durante un estudio de profilaxis con rimantadina a dosis de 100-200mg diarios por un periodo de 8 semanas en enfermeras residentes inmunizadas, se encontró bajo riesgo de enfermedad ligada a influenza (58% de eficacia), pero una vez que se presenta la infección no la reduce [32].

No se han realizado estudios a largo plazo para determinar si la amantadina previene las complicaciones pulmonares derivadas de influenza. Aunque en un modelo murino con un virus A y una infección pneumocócica secuencial, la rimantadina es mucho menos efectiva respecto al oseltamivir [33].

Uno de los principales problemas al utilizar amantadina son los efectos adversos que presenta en el sistema nervioso central (SNC) y que tiene un amplio

espectro de toxicidad debido a la acción anticolinérgica que la hace incompatible con varios medicamentos. Rimantadina presenta menores efectos adversos en el SNC y depende de una menor función renal para su eliminación respecto a la amantadina.

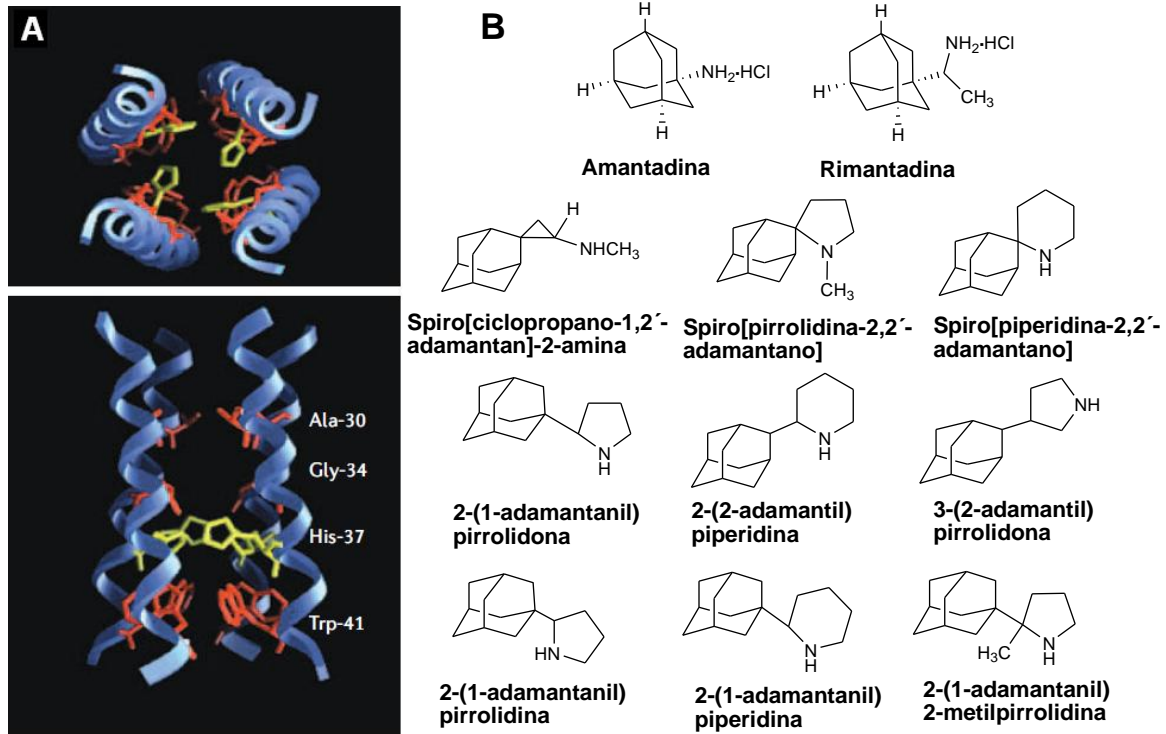


Figura 2.1 Amantadina y derivados. **a)** Diagrama tridimensional del dominio transmembranal de M2. Consta de dos vistas, una desde el dominio extracelular y una vista transversal, en la que se remarcan los residuos de aminoácidos identificados como responsables de orientar la conducción de iones. **b)** Estructura de la amantadina y sus derivados. Adaptada de Clercq, E. Nature Reviews; 2006. 5:1018

### 2.2.1.1 Resistencia a inhibidores de M2

La resistencia a estos fármacos está mediada por el gen M que codifica para las proteínas M1 y M2. Los virus resistentes tienen mutaciones puntuales en su gen M con un correspondiente cambio de aminoácidos en el dominio transmembranal de M2 (posiciones 26,27,30,31 y 34) [34].

La frecuencia con que estas mutaciones emergen, dependen de los subtipos de influenza, mientras en los virus del subtipo H3N2 predominan Ser31Asn. En los subtipos H1N1 lo son Val27Ala. Dichos cambios le proporcionan

al virus una reducción en la susceptibilidad hasta de 3300 veces en ensayos de  $CI_{50}$ . Y le confiere resistencia cruzada hacia otros inhibidores de M2 [35].

El uso de amantadina para el tratamiento se asocia a un rápido surgimiento de virus resistentes que parecen ser fácilmente transmisibles y patogénicos. Ahora se sabe que China facilitó y utilizó amantadina para detener los brotes de influenza aviar y como profilaxis para que las aves de corral no contrajeran el virus, aún sabiendo que esta actividad estaba prohibida y que estudios anteriores habían confirmado que los virus generaban resistencia en pollos enfermos y tratados con estos inhibidores. Las autoridades farmacéuticas y veterinarias de dicho país confirmaron esta información [36].

Cuando el virus A(H5N1) resurgió en Asia, se observó que era resistente a este tipo de fármacos y, por lo tanto, son inútiles ante una posible pandemia proveniente de esta cepa.

Por otro lado, en todos los aislamientos de la cepa A(H1N1) pandémica del 2009, el virus ha mostrado ser resistente a los adamantanos; la mutación S31N en la proteína M2 es la responsable de que la mayoría de los virus de influenza A sean resistentes a los antivirales de este tipo [11]. Además de los dos inhibidores, se han encontrado otros derivados que también tienen actividad y que deben ser investigados (Figura 2.1). También, se debe evaluar otros compuestos relacionados estructuralmente a la amantadina como bananin (BAN).

### **2.2.2 Inhibidores de la neuraminidasa**

Con base en los análisis realizados a la estructura cristalina de la NA se han desarrollado potentes y selectivos inhibidores para ésta. Los primeros inhibidores que se diseñaron fueron DANA (ácido 2-desoxi-2,3-didehidro-N-acetilneurámico) y FANA (ácido 2-desoxi-2,3-didehidro-N-trifluoroacetilneurámico) que fueron los pioneros en el desarrollo de esta ruta de acción (Figura 2.2).

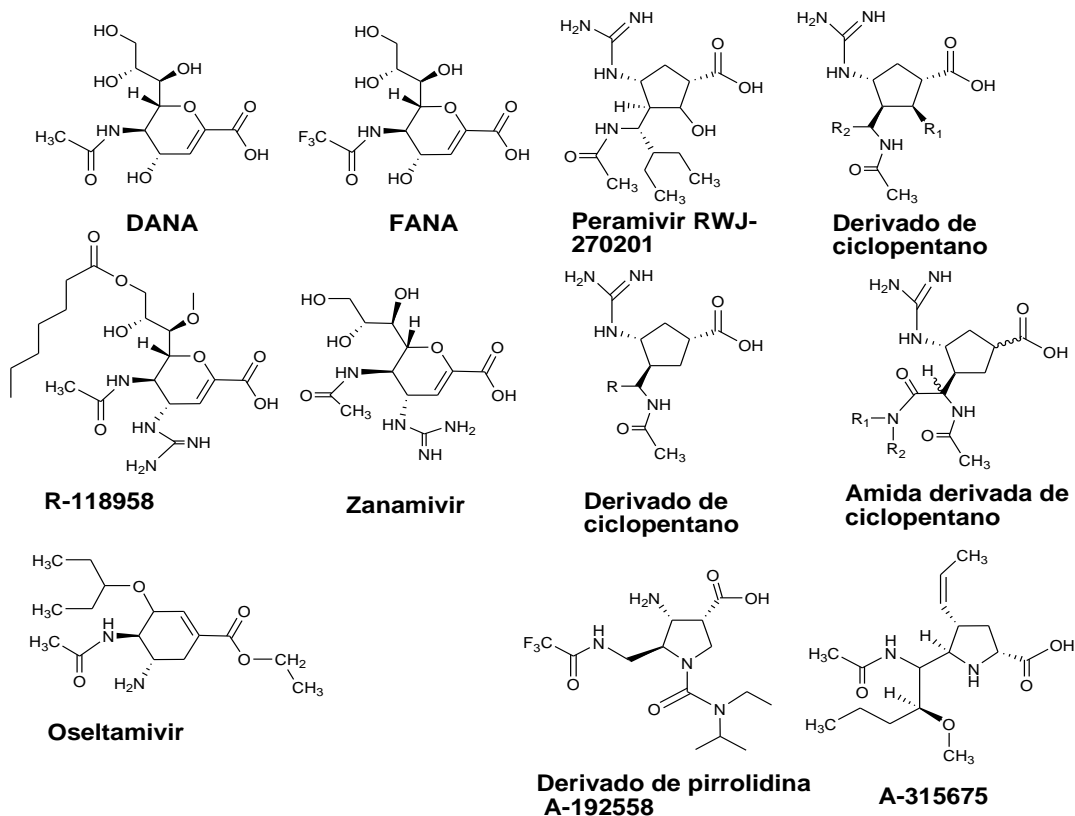


Figura 2.2 Inhibidores de la Neuraminidasa

El primer inhibidor clínicamente efectivo y aprobado para el tratamiento de la influenza en 1999 fue el zanamivir; que consiste en un derivado deshidratado del ácido siálico en el que un grupo guanidilo reemplaza al grupo OH en la posición del carbono 4. El fosfato de oseltamivir tiene un anillo de ciclohexeno y reemplaza al grupo glicerol por una cadena lipofílica y no presenta grupo guanidilo, este inhibidor también fue aprobado en 1999. Una de las principales diferencias entre ambos inhibidores es que el zanamivir debe administrarse por inhalación (10mg dos veces al día), mientras que el oseltamivir se puede administrar vía oral (75 ó 150mg dos veces al día). Otra diferencia es que oseltamivir es un profármaco que se administra como fosfato de oseltamivir y que necesita la actividad de esterasas hepáticas para transformarlo a su forma activa, el carboxilato de oseltamivir [37].

Aún no existen ensayos clínicos que comparen la eficacia de los inhibidores de M2 respecto a los de NA; sin embargo, si se han realizado ensayos en cuanto a las complicaciones asociadas a la influenza con estos inhibidores. Estudios llevados a cabo en hurones infectados con la cepa A(H5N1) mostraron que el



tratamiento con oseltamivir en una dosis doble de 5mg/Kg, durante 5 días, concluyó en la completa inhibición de la replicación del virus en los pulmones y el intestino delgado, previniendo su mortalidad [38]. Al parecer, este tipo de antivirales presentan menos problemas en cuanto al desarrollo de la resistencia respecto a los inhibidores de M2 y su espectro antiviral incluye a los virus de influenza tipo B.

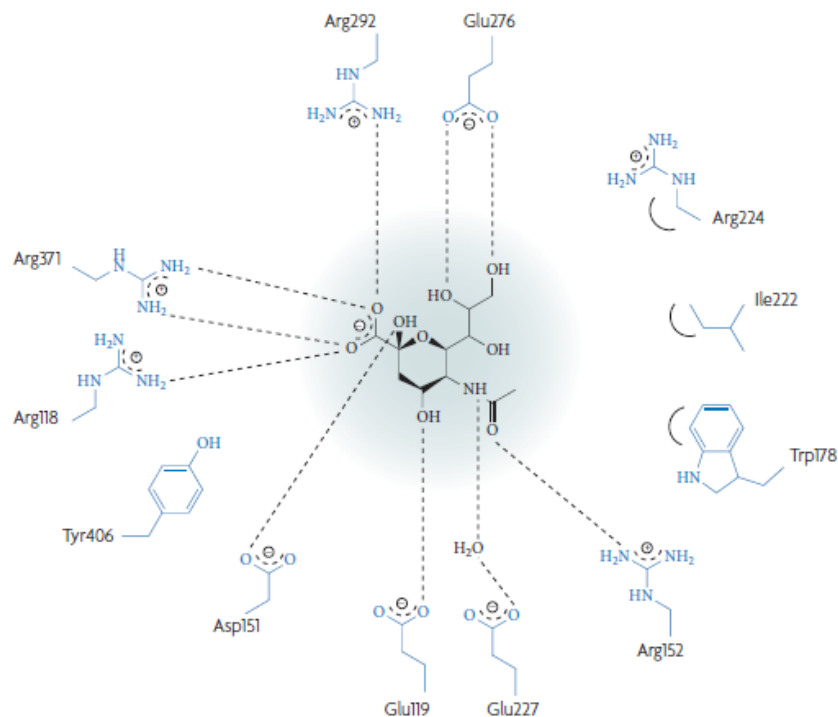


Figura 2.3 Interacciones entre el ácido N-acetil-neuramínico y el sitio activo de la neuraminidasa.

Aunque la neuraminidasa también tiene la función de prevenir la inactivación del virus por las mucinas respiratorias durante el inicio de la infección [39]; los inhibidores de la NA se unen a la arginina de la posición 292 a través del ácido carboxílico y al ácido glutámico ubicado en la posición 119 mediante su grupo amino (en oseltamivir) o guanidino (en zanamivir). Ambas interacciones corresponden al sitio enzimáticamente activo para bloquear la función de sialidasa, impidiendo la liberación de los viriones de las células infectadas y su diseminación por el tracto respiratorio (Figura 2.3). Con base en esto, no es extraño que mutaciones en ambos sitios (R292K y E119G) produzcan resistencia hacia los dos inhibidores [38].

### 2.2.2.1 Resistencia de inhibidores de la NA

La resistencia hacia los inhibidores de la neuraminidasa surge debido a las mutaciones puntuales con la correspondiente sustitución de aminoácidos en las proteínas HA y NA. El análisis de los virus mutantes aislados en cultivo celular, reveló dos mecanismos de resistencia.

A) Disminución de la HA por su receptor; las mutaciones que involucran a la proteína HA aminoran la fuerza de unión con el ácido siálico y, de esta manera, también reducen la dependencia de la actividad de la NA.

B) Disminución de la unión entre la NA y su inhibidor [40].

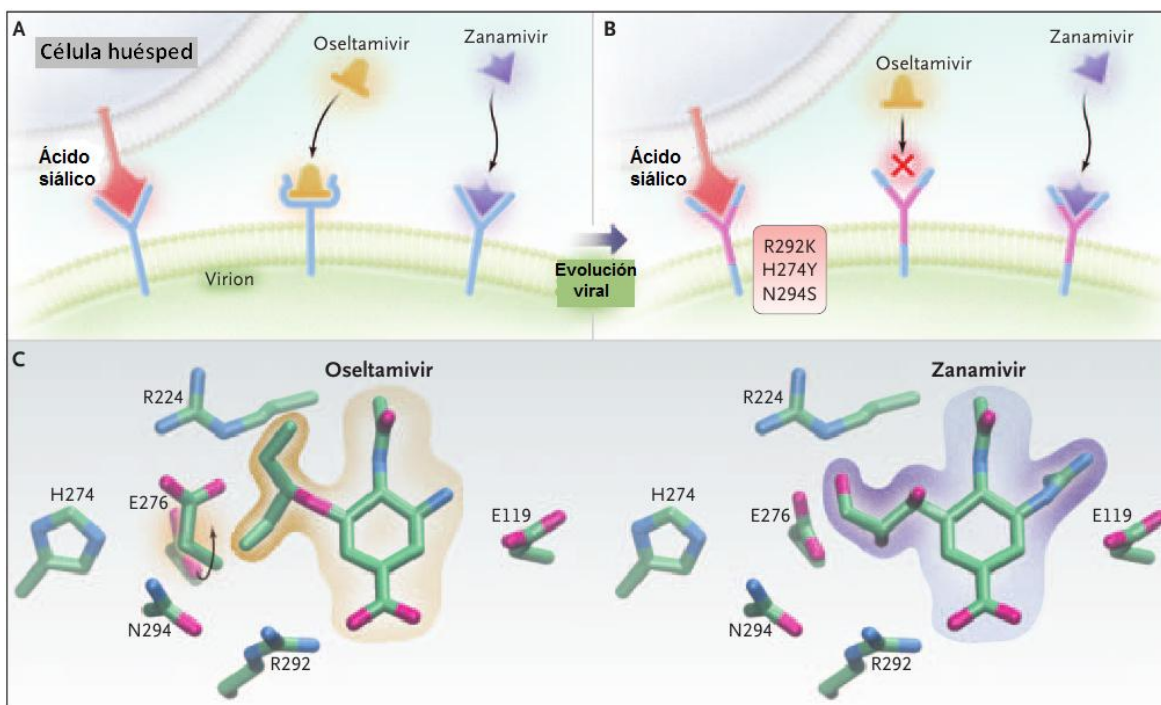


Figura 2.4 Mecanismo de resistencia al oseltamivir. **A**) El sitio activo de la neuraminidasa adquiere una conformación espacial para el oseltamivir, mientras que para el zanamivir no es necesario. **B**) Varias mutaciones evitan la formación de este espacio, pero sigue manteniendo la capacidad de unirse al ácido siálico y el zanamivir. **C**) Dicho espacio es creado por la rotación de E276 y la unión al aminoácido R224 impedida por las mutaciones R292K, H274Y y N294S. La mutación E119V permite la unión a una molécula de agua en el espacio creado por la valina. También interfiriendo la unión a oseltamivir. Adaptado de Moscona, A. The New Eng. Jour Of Med. 2004; 353: 2634

Durante los últimos años, se ha estado vigilando de cerca la resistencia al oseltamivir en todas partes del mundo (Figura 2.4). Dicha resistencia se evalúa mediante la detección de la mutación H274Y por técnicas de biología molecular (amplificación genética y/o pirosecuenciación). En EE.UU., se reportó que durante

la temporada 2007-2008 hubo un incremento en el número de aislamientos de virus de influenza A(H1N1) resistentes al oseltamivir, mientras que en Europa era el 14% del total [11].

Existen otros inhibidores experimentales, como el A-315675, R-118958 y peramivir que también son análogos de NANA, que inhiben a la neuraminidasa en modelos animales e *in vitro*. En el caso de este último fue aprobada su liberación ocasional para el tratamiento de las personas cuyo cuadro de influenza se agravó durante la pandemia 2009/2010 ya que estos nuevos inhibidores derivados de la pirrolidona o el ciclopentano son activos contra las nuevas cepas resistentes a oseltamivir y zanamivir [41]. La vigilancia del comportamiento del virus es crucial, en especial los patrones de susceptibilidad y resistencia a oseltamivir y zanamivir, ya que constituyen la única medida farmacológica efectiva contra el virus.

## 2.3 Posibles opciones terapéuticas futuras

### 2.3.1 Inhibidores diméricos de la NA

A partir del zanamivir se han preparado derivados bicíclicos del 7-alquiléter, estos disminuyen la actividad del virus de la influenza *in vitro* y proporcionar protección y eficacia *in vivo* (ratones). Los derivados diméricos del zanamivir comprenden grupos de 14-18 átomos de longitud y son 100 veces más efectivos para inhibir la replicación del virus de la influenza *in vivo* e *in vitro*, respecto al zanamivir.

Estos nuevos derivados además presentan un mayor tiempo de permanencia en los pulmones, permitiendo un régimen de dosificación de una vez por semana. Debido a la baja concentración necesaria para la inhibición, estos compuestos podrían presentar menores efectos adversos; por lo que se les perfila como inhibidores de la NA de segunda generación [42] [43].

### 2.3.2 Análogos de nucleósidos

La ribavirina es un fármaco aprobado por la FDA con particular actividad contra los virus de los géneros *Orthomyxoviridae* y *Paramyxoviridae*. Aunque este fármaco se ha aprobado únicamente para las infecciones provocadas por el virus

respiratorio sincitial, no se ha descartado la posibilidad de comercializarlo para el tratamiento de virus de la influenza. Ya que ha probado ser eficaz con una  $CI_{50}$  6-22 $\mu$ M. También es utilizado en el tratamiento de la hepatitis C crónica de manera conjunta con interferón  $\alpha$ -pegilado.

Uno de los aspectos importantes de este tipo de fármacos es que no genera resistencia en los virus, debido a que su línea de acción principal es una enzima intracelular, la inosina 5'-monofosfato (IMF) deshidrogenasa, responsable de la conversión de IMF a xantosina, que es un paso fundamental para la biosíntesis de GTP y la consecuente producción de RNA viral.

No obstante, los factores limitantes para la venta de este fármaco son presentar el índice terapéutico pequeño, en altas dosis provoca anemia hemolítica y es un agente teratogénico potencial. Hoy en día se trabaja en un análogo denominado viramidina (un profármaco de ribavirina) que aparentemente es menos tóxico [44].

### 2.3.3 Inductores de interferón

Otra opción terapéutica estudiada es el empleo de inductores del interferón. Hace 40 años, se descubrieron los inductores poly(I) y poly(C). Aún se desconoce el impacto que pueda llegar a tener la utilización de estos para la profilaxis contra la influenza. La administración consiste en RNA de doble cadena encapsulado en liposomas y se tiene la hipótesis que pudiera proveer protección de larga duración [45].

### 2.3.4 Inhibidores de la RNA polimerasa

La polimerasa viral consiste en un complejo de tres polipéptidos (PB1, PB2 y PA). Este complejo además posee actividad de endonucleasa que le permite llevar a cabo el proceso de inserción en el ARNm (cap snatching)<sup>1</sup>, necesario para iniciar la transcripción. Los genes involucrados en la producción de esta polimerasa son los que le imparten una alta virulencia al virus H5N1 A/Vietnam/120/04, por lo que es viable desarrollar un inhibidor de la polimerasa

---

<sup>1</sup> Es el proceso inicial a la transcripción, se inserta una secuencia de entre 10 a 20 nucleótidos en el extremo 5' del RNAm de la célula huésped.

viral como opción terapéutica. Se han obtenido pocos inhibidores, estos pueden ser clasificados en nucleósidos y no nucleósidos [46].

Ejemplos de nucleósidos son el T-705 y el 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina. El más representativo de estos es el T-705, consiste en una pirazina sustituida. Ensayos llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* sobre este inhibidor han demostrado que posee una fuerte actividad antiinfluenza, incluso mayor al oseltamivir [47].

Por otro lado, también se ha planteado la idea de inhibir la actividad de endonucleasa del complejo, para esto se usan derivados del ácido 2,4-dioxibutanoico, ácido N-hidroxámico y N-hidroxi-imida. Además, se ha identificado un inhibidor proveniente del extracto del hongo *Delitschia confertaspora* denominado flutimida que consiste en una 2,6-dicetopiperazina [48].

### 2.3.5 siRNA

El RNA de interferencia (RNAi) es una manera innovadora de inhibir la expresión génica. El RNA pequeño de interferencia (siRNA) consiste en pequeñas cadenas dobles de 21-26nt que inducen la degradación del RNAm homólogo. En un estudio en ratones, se administró RNAi vía intranasal, específico para las regiones altamente conservadas del virus como la polimerasa ácida y las nucleoproteínas, se acoplejó con un acarreador policationico para probarlo antes y después del inicio de la infección viral. Al final, se observó que los títulos de virus de influenza se redujeron. Dicha acción fue específica y no fue modulada por una respuesta secundaria antiviral, como por ejemplo la del interferón. Por último, protegió a estos huéspedes de cuatro cepas aviares diferentes [49] [50].

### 2.3.6 Proteínas de fusión de sialidasa y sialilglicopómeros

Recientemente, se ha encontrado que una proteína de fusión recombinante de *Actinomyces viscosus*, una bacteria que forma parte de la flora habitual del intestino y la cavidad oral, presenta un amplio espectro de inhibición contra el virus de la influenza. Dicha proteína consta de la región catalítica de la sialidasa de esta bacteria. Se aplica por inhalación para llegar a los receptores del virus de la influenza en el epitelio de las vías respiratorias. Esta sialidasa nombrada DAS181 (fludase®) remueve los receptores de ácido siálico, con una correspondiente

protección celular, a dosis de 0.04-0.9nM *in vivo*, tanto en indicaciones terapéuticas como profilácticas [51].

Por otro lado, los receptores de ácido siálico (NANA) a su vez pueden ser bloqueados por conjugados de poliacrilamida con NANA, también denominados sialilglicopolímeros (SGP). Estos inhiben la unión del virus de influenza a las células en un intervalo de 24-110hrs, una vez iniciada la infección. Los SGP fueron evaluados en ratones con las cepas A(H1N1) y A(H3N2) adaptadas y previno completamente la mortandad de estos. Estos SGP tienen la región SA $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc, que es reconocida por las cepas de la influenza A y B [52].

## Capítulo 3. Oseltamivir: Un problema de abasto

### 3.1 Oseltamivir

Una de las principales preocupaciones de las naciones en el tema de la influenza es el abasto en un tiempo relativamente corto de agentes terapéuticos que cumplan con los requisitos de seguridad y eficacia. Para lo cual se están llevando a cabo investigaciones que intentan manejar dentro de nuevas y diferentes rutas de acción este problema. Sin embargo, hasta el momento los medicamentos que cumplen dichos requisitos son el oseltamivir y el zanamivir.

Para observar el impacto que pudieran tener ambos fármacos ante un posible brote, se realizó un modelo matemático con la población de Inglaterra, tomando en cuenta los intervalos de edad y los grupos de riesgo, incluyendo la tasa de hospitalización de 1957. Finalmente, el modelo determinó que se requiere un almacenamiento de medicamentos equivalentes al tratamiento de entre el 20% al 25% de la población total para tratar a los pacientes del primer brote y se estimó una reducción en la hospitalización del 67% [53].

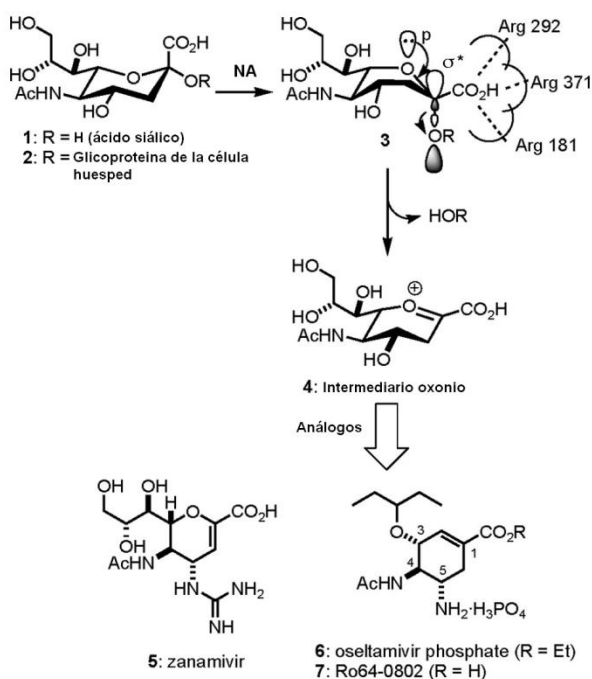


Figura 3.0 Hidrólisis del ácido siálico y diseño de inhibidores de la NA

Este fármaco es el resultado del estudio del complejo ácido siálico-NA. En el agua, la conformación más estable de NANA es la de silla, con el grupo

carboxilo del C1 en la posición axial. Una vez que éste se une con la NA, adquiere una conformación de bote que se estabiliza por las interacciones entre el grupo carboxilo y tres residuos de arginina que se encuentran en el sitio activo de la NA. En la conformación de bote, el par de electrones libres del oxígeno en el anillo de pirano se coloca antiparalelamente al enlace glicosídico. Este enlace glicosídico se rompe a través de la superposición  $p-\sigma^*$  de los orbitales y se genera el intermediario oxonio, del que son análogos el zanamivir y el oseltamivir [54] (Figura 3.0).

Uno de los principales obstáculos en la producción a gran escala de oseltamivir es la escasez del precursor principal que se obtiene de plantas, el ácido siquímico (Shi). Actualmente el ácido se extrae del anís estrella chino (*Illicium verum*). Para producir 1 Kg de Shi se necesita 30 Kg de material vegetal seco [55] (Figura 3.1).

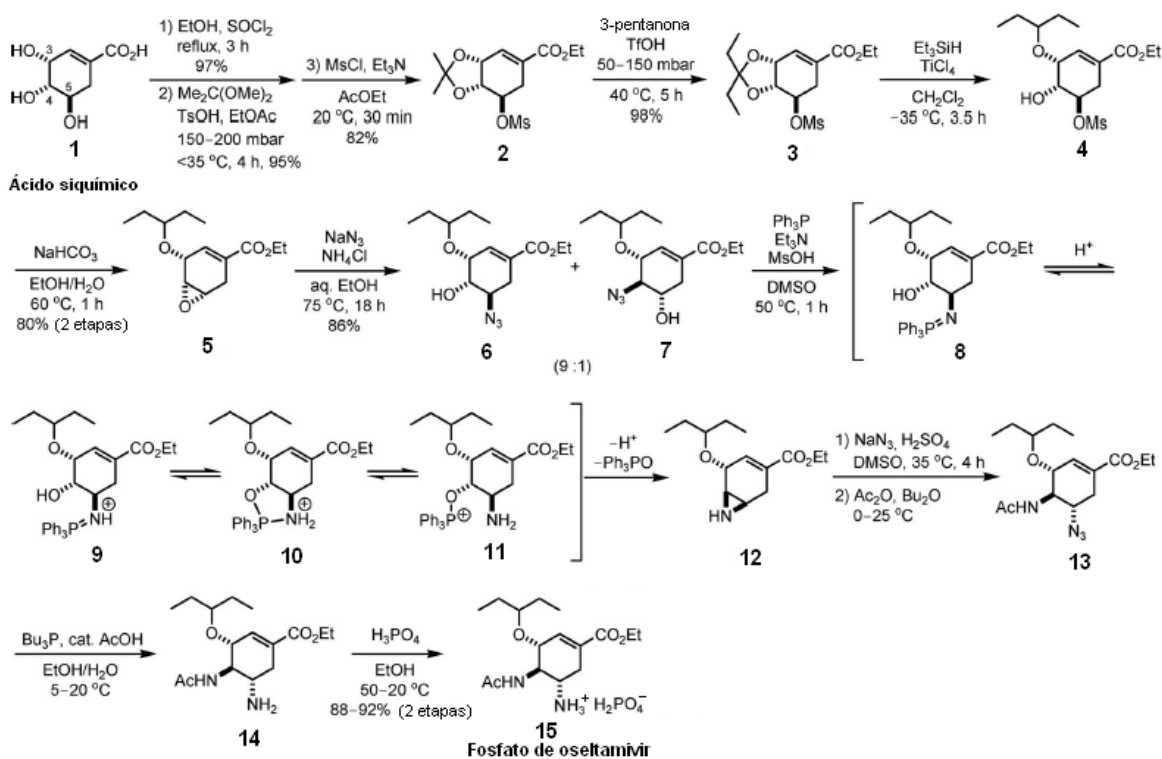


Figura 3.1 Proceso de síntesis de oseltamivir desarrollado por Roche.

El primer equipo en sintetizar oseltamivir a partir de un producto natural fue el grupo de química medicinal de Gilead Sciences, utilizando Shi como materia



prima. Posteriormente laboratorios Roche, utilizando estos avances perfeccionó la metodología en lo que hoy es la síntesis industrial del oseltamivir (Figura 3.1).

Dada la variabilidad de la pureza del ácido siquímico. A partir de los cristales del acetónido **2**, se efectúa un intercambio de cetales en presencia de 3-pentanona. Por lo que el intermediario **3** se obtiene indirectamente del Shi. Posteriormente, se produce una apertura reductiva regioselectiva del grupo cetal para obtener el compuesto **4** que se transforma al epóxido **5** bajo condiciones básicas. La apertura del epóxido produce la mezcla de alcoholes ácidos **6** y **7**, ambos se convierten a la aziridina **12**. Ésta sufre una N-acetilación y la azida se somete a una reducción de Staudinger para, finalmente, producir la sal del fármaco [56].

Estados Unidos ha planeado almacenar 300 millones de dosis de tamiflú de 75 mg, para lo cual se requieren 23 toneladas de oseltamivir. A su vez, éste se obtiene de un rendimiento del 20% de la serie de reacciones necesarias para su síntesis, por lo que resulta que se necesitan alrededor de 3375 toneladas de anis estrella para obtenerlos [55].

Debido a la alta demanda del oseltamivir a partir de la pandemia en el año 2005 del virus A(H5N1) en Asia y a la dificultad de abastecer en cantidades industriales el ácido siquímico, varios grupos de académicos e investigadores se dieron a la tarea de buscar otras alternativas de síntesis en las que no fuera necesaria la utilización de dicha materia prima. Se han desarrollado variaciones con la síntesis de Diels Alder e investigado métodos catalíticos innovadores para este trabajo (Cuadro 3.1) [57] [58].

<b>Cuadro 3.1. Metodologías de síntesis de oseltamivir</b>					
<b>Año</b>	<b>Autor</b>	<b>Pasos clave</b>	<b>Utilización de azidas</b>	<b>Número de reacciones</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
1999	Roche	<ul style="list-style-type: none"> <li>Apertura reductora regioselectiva</li> <li>Reacción de Staudinger</li> </ul>	Si	8	20
2006	Corey	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diels-Alder catalítica y enantioselectiva</li> <li>Bromolactamización</li> <li>Bromoamidación estereoselectiva</li> </ul>	No	12	30
2006	Shibasaki	<ul style="list-style-type: none"> <li>Apertura catalítica y asimétrica de <i>meso</i>-aziridinas</li> </ul>	Si	17	1
2007	Fukuyama	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diels-Alder catalítica y enantioselectiva</li> </ul>	No	14	6
2007	Kann	<ul style="list-style-type: none"> <li>afinación estereoselectiva de un complejo de Fe</li> </ul>	Si	16	4
2007	Fang	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reacción de Horner-Wadsworth-Emons intramolecular</li> </ul>	No	17	10
2008	Trost	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aminación alílica asimétrica catalizada por Pd</li> <li>Aziridinización catalítica</li> </ul>	No	8	30
2008	Roche	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hidrogenación catalítica</li> <li>Desimetrización enzimática</li> </ul>	Si	10	30
2008	Fang	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bromoacetamidación regio y estereoselectiva</li> </ul>	No	11	22
2008	Shibasaki	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diels-Alder catalítica y enantioselectiva</li> <li>Transposición de Curtius</li> <li>Sustitución alílica con Pd</li> </ul>	No	12	16
2009	Hudlicky	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oxidación enzimática</li> <li>Reacción de Diels-Alder</li> </ul>	No	13	7
2010	Ma	<ul style="list-style-type: none"> <li>Adición organocatalítica de Michael</li> </ul>	No	5	46
2010	Hayashi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Organocatálisis enantioselectiva</li> <li>Reacción de Michael enantioselectiva</li> </ul>	Si	10	60
2010	Lu	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reacción asimétrica de aza-Henry</li> <li>Reacción de Nitro-Michael/HWE</li> </ul>	No	11	21
2011	Raghavan	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reacción asimétrica de Diels-Alder</li> <li>Inversión de Mitsunobu</li> </ul>	Si	16	4.3

Nota: Salvo la síntesis correspondiente a 1999, las demás son alternativas al ácido siquímico como materia prima.

De todas estas propuestas sobresale la de Corey y colaboradores, pues fueron los primeros en proponer una síntesis alternativa al Shi. Ellos reportaron una reacción de Diels-Alder asimétrica empleando 1,3 – butadieno y trifluoroetilacrilato como materias primas. Esta nueva metodología proporciona un alto rendimiento en la cicloadición enantioselectiva mediante la aplicación de oxozaborolidina (**16**). En seguida, se efectuó una amidación (**18**), yodo-

lactamización (**19**) y protección del compuesto obtenido con BOC para dar **20**. Se hace una deshidrohalogenación del compuesto **20** y se realiza una brominación alílica (**22**), deshidrohalogenación que resulta en **23** y después una bromoamidación estereoselectiva desarrollada por los autores para dar **24**. Después tras una deshidrohalogenación se obtiene un intermediario de aziridina (**25**) que se acopla en forma regioselectiva en presencia de 3-pentanol para dar **26**. Finalmente, la desprotección de **26** da como resultado el fosfato de oseltamivir (**15**) [59] (Figura 3.2).

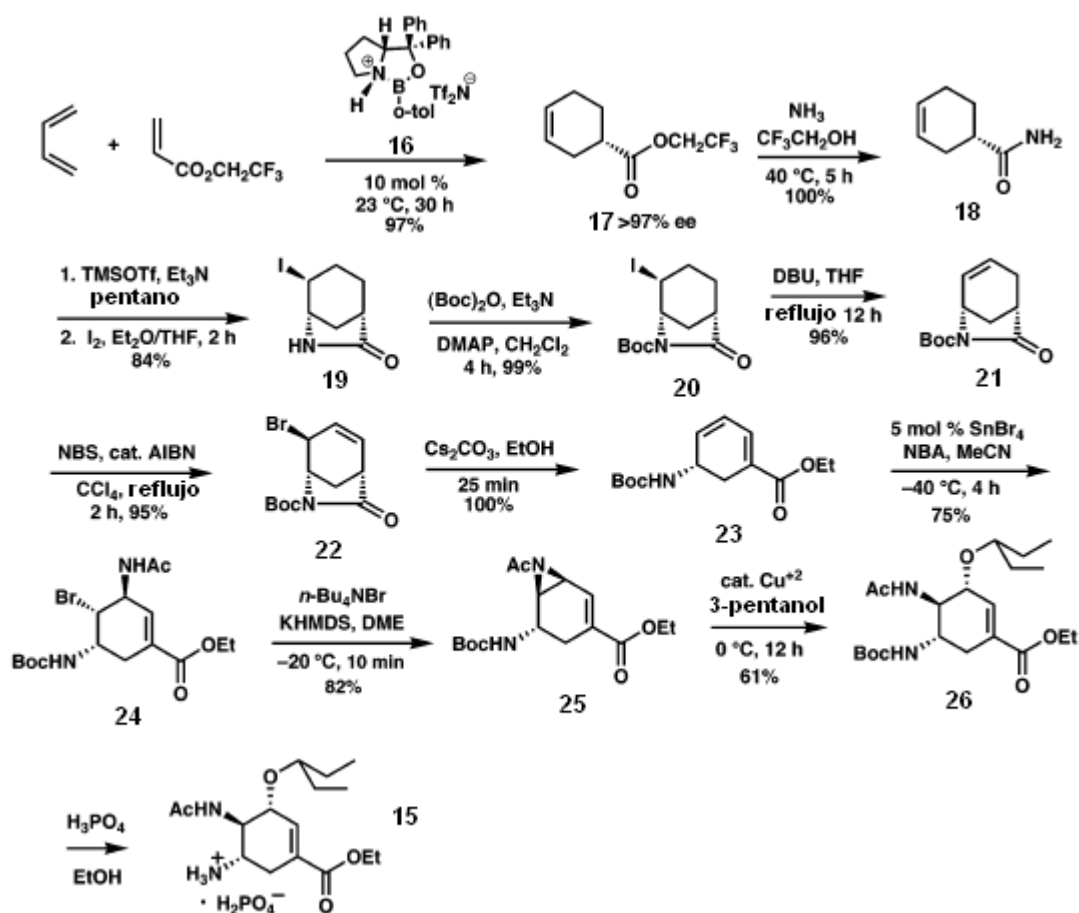


Figura 3.2. Síntesis de oseltamivir propuesta por Corey y cols.

Otra síntesis que se debe mencionar es la de Hayashi, por el rendimiento obtenido, la utilización de materias primas disponibles y el número de reacciones que involucra. El primer paso de esta metodología se trata de una reacción con difenilprolinol silil éter, este es un compuesto que realiza una organocatálisis enantioselectiva y con alto rendimiento, que promueve varios tipos de reacciones

asimétricas. Este junto con el alcoxialdehído **28** y el nitro alqueno **29** proporcionan el aducto de Michael **33** y sólo se requiere 5% mol de catalizador. Posteriormente, el nitro alcano (**33**) interactúa con el derivado de vinil fosfonato (**30**) mediante una reacción de Michael, el nuevo producto reacciona bajo una reacción intramolecular de Horner-Warsworth-Emmons con el grupo formilo para generar el ciclohexeno **34**. Al final de esta reacción, se generaron los subproductos **35** y **36** que se transformaron en **34** con  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  en EtOH. Se obtiene **34** en una mezcla de diastereómeros en la que predomina el isómero **34**-(5R), entonces se realiza una adición de Michael con paratoluenotiol. Aunque primero se forma el isómero **31**-(5R), la mezcla termina con el isómero **31**-(5S) en mayor proporción debido a que es el más estable en condiciones alcalinas, este es el isómero deseado. Se desprotege a **31** con  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  y el ácido carboxílico se transforma en acilazida por la adición de cloruro de oxalilo y luego de  $\text{NaN}_3$  en acetona acuosa, lo que proporciona al compuesto **32**. Cuando **32** se trata con AcOH en  $\text{Ac}_2\text{O}$  se desarrolla una transposición de Curtius que conduce a **37**. Este producto se trata con Zn/HCl en EtOH para que el grupo nitro se transforme en amino (**38**). Se bombea amoníaco a la mezcla de reacción para formar el complejo  $\text{ZnII-NH}_3$ . Finalmente, la adición de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  provoca una reacción retro-Michael (Figura 3.3) [60].

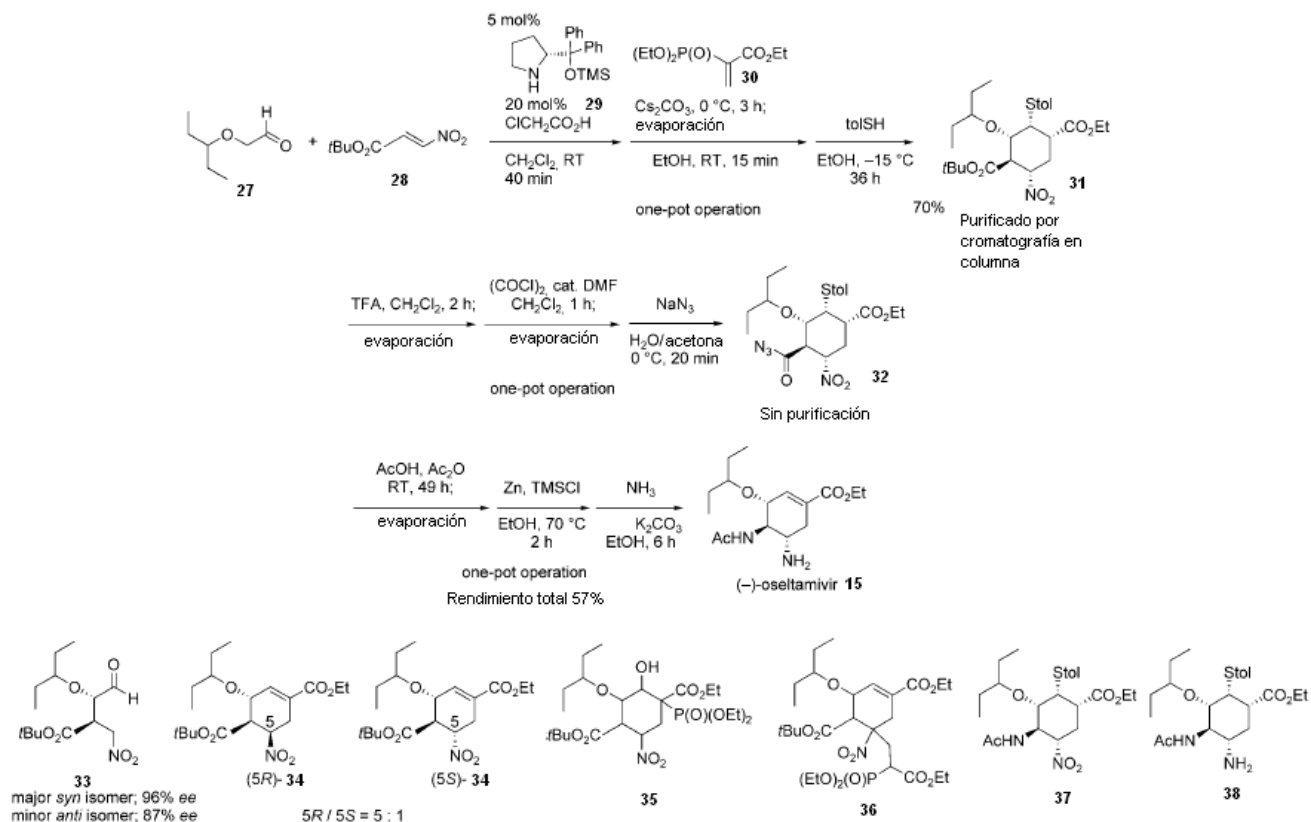


Figura 3.3. Síntesis de oseltamivir propuesta por Hayashi y colaboradores.

Varias de las síntesis propuestas, aparentemente se encuentran dentro del orden práctico. Por ejemplo, la de Fukuyama que aunque requiere perfeccionamiento en cuanto al rendimiento, destaca por los siguientes puntos: (1) la piridina como materia prima no es cara, (2) el número de purificaciones por cromatografía en columna es mínima y (3) que se utilizan reactivos seguros y comúnmente utilizados en la síntesis. La síntesis propuesta por Hudlicky utiliza como materia prima el benzoato de etilo que es bastante barato y disponible; sin embargo, se debe hacer un exhaustivo análisis de costo y escalamiento para corroborar que alguna de estas síntesis es segura y competitiva con la manufacturación actual. Por lo que hasta el momento, el mayor obstáculo para la obtención de oseltamivir es la escasez de ácido siquímico.

### 3.2 Ácido siquímico

El ácido siquímico es un metabolito importante para las plantas y algunos microorganismos. Debe su nombre a la flor de shikimi (*Illicium anisatum*) de donde se aisló por Eykman en 1885, luego se encontró que existe en las hojas y frutos de varias plantas en diferentes proporciones.

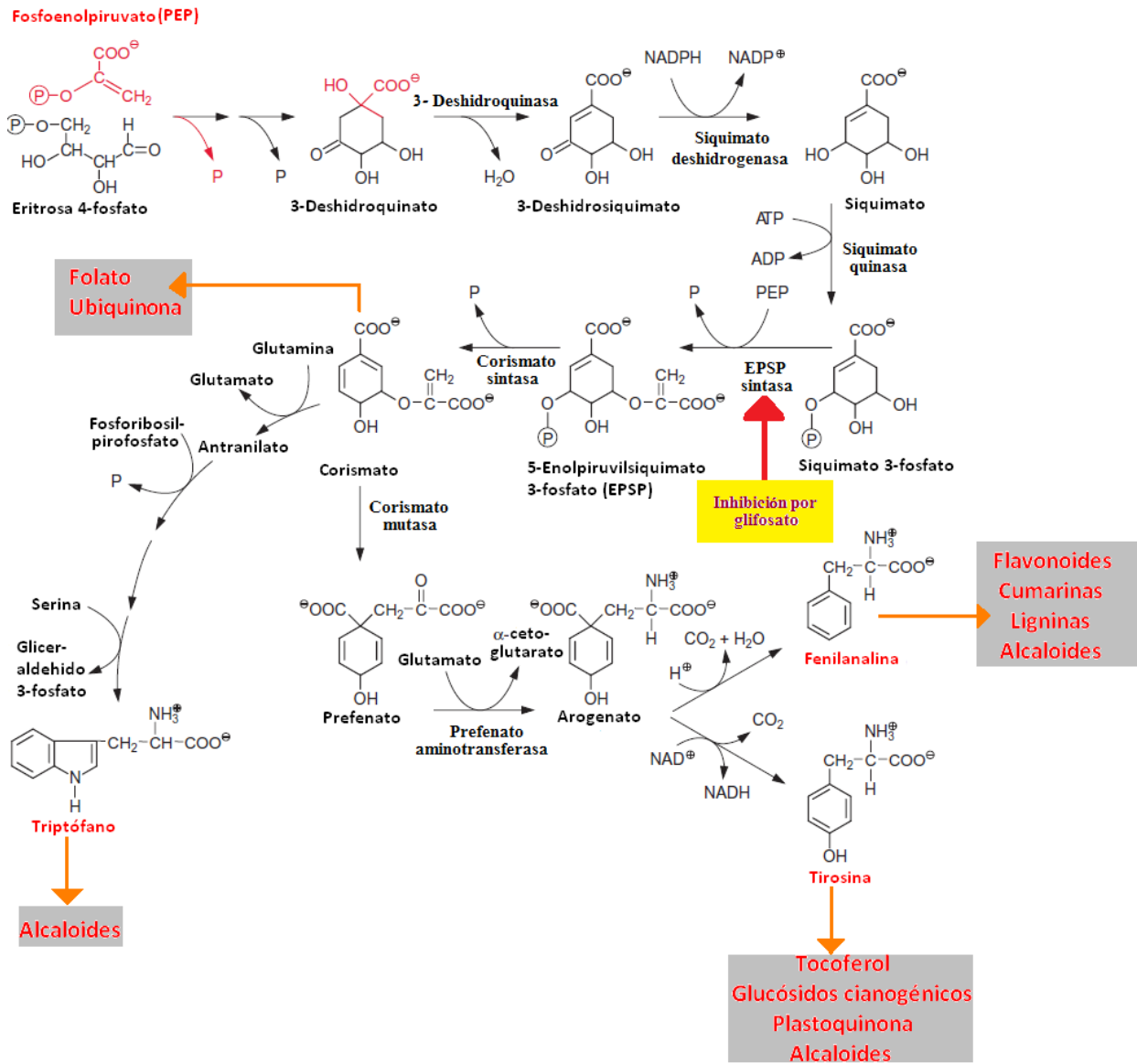


Figura 3.2.1. Ruta del ácido siquímico. Modificado de Held, H. *Plant Biochemistry*. 4<sup>th</sup> Ed. USA Academic Press: 298

La ruta del ácido siquímico proporciona los tres aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Además provee precursores para una gran

variedad de compuestos que se forman en las plantas, alcaloides, fenilpropanoides, taninos, flavonoides y lignanos. Los productos derivados pueden llegar a constituir una elevada proporción de la célula, se estima que en algunas plantas hasta el 50% del material seco. Es por eso que la producción del Shi representa una de las rutas metabólicas más importantes en las plantas [61].

Esta biosíntesis no se encuentra en los mamíferos, por lo que se han desarrollado inhibidores de ella contra agentes patógenos, por ejemplo el ácido (6S)-6-Fluorosiquímico, un potente antibiótico que actúa inhibiéndola en *Plasmodium falciparum*, el agente causal de la malaria [62]. También, análogos para inhibir la enzima deshidroquinasa de *Micobacterium tuberculosis*, un microorganismo que se caracteriza por ser resistente a varios antibióticos [63].

El hecho de que esta ruta metabólica sea usada por bacterias, hace posible también que organismos manipulados mediante ingeniería genética sean utilizados para la producción en gran escala de este metabolito. Hasta el momento se ha tenido éxito con *E. coli*, pero se han hecho ensayos con *Bacillus sp.* y *Citrobacter sp.* Las modificaciones realizadas se enfocan principalmente en el metabolismo del carbono y la ruta del ácido siquímico. Existen dos avances en el desarrollo de estos microorganismos, uno de ellos es bloquear la ruta mediante la eliminación del paso hacia siquimato-3-fosfato realizado por la siquimatoquinasa, la otra es el desarrollo de cepas con deficiencia en la enzima EPSP sintasa que bloquea la producción de aminoácidos después de producir el siquimato-3-fosfato [64]. En la actualidad, la fermentación de estos organismos modificados desarrollados por Frost et al., proporciona alrededor del 30% de Shi utilizado para la síntesis de oseltamivir [65].

### 3.2.1 Síntesis de ácido siquímico

La primera vez que se sintetizó ácido siquímico fue en 1960 por McCrindle y colaboradores., utilizando la reacción de Diels-Alder para formar un anillo de 6 carbonos, obteniendo un rendimiento total alrededor del 15%. En 1982, se aumentó la eficiencia de la síntesis hasta el 29% y Koreeda et al., propuso una síntesis más eficiente, en la que se alcanzó un rendimiento del 55%.

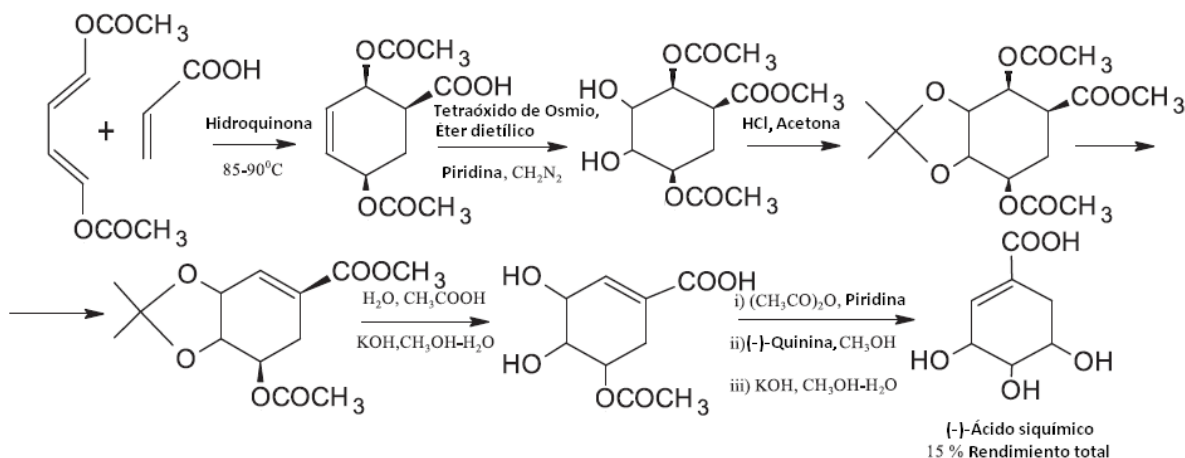


Figura 3.2.2. Síntesis de Ácido siquímico mediante la reacción de Diels-Alder (Mc Criadle et al., 1969)

También se ha reportado la síntesis a partir de azúcares como la D-manosa, la conversión del ácido quínico y algunos derivados de este [66]. Aunque se han desarrollado varias metodologías de síntesis, la producción de Shi por estos medios es demasiado cara en cantidades industriales. Por lo que el aislamiento de los frutos del anís estrella continua siendo la principal fuente comercial.

### 3.2.2 Fuentes vegetales de ácido siquímico

El anís estrella (*Illicium verum H.*) es un árbol mediano, de alrededor de 15 m originario de Asia. Los frutos de donde se obtiene el ácido siquímico se cosechan entre los meses de marzo a mayo. Crece casi exclusivamente en el sureste de China y Vietnam. Dicho fruto es valorado como especia en la elaboración de perfumes y en la medicina tradicional china (Figura 3.2.2.). Se emplea en el tratamiento de problemas de vómito, dolores de estómago, de la espalda baja, insomnio, inflamación de la piel y dolores reumáticos. En México y EE.UU., su uso más común es como carminativo y en el alivio de dolores de estómago de los bebés [67] [68].





Figura 3.2.3. *Illicium verum* J. D. Hooker. 1- rama con flores y fruto; 2-5 pétalos exteriores e internos; 6-andreceo y gineceo; 7-gineceo; 8-vistas adaxial y abaxial del estambre; 9-folículo; 10-semilla.

El aceite esencial de *I. verum* posee propiedades antifúngicas. Los extractos etanólico y con CO<sub>2</sub> supercrítico presentan actividad contra bacterias resistentes en la clínica, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y otras 20 cepas resistentes a meticilina. Tradicionalmente, el aceite esencial del anis estrella se coloca tópicamente para los dolores reumáticos. Dicho aceite y el extracto con metanol también han mostrado propiedades insecticidas, comprobadas sobre *Drosophila melanogaster* y larvas de *Callosobruchus chinensis* [68] [69].

*Illicium verum* es una planta rica en lignanos como el verimol H y sesquiterpenoides como la neoanisatina, estos compuestos son únicos de la especie *Illicium*, lo que los convierte en compuestos marcadores específicos [94].

Además se han desarrollado métodos para la identificación de esta planta, como microscopía por fluorescencia, PCR, cromatografías de gases y de líquidos debido a los reportes sobre productos comerciales, como el té, adulterados o contaminados con el anís estrella japonés (*Illicium anisatum*), una planta altamente tóxica por su contenido en neoanisatina y anisatina. En los casos de intoxicación se han observado toxicidad neurológica y gastrointestinal, convulsiones, diarrea y vómito. En China, además se ha encontrado que el anís estrella se adultera con otras especies tóxicas como *Illicium lanceolatum* [70].

Debido a la insuficiencia de materia prima para la producción de oseltamivir, se han buscado otras alternativas agrícolas diferentes como las hojas del árbol de *Ginkgo biloba*, de las hojas de pino, de píceas y de las semillas de liquidámbar [71].

Se ha hecho hincapié en la utilización de pino y píceas. Dado que las agujas de pino son abundantes y muy fáciles de obtener, en general en toda Norteamérica, particularmente se ha trabajado con *Pinus sylvestris*. Se considera como una fuente con alto potencial para proveer ácido siquímico en cantidades industriales [72].

El árbol de Ginkgo es uno de los árboles con mayor tiempo sobre la tierra, se pueden encontrar fósiles que datan de más de 200 millones de años, es el único sobreviviente de la familia *Ginkgoaceae*. Es originario de Asia, puede vivir hasta 1000 años y alcanzar una altura de 38m. En China es tratado como árbol sagrado y se ha utilizado en la medicina tradicional por más de 1000 años.

Se han realizado estudios de sus efectos neuroprotectores y antioxidantes. En el tratamiento de esquizofrenia, demencia, enfermedades vasculares periféricas, síndrome premenstrual, tinnitus<sup>2</sup> y vértigo. Existen pocos estudios en donde se evalúa su actividad en hiperlipidemia, varias formas de cáncer, asma, enfermedad de Raynaud y disfunción sexual. La mayor cantidad de los constituyentes medicinales se encuentran en las hojas: flavonoides, trilactonas terpénicas, glicolíidos y bilobalide [73] [74] [75].

---

<sup>2</sup> Percepción de golpes, zumbidos o sonidos en el oído cuando no hay una fuente sonora externa

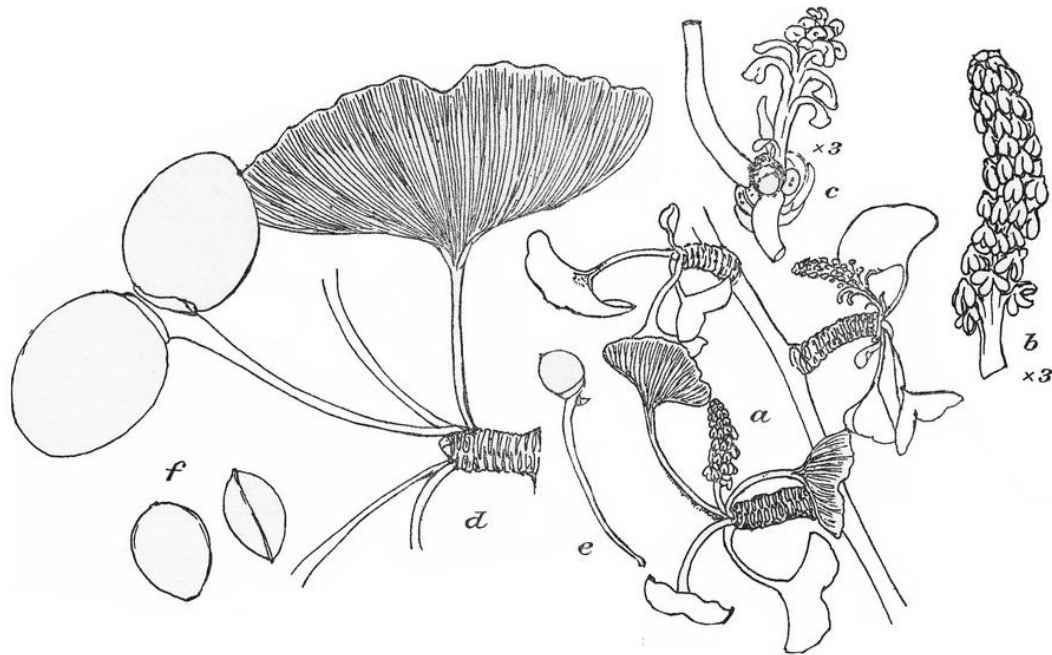


Figura 3.2.4. *Ginkgo biloba*; a-rama con hojas y estambre amento; b-c amentos machos; en c los estambres se han transformado en pequeñas hojuelas; d- brote con dos frutos maduros; e- fruto joven y ovulo infertilizado; f-hueso del fruto.

El liquidámbar (*Liquidambar styraciflua*) es un árbol de ornato, propio de los climas templados, es popular por los colores rojizos intensos que adquiere en el otoño. Llega a medir hasta 41m de alto, su tronco alcanza el 1.20m de diámetro y puede vivir hasta 400 años. Se encuentra principalmente desde el sur de los EE.UU. en los estados de Florida y Texas, México, hasta el sur de Nicaragua. Debe su nombre en alusión a la resina olorosa de color café, con parecido a la miel que exuda del árbol.

Varias tribus de indios nativos americanos han utilizado la resina, la raíz y la corteza de este árbol por sus propiedades medicinales en diarreas, problemas dermatológicos, ginecológicos, como sedativo y febrífugo [93]. La resina también se encuentra mencionada en el código de la Cruz-Badiano como xochiocoztli y era utilizado como complemento en el tratamiento de heridas y dolores de muela [76].

Dentro de los usos comerciales que tiene, están su madera que se utiliza para la elaboración de muebles y la savia que tiene diversos usos. El primer uso

de la resina documentado por Don Bernal Díaz del Castillo describe que era mezclada con tabaco en las ceremonias como un agente inductor del sueño [77].

La savia que se obtiene de *L. orientalis* se le llama estoraque levante, mientras que al de *L. styraciflua* se denomina estoraque americano. En los estudios realizados a este último, se encontró 3-fenilpropilcinamato, cinamil cinamato, etil, bencil y otras formas de ácido cinámico. Para obtener la resina usualmente se hacen cortes en el árbol, similares a la obtención del caucho o el jarabe de arce [78] [79].

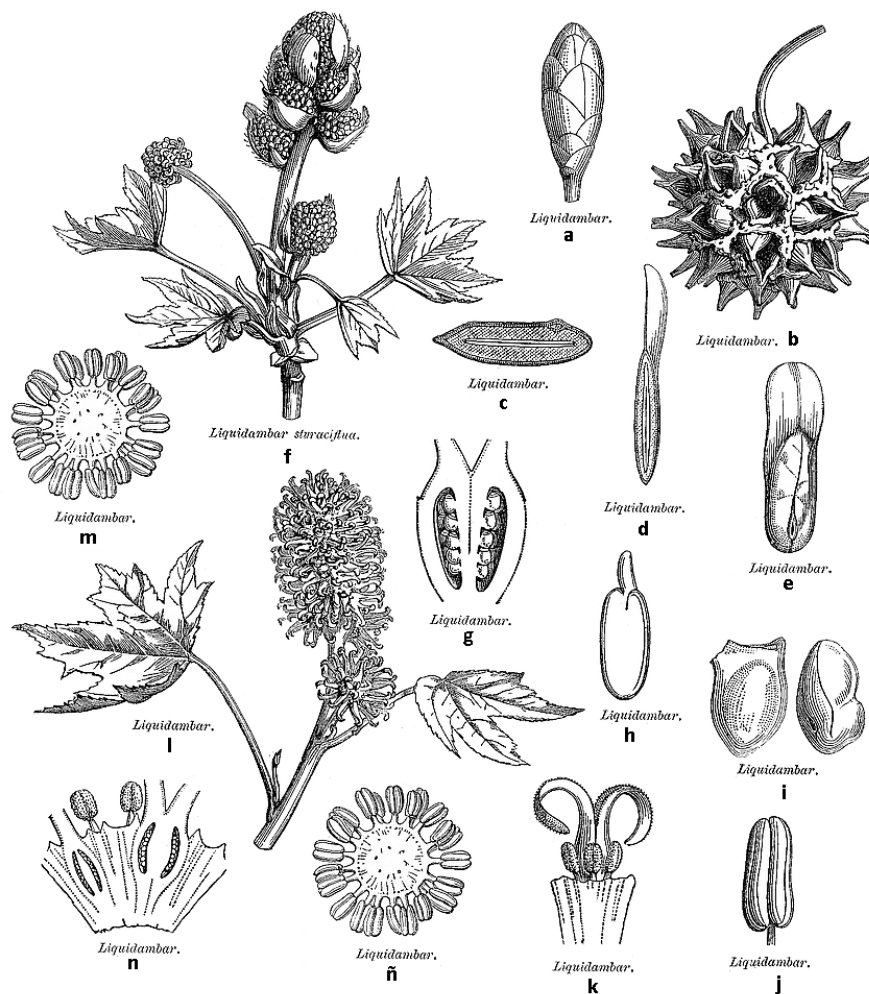


Figura 3.2.5. *Liquidambar styraciflua*; a-brote de flor; b-fruto; c- corte transversal de semilla fértil; d-corte en vertical de la semilla fértil; e-semilla fértil; f-rama con flores macho y hembra; g- sección vertical de ovario; h-embrión; i-semillas abortadas(óvulos); j-estambre; k-estigma y antera abortiva; l-rama con flores hembra; m-sección transversal de amento macho; n-sección vertical de una porción de amento hembra; ñ-sección transversal de amento macho.

Últimamente el extracto metanólico de los frutos de *Liquidambar styraciflua* ha cobrado interés al poseer actividad sobre múltiples dianas de la ruta de la fosfoinositol 3-quinasa y la ruta mTOR (Mammalian target of rapamycin), estas dianas están asociadas a la regulación del crecimiento celular, la proliferación y movilidad. Por lo que dicho extracto pudiera funcionar contra varias enfermedades como la diabetes, el cáncer, la obesidad y la inflamación [80].

Sumada a estas opciones, se ha expuesto la idea de utilizar glifosato (Roundup®), un herbicida análogo del fosfoenolpiruvato desarrollado por Monsanto que actúa a nivel de la ruta del ácido siquímico inhibiendo la 5-enolpiruvil-siquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), produciendo una acumulación anormal de ácido siquímico en la planta. Este método se haría sobre cultivos de alfalfa o trigo de alrededor de 5 semanas, exponerlos a una concentración subletal de glifosato y extraer el ácido siquímico a los 10 días posterior a la exposición [81].

### 3.3 Ácido salicílico, inductor de metabolitos secundarios

En las plantas, se conoce como elicitores a las sustancias químicas que activan las respuestas de defensa. Estas sustancias pueden ser agentes abióticos, compuestos inorgánicos como iones y metales. También se suelen utilizar agentes derivados de otros organismos, como moléculas provenientes de hongos, bacterias, virus ó herbívoros (Cuadro 3.1.1) [82].

Varios estudios realizados han demostrado un reconocimiento específico entre los elicitores microbianos y una cascada de señalización que provoca la activación de mecanismos de defensa. Por ejemplo, el primer receptor de elicitores identificado en una planta fue el FLS2 de *Arabidopsis sp.*, éste es responsable de la identificación de la flagelina bacterial, así también de flg22, que es un péptido de la flagelina constituido de 22 aminoácidos [83].

**Cuadro 3.3 Elicitores de plantas.**

Elicitores						Efectos reportados sobre
Elicitores físicos	Lesiones					P
Elicitores químicos	Abióticos	Iones metálicos (lantano, europio, calcio, plata, cadmio), oxalato				Pc, F
	Bióticos	Composición compleja	Pared celular de levaduras, esporas fúngicas, pared celular de micelio			Pc, F
		Composición definida	Carbohidratos	Polisacáridos	Alginato LGB Pectina Quitosano Goma guar	Pc, F, B F Pc, F Pc Pc
				Oligosacáridos	Manuronato Guluronato Manana Galacturónidos	F F F Pc
			Peptídica	Glutación		Pc
			Proteínica	Proteínas	Celulasa Elicitinas Oligandrin	Pc Pc Pc
			Lipídica	Lipopolisacáridos		Pc
			Glicoproteínica	No caracterizadas		Pc
		Volátiles	C <sub>6</sub> -C <sub>10</sub>		Pc	

Abreviaturas: LGB(locust bean gum), P(planta), Pc(cultivo celular vegetal), B(cultivo bacteriano), F(cultivo fúngico). Modificado de Angelova, Z., et al. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2006, 20: 73

El reconocimiento de un elicitor en la planta usualmente produce acciones como la fosforilación y la desfosforilación de la membrana plasmática y las proteínas del citosol, el desplazamiento iónico, la despolarización de la membrana plasmática, etc. Se activan las oxidasas de NADPH y la peroxidasa apoplástica que producen la acumulación de especies reactivas de oxígeno(ROS), que junto con la producción de moléculas de señalización específicas como etileno, ácido salicílico y jasmonatos inducen una respuesta de defensa tardía, incluyendo la producción de metabolitos secundarios, por ejemplo, las fitoalexinas [83].

El ácido salicílico (AS) y el ácido jasmónico (AJ) han sido estudiados como moléculas involucradas en la expresión de genes de defensa. Se cree que AS regula la resistencia hacia patógenos de tipo viral, bacteriano y fúngico. Mientras que AJ induce la producción de varias proteínas de la ruta octadecanoide que regula la resistencia contra insectos. Esta distinción no está completamente clara;

por ejemplo, los artrópodos pueden inducir ambas. El AS, AJ y derivados sintéticos parecidos pueden ser aplicados exógenamente para inducir los mismos cambios metabólicos que se producen por la resistencia a patógenos y, de esta manera, estimular la producción de metabolitos secundarios [82].

En la industria de los cultivos celulares vegetales, el incremento de la producción de metabolitos secundarios se lleva a cabo mediante la aplicación de elicitors. Generalmente, se consideraba que en las plantas existían cinco clases de hormonas, que son las auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Recientemente, otros compuestos han sido incluidos en esta denominación por provocar reacciones parecidas, como los brasinoesteroides, AJ y AS [84]. Se han reportado varios trabajos en plantas con AS, por ejemplo sus efectos en el crecimiento de las plantas. La aplicación en el follaje (20mg/mL) de *Brassica napus* aumenta el contenido de clorofila [85]. El AS induce el cierre de los estomas y disminuye la tasa de respiración en *Phaseolus vulgaris* [86].

Dentro de los cambios observados en los procesos bioquímicos de las plantas, se ha observado que a concentraciones de 0.01-1.0 mM en asociación con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  aumenta el consumo de nitrógeno y la actividad de la nitrato reductasa en hojas y en la raíz de plantas de maíz, pero concentraciones mayores a 5mM han probado ser inhibitorias [87]. Se ha demostrado que el AS es un agente calorigénico (aumenta la producción de calor) y es un regulador endógeno en la producción de calor, la aplicación exógena de AS (0.13mg/g) en la sección del apéndice inmaduro de lirio voodoo(*Sauromatum guttatum*) da como resultado un incremento de la temperatura de 12°C [88]. Existe evidencia de que el AS afecta la permeabilidad en el flujo de protones de las membranas [89]. Y que modifica significativamente el tiempo de floración en violeta africana(*Saintpaulia ionantha*), al aplicar una concentración  $1 \times 10^{-10}$  M la floración ocurrió 15 días antes que el testigo en condiciones de invernadero [90]. En la producción de metabolitos secundarios, por ejemplo la aplicación de AS aumenta la producción de taxoide en cultivos celulares de *Taxus chinensis* var. *mairiei* [91].

## IV. Objetivos

- Realizar una revisión bibliográfica relacionada con la influenza: pasado, presente y futuro
- Obtener ácido siquímico de una especie de flora mexicana y caracterizarlo por resonancia magnética nuclear

### Objetivos particulares:

- Cuantificar ácido siquímico de las hojas, los frutos y las semillas de *Liquidambar styraciflua*.
- Determinar la época del año en que la producción de ácido siquímico es máxima, mediante el análisis de podas realizadas en intervalos de dos meses a un árbol de liquidámbar durante los años 2010-2011.
- Aplicar ácido salicílico como elicitador para inducir indirectamente la producción de ácido siquímico en el follaje de *Liquidambar styraciflua*.



## V. Metodología

### Reactivos y disolventes utilizados

1. Resina de intercambio iónico IRA-400 en forma de clorhidrato
2. Agua del sistema municipal
3. Agua destilada
4. Acetato de etilo
5. Etanol
6. Metanol
7. Éter
8. Carbón activado en pellets Norit® RO 0.8
9. Carbón activado en polvo
10. Zeolita
11. Ácido salicílico
12. Ácido acético glacial
13. Ácido siquímico al 99%

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Jones y no fueron corregidos.

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI). Las espectroscopias de RMN-<sup>1</sup>H se realizaron en un espectrofotómetro Variant Unity Inova a 300 MHz utilizando D<sub>2</sub>O como disolvente y empleando como referencia interna tetrametilsilicio reportando los desplazamientos químicos en ppm. Abreviaturas utilizadas en la interpretación de RMN-<sup>1</sup>H; s = singulete, t = triplete, m = multiplete. La espectroscopia de infrarrojo se determinó en un aparato Perkin Elmer de transformada de Fourier (FTIR) por reflectancia ATR, reportando las señales en número de onda  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>). La espectrometría de masas se realizó en un aparato marca Thermo-Electron DFS (Double Focus Sector) en introducción directa, utilizando impacto electrónico (70 eV).

## Recolección del material vegetal

El árbol se caracterizó en el Herbario Nacional de México (MEXU) como *Liquidambar styraciflua* L., se depositó una muestra cuyo número de folio es 1348012 (Figura 5.0).

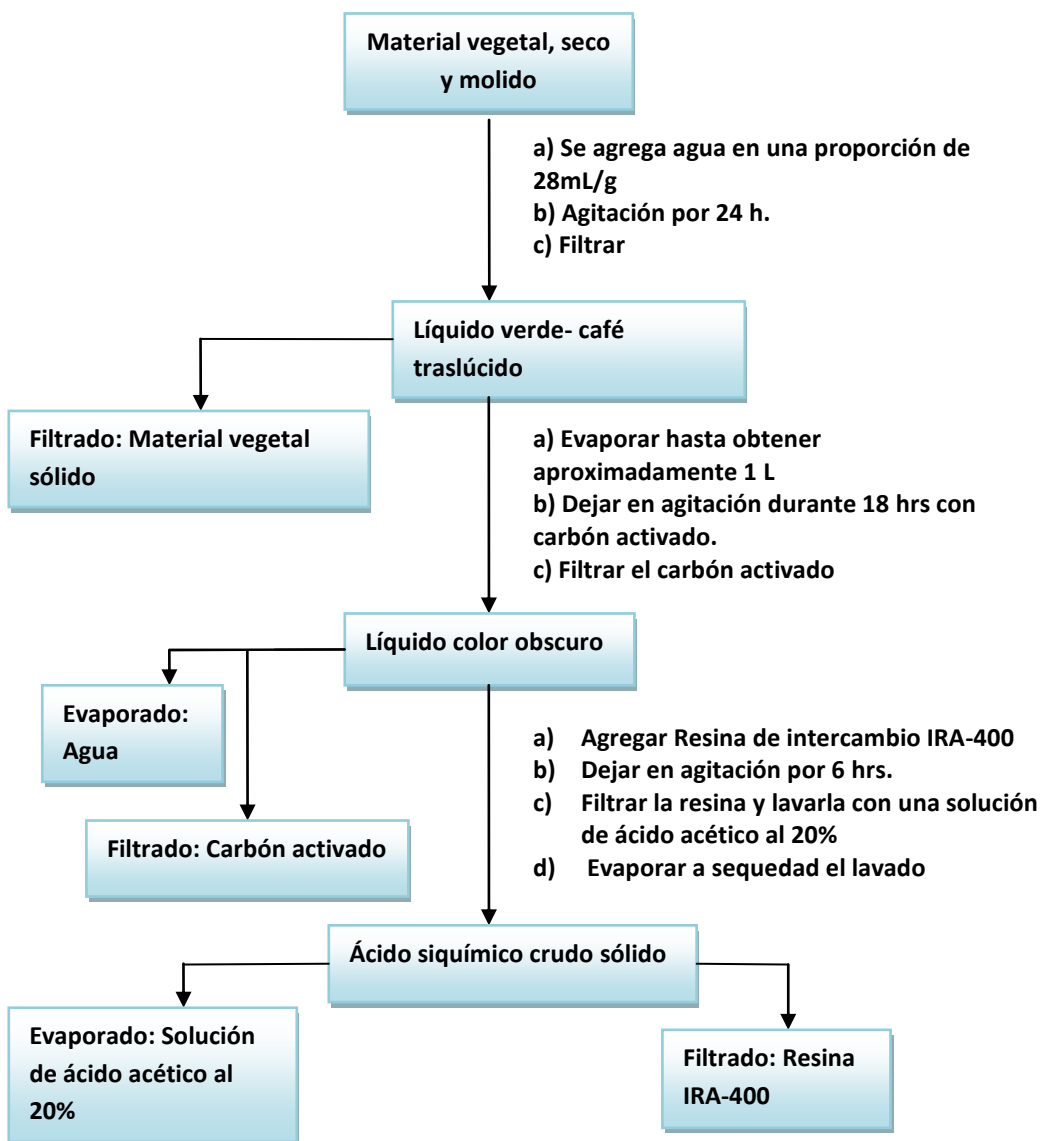
Para determinar la temporada del máximo rendimiento de ácido siquímico, se hicieron podas a dicho árbol durante un año en el periodo 2010 y 2011, dejando espacios de dos meses entre cada poda. Se tuvo el cuidado, de tratarse al mismo árbol todo el tiempo. Se separaron, los frutos y las hojas para luego secarlos en una campana a temperatura ambiente. Las hojas tardan alrededor de 3 a 4 días en eliminar el agua y obtener la consistencia para ser utilizadas en el proceso. En el caso de los frutos una vez secos y de estar maduros empiezan a expulsar tanto las semillas abortadas como las semillas viables, para sacarlas, se colocan los frutos en un matraz Erlenmeyer de 1 L y se deja en agitación mecánica vigorosa alrededor de 5 min.

Para incrementar la producción de ácido siquímico, se realizó la aplicación de ácido salicílico (AS) en el árbol durante el periodo de rendimiento máximo. Se preparó 0.5L de una solución  $1 \times 10^{-2} \text{M}$  de AS con  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  de DMSO y se neutralizó con NaOH. Se diluyó hasta 4L para alcanzar una concentración de  $1.25 \times 10^{-3} \text{M}$  de AS y se aplicó directamente sobre el follaje de todo árbol hasta goteo empleando una bomba de aspersión, durante un periodo de 6 semanas. Para este último procedimiento, se hicieron podas semanales y sólo se procesaron las hojas, ya que es el material más abundante y planteado en los objetivos.



Figura 5.0. Muestra caracterizada en el Herbario Nacional (MEXU)

**Diagrama 1. Obtención del ácido siquímico crudo**



## Tratamiento del material vegetal

Se colocaron 100 g de material vegetal previamente molido y seco si se trata de hojas y frutos, si son semillas no se muelen. Se dividió el material en cuatro matraces Erlenmeyer de 1 L, a cada uno de los matraces se añadió 700mL de agua del sistema municipal y se dejó en un agitador mecánico Burrell Shaker durante 24 h en una atmósfera de N<sub>2</sub>.

Pasadas las 24 h se filtró el material vegetal en matraces kitazato con aplicación de vacío y se desechó el sólido. Al líquido filtrado, se agregó carbón

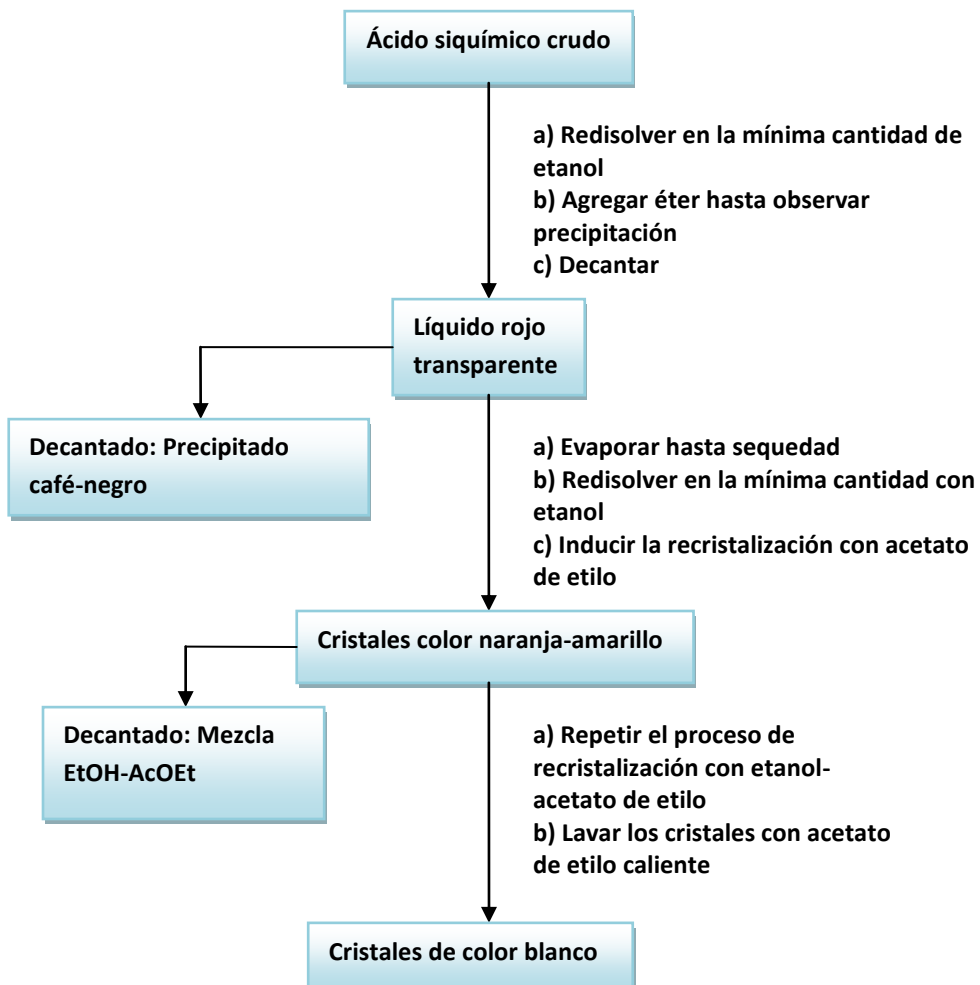
activado en pellets y se dejó en agitación alrededor de 18 h para la eliminación de compuestos coloridos que normalmente son compuestos conjugados. Pasado el tiempo, se filtra el carbón activado y se evapora en rotavapor usando una bomba de vacío, hasta que sólo quede alrededor de un litro, esto con la finalidad de tener una mejor manipulación del volumen a la hora de agregar la resina de intercambio iónico.

Se coloca la resina de intercambio iónico IRA-400 que es una resina básica que forma sales con los compuestos ácidos reteniéndolos en la matriz polimérica, se deja en agitación mecánica alrededor de 6 h. Ya pasado el tiempo se filtra la resina en un embudo de vidrio sinterizado y se la lava con 20 mL de agua destilada que se deshecha para eliminar los productos adsorbidos por la resina. Posteriormente, se lava la resina con 100 mL de una solución al 20% de ácido acético para recuperar en ácido siquímico que capturó la resina. El producto ácido se evapora a sequedad, con ayuda de una bomba de vacío en el rotavapor, hasta obtener una sustancia de color café-negruzca de textura viscosa (Diagrama 1).

### **Recristalización del ácido siquímico**

Como en el proceso de separación parte del ácido siquímico se polimeriza para separarlo se redisuelve completamente la muestra obtenida en EtOH y se agrega éter para precipitar el ácido siquímico que se ha polimerizado. Se decanta el líquido, se agrega alrededor de 4 g de carbón activado en polvo y se calienta durante 3 min., a 80 °C, se filtra en un embudo de vidrio sinterizado 40-60 con una capa de zeolita y se obtiene un líquido de color naranja, se evapora el disolvente hasta sequedad, se obtiene un producto viscoso color ámbar-rojizo, se redisuelve en la mínima cantidad de EtOH y se agrega AcOEt para recristalizar (Diagrama 2).  
RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 6.67 (dt, *J* = 3.6, 1.6 Hz), 4.30 (t, *J* = 4.0 Hz), 3.89 (dt, *J* = 8.0, 6.1 Hz), 3.63 (dd, *J* = 8.2, 4.3 Hz), 2.70 – 2.49 (m), 2.18 – 1.94 (m).

**Diagrama 2. Recristalización del ácido siquímico**



## VI. Resultados y discusión

Previamente ya se habían realizado extracciones de ácido siquímico crudo a partir del liquidámbar, de lo que se pudo concluir que las partes aéreas más importantes referentes a su rendimiento fueron las hojas y los frutos. Esto concuerda con la bibliografía, en donde se propone a las semillas de liquidámbar como fuente alternativa [71].

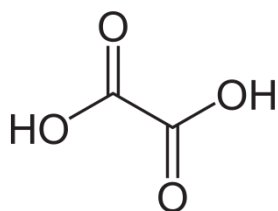
Así también se hicieron modificaciones en la extracción, que mejoró la pureza del producto. El problema que se encontró fue que las muestras ya filtradas se coloreaban, luego, al agregar el carbón activado y dejarlas en agitación por 18 h, presentaban pequeñas colonias de hongos filamentosos y a su vez el espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostraba varios contaminantes, por ejemplo las señales en 2.69, la región entre 3.14 y 3.37, 3.94, 4.08; que no corresponden al ácido siquímico (Figura 6.0).

Si bien el objetivo de este trabajo no fue identificar dichos contaminantes, se sospecha que se deba a metabolitos que estos hongos pudieran generar durante su crecimiento y a la oxidación de los productos presentes. Es por eso que la primera modificación que se hizo, fue la incorporación de N<sub>2</sub> al proceso de extracción para inhibir en lo posible el crecimiento de dichos microorganismos y evitar la formación de productos de oxidación. Los espectros mostrados a continuación corresponden al ácido siquímico crudo extraído en condiciones de temperatura ambiente con y sin presencia de N<sub>2</sub> (Figuras 6.0 y 6.1).





La segunda observación que se hizo fue que el ácido oxálico, un metabolito presente en las plantas que por su estructura carente de hidrógenos unidos a carbono (figura 6.2), no se puede identificar, ni mucho menos cuantificar mediante RMN-<sup>1</sup>H y que pudiese estar presente en el extracto ácido, por lo que se realizó una prueba de unión a la resina utilizada para captar el ácido siquímico (Cuadro 4.1)



**Figura 6.2.** Estructura de ácido oxálico

Muestra inicial de ácido oxálico(mg)	Cantidad de resina utilizada(g)	Cantidad de ácido oxálico recuperada después del proceso(mg)
500	5	50
500	7	71

**Cuadro 4.1** Ensayo de afinidad por el ácido oxálico con la resina IRA-400

De lo que se puede concluir que el ácido oxálico presenta una baja afinidad por la resina (10mg/g de resina), por lo que en este trabajo no se tomó en cuenta su proporción en el extracto crudo de ácido siquímico.

Los resultados del periodo 2010 y 2011 (Cuadro 4.2) de la obtención de ácido siquímico a partir de liquidámbar, muestran que es factible la extracción desde los meses de marzo hasta septiembre. Es posible que esto esté asociado a las estaciones del año, ya que en el mes de marzo es cuando ocurre la floración del árbol junto con la entrada de la primavera. Por el contrario los meses entre octubre y enero ocurre el cambio de hojas y a su vez hay menos material para la extracción. El intervalo en que se alcanzó mayor rendimiento de ácido siquímico en las semillas fue entre los meses de junio y julio, posiblemente se deba a que es cuando los frutos maduran y empiezan a producir semillas fértiles. Si bien se sospecha que estos meses también corresponden al mayor rendimiento de las

hojas, éste no se pudo determinar debido a que el extracto ácido presentaba ácido acético residual y debido a la estacionalidad de las muestras no se pudo repetir el experimento.

LOTE	Parte del árbol	Rendimiento (%)	Periodo
1	Semillas	2.0377	Junio-Julio
	Frutos	0.6061	
	Hojas	3.6136*	
2	Semillas	0.2219	Agosto-Septiembre
	Frutos	0.3610	
	Hojas	1.0410	
3	Semillas	0.2326	Octubre- Noviembre
	Frutos	0.3319	
	Hojas	0.4774	
4	Semillas	0.5364	Diciembre-Enero
	Frutos	0.2875	
	Hojas	0.2432	
5	Semillas	1.0100	Febrero- Marzo
	Frutos	0.2217	
	Hojas	0.9075	
6	Semillas	0.8846	Abril-Mayo
	Frutos	0.7190	
	Hojas	1.2960	

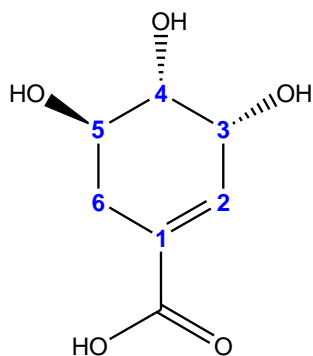
**Cuadro 4.2** Rendimiento de ácido crudo de las partes aéreas de Liquidámbur. En el caso de los frutos sólo se tomó el rendimiento a los abiertos. \*El producto presentaba ácido acético.

Una vez conocida esta información, durante los meses de julio y agosto del 2011 se intentó incrementar la producción de ácido siquímico mediante la aplicación de un elicitor. Se realizó una recolección previa a la aplicación de ácido salicílico. Posterior a la primera aplicación, se notó un aumento en la obtención de ácido siquímico crudo, en las posteriores aplicaciones no se apreció un cambio favorable para la formación del ácido siquímico. Esta observación es muy importante para la explotación comercial del producto ya que tendría que hacerse la aplicación única, con previa semana antes de la cosecha del material vegetal (Cuadro 4.3).

Posteriormente, se muestran los las señales de RMN-<sup>1</sup>H correspondientes al ácido siquímico de los espectros del periodo experimental de seis semanas (Cuadro 4.4).

Semana	Rendimiento (%)
Estándar	1.750
1	2.121
2	1.550
3	2.071
4	0.984
5	1.022
6	1.350

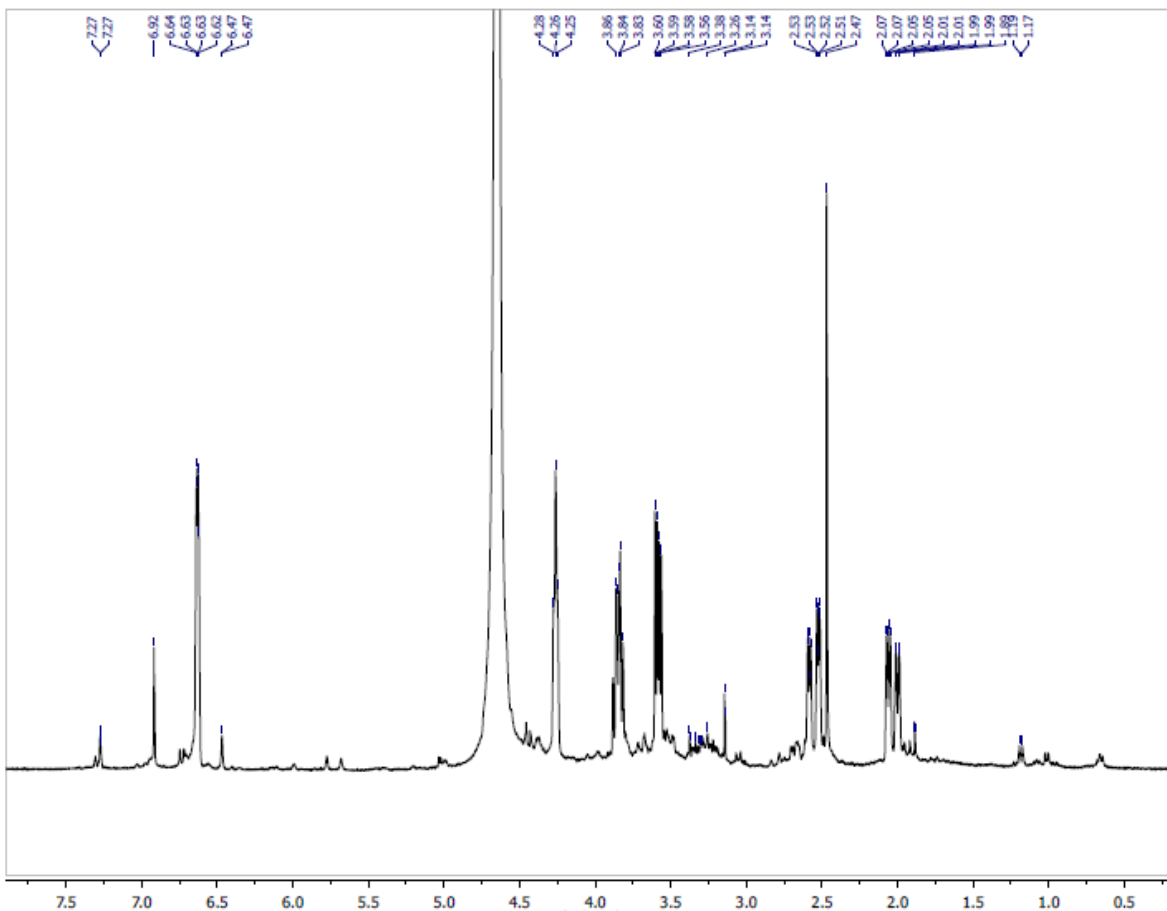
**Cuadro 4.3** Rendimiento de ácido crudo de las hojas de liquidámbar con la aplicación exógena de ácido salicílico



Semana	H2	H3	H4	H5	H6	H6
Estándar	6.65	4.29	3.62	3.88	2.59	2.06
1	6.65	4.27	3.59	3.85	2.56	2.04
2	6.63	4.26	3.58	3.84	2.56	2.03
3	6.62	4.25	3.57	3.84	2.55	2.02
4	6.62	4.27	3.58	3.86	2.57	2.03
5	6.66	4.28	3.60	3.87	2.58	2.04
6	6.62	4.25	3.56	3.83	2.54	1.98

**Cuadro 4.4** Datos de RMN-<sup>1</sup>H del ácido crudo extraído de las hojas de liquidámbar durante la aplicación de AS.

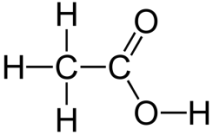
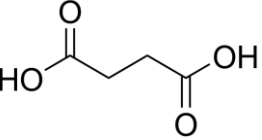
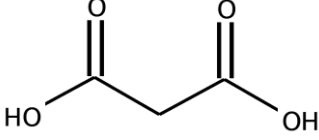
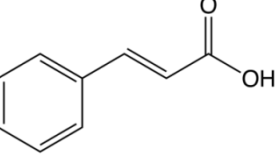
A continuación se muestran el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 6.3) realizado a la muestra de la semana 2.



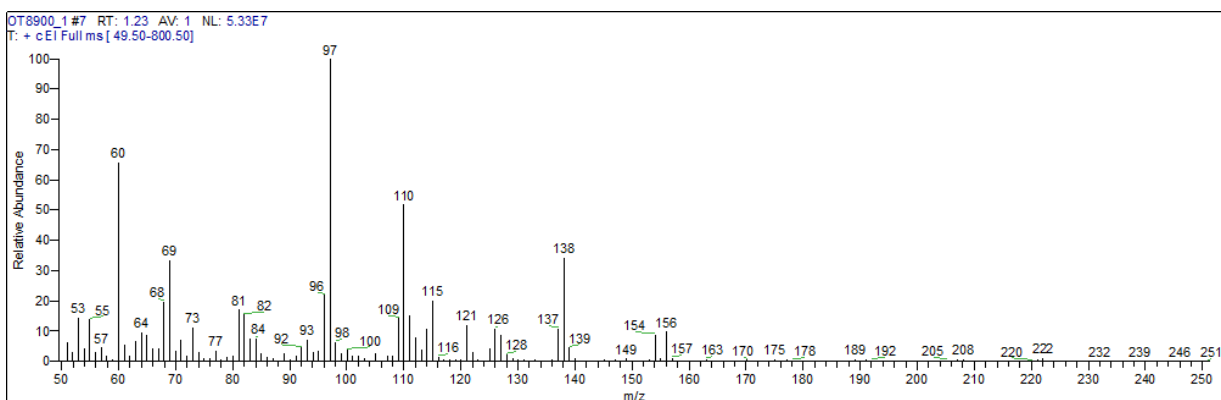
**Figura 6.3.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H del extracto ácido de la semana 2

En el RMN-<sup>1</sup>H se pueden observar en señales en las regiones de 2, 2.5, 3.84, 4.27 y 6.64, cada una de estas señales integra para un hidrógeno. Esto indica que se ha obtenido ácido siquímico de alta pureza y que la correspondiente área bajo la curva se acerca al 90%. Las impurezas que se observaron, fueron, la señal que se encuentra alrededor de 1.889 corresponde al ácido acético remanente que se empleó para lavar la resina de intercambio iónico y obtener el ácido siquímico crudo, las señales que aparecen en 2.474 son del ácido succínico, en 3.146 al ácido malónico y en 7.291y 6.936 al ácido cinámico (Cuadro 4.5). También, se observan otras impurezas que no fueron identificadas, por lo que, se mandaron muestras del ácido siquímico crudo a cromatografía /masas pero debido a la acidez de los compuestos, estos no dieron buenos resultados. No se usó el procedimiento de formación de ésteres mediante diazometano, por que la reacción no es totalmente cuantitativa y se introduciría un parámetro de

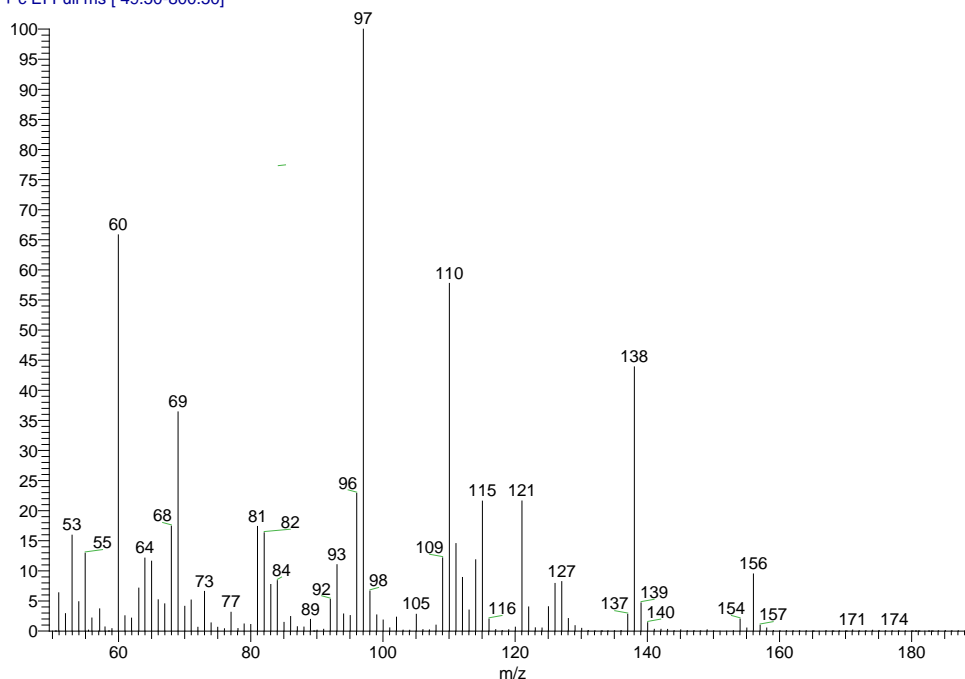
incertidumbre adicional. Para la corroboración del ácido siquímico se realizó espectrometría de masas por introducción directa (Figura 6.4) del extracto ácido de la semana 2 y una muestra de referencia (Figura 6.5) del producto puro comercial.

Compuesto	Estructura	Desplazamiento químico RMN- <sup>1</sup> H
Ácido acético		1.889
Ácido succínico		2.474
Ácido malónico		3.146
Ácido cinámico		7.291 6.936

**Cuadro 4.5** Impurezas encontradas en el extracto ácido.



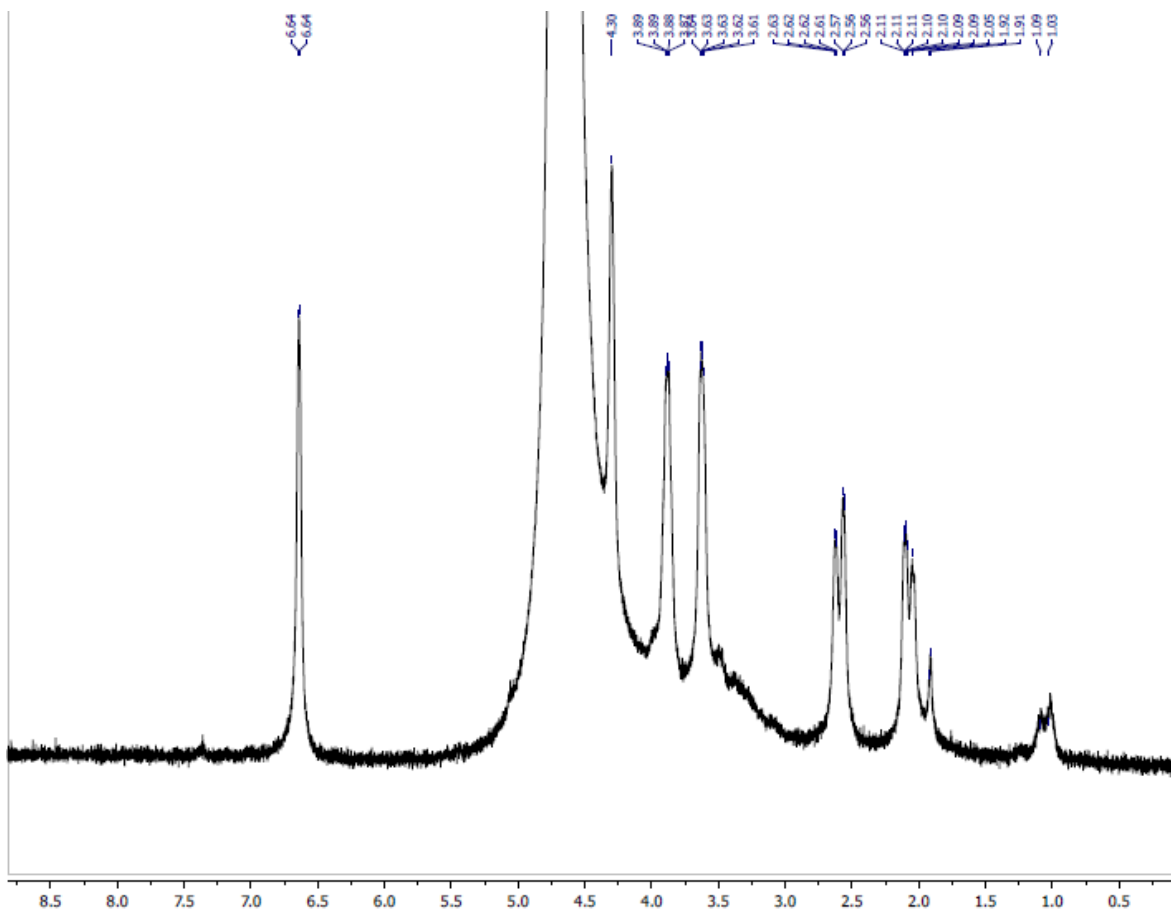
**Figura 6.4.** Espectro de masas del extracto ácido de la semana 2 en introducción directa.

OT8901\_1 #6-7 RT: 1.03-1.23 AV: 2 SB: 3 3.08-3.49 N  
T: + c EI Full ms [ 49.50-800.50]

**Figura 6.5.** Espectrofotometría de masas de ácido siquímico al 99%

Al compararse ambos espectros de masas por introducción directa, se observa que las señales entre uno y otro corresponden, el ión molecular no aparece por la pérdida de una molécula de agua, visto en la señal de 156 ( $M \pm 18$ ).

Sin embargo, se encontró que el sistema de extracción aún requiere de perfeccionamiento. Por ejemplo, se observó que el ácido siquímico formaba hojuelas negras quebradizas, ligeramente solubles en agua y en DMSO. Lo que nos hace creer que debido a las condiciones durante la evaporación del disolvente, particularmente en la etapa que contiene ácido acético, el producto se polimerizaba. Se llegó a esta conclusión debido a que se realizó el espectro RMN- $^1\text{H}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  que muestra lo siguiente:



**Figura 6.6.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de las hojuelas negras.

En donde se observa que corresponde a las bandas de ácido siquímico. Sin embargo, el tratamiento de recristalización de este producto no fue posible debido a que se encuentra polimerizado con varios pesos moleculares. Una vez separadas estas fases del producto crudo fue posible obtener un sólido blanco cristalino con un *pf* de 176-178 °C. Se muestra su correspondiente espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 6.7) y un cuadro que compara las constantes de acoplamiento entre el producto recristalizado y ácido siquímico de referencia al 99% (Cuadro 4.6). RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 6.67 (dt, *J* = 3.6, 1.6 Hz), 4.30 (t, *J* = 4.0 Hz), 3.89 (dt, *J* = 8.0, 6.1 Hz), 3.63 (dd, *J* = 8.2, 4.3 Hz), 2.70 – 2.49 (m), 2.18 – 1.94 (m).

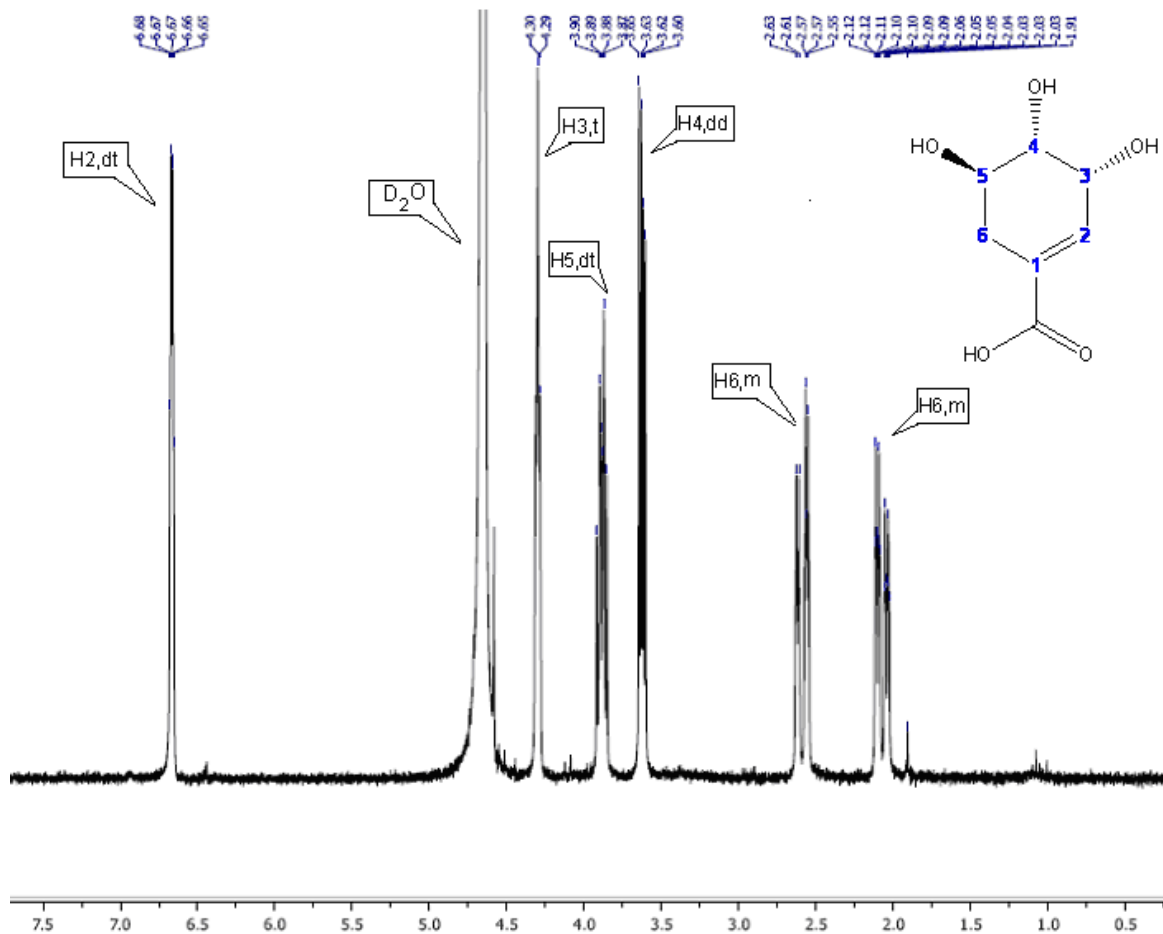


Figura 6.7. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del ácido siquímico recristalizado.

Muestra	H2	H3	H4	H5	H6	H6
Ácido siquímico recristalizado	6.67(dt)	4.30(t)	3.63(dd)	3.89(dt)	2.59(m)	2.07(m)
	J = 1.64	J = 4.09	J = 4.27	J = 6.11		
	J = 1.64	J = 4.09	J = 8.19	J = 6.11		
Acido siquímico al 99%	6.57(dt)	4.18(t)	3.51(dd)	3.77(dt)	2.46(m)	1.95(m)
	J = 1.88	J = 4.10	J = 4.25	J = 5.86		
	J = 1.88	J = 4.10	J = 8.20	J = 5.86		
	J = 3.83		J = 8.09			

Cuadro 4.6. Datos de RMN-<sup>1</sup>H con sus respectivas constantes de acoplamiento del ácido siquímico recristalizado comparado con ácido siquímico al 99% de Aldrich.



## VII. Conclusiones

- Se realizó la búsqueda de información sobre el virus de influenza, se investigaron los aspectos más importantes que le proporcionan reincidencia, una alta capacidad infectiva, una alta tasa de mutación y adaptación. Así como las vías terapéuticas en desarrollo para su contención y cura.
- Se logró aislar ácido siquímico a partir de *Liquidambar styraciflua* L., durante un periodo de un año, logrando identificar una época propicia para un mayor rendimiento, correspondiente a los meses de marzo-septiembre. También, se caracterizó por RMN-<sup>1</sup>H, adicionalmente se identificaron las principales impurezas de la extracción.
- El sistema de extracción necesita perfeccionarse, pues debido al pH de la mezcla de ácido acético y a la temperatura necesaria para efectuar su extracción una parte del ácido siquímico se polimeriza.
- Se intentó aumentar la producción de ácido siquímico indirectamente, mediante la producción de metabolitos secundarios inducida por la aplicación exógena de ácido salicílico en las hojas de *Liquidambar styraciflua*, encontrándose que si se realiza la aplicación una semana antes de la cosecha se logra un buen incremento.
- Aparentemente el proceso es factible de escalar a nivel industrial debido a la abundancia de liquidámbar presente en el país y la fuente de materia prima serían las hojas que se colectarían de los árboles sin tratar de dañar la estructura del árbol.

## VIII. Bibliografía

1. Manual Merck de información médica para el hogar [Online] Available at: <[http://www.msd.es/publicaciones/mmerck\\_hogar/seccion\\_17/seccion\\_17\\_186.html](http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_17/seccion_17_186.html)>[Accessed 05 October 2012]
2. Wright, P., Neumann, G. and Kawaoka, Y. Orthomyxoviruses. In: Kanipe, D., and Howley, P. **2007**. *Field's Virology*. 5th. Ed. Philadelphia, USA. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1691-1740. ISBN-13: 9780781760607
3. Collier, L. y Oxford, J., **2008**. *Virología humana* 3a. Ed. México. McGraw Hill. ISBN: 9789701065457
4. O'Callghan, R. J., Gohd, S., and Labat, D. D. **1980**. Human Antibody to Influenza C Virus: Its Age-Related Distribution and Distinction from Receptor Analogs. *Infection and Immunity*. 30 (02), pp. 500-505.
5. Matsuzaki, Y. et al., **2002**. Antigenic and Genetic Characterization of Influenza C Viruses Which Caused Two Outbreaks in Yamagata City, Japan, in 1996 and 1998. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (02), pp. 422-429.
6. Strauss, J. H. and Strauss E. G. **2008**. *Viruses and human disease* 2<sup>nd</sup> edition. Canada. Elsevier, pp. 162-175. ISBN: 978-0-12-373741-0
7. Fouchier, R. A. et al., **2005**. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *Journal of Virology*. 79 (05), pp. 2814-2822.
8. Palese, P. and Shaw, M. L. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. In: Kanipe, D., and Howley, P. **2007**. *Field's Virology*. 5th. Ed. Philadelphia, USA. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1647-1689. ISBN-13: 9780781760607

9. Rogers, G.N. And Paulson, J. C. **1983**. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptors specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*. 127: 361-379
10. Couceiro, J. N., Paulson, J. C. and Baum, L. G. **1993**. Influenza virus strains selective recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium: the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res*. 29: 155-165
11. Córdova, J et al.**2010**. *La epidemia de influenza A(H1N1) en México*. México: Editorial médica panamericana.
12. Shinya, K. et al. **2006**. Avian flu: Influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 400: 435-436
13. Matlin, K.S. et al. **1981**. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J. Cell biol.* 91: 601-613
14. Subbarao, K. et al. **1998**. Characterization of an avian influenza A(H5N1) virus isolated form a child with a fatal respiratory illness. *Science*. 279, 393-396
15. Herfst, S. et al. **2012**. Airbone transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*. 336, 1534-1541.
16. Imai, M. et al. **2012**. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature Research Letter* 000. 1-11.
17. Li, K. S. et al. **2004**. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic avian H5N1influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 430: 209-213

18. World Health Organization. **2012**. *Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2012*. [Online] Available at: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/H5N1\\_cumulative\\_table\\_archives/en/index.html](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/index.html) [Accessed 10 November 2012]
19. Neumann, G., Noda, T. and Kawaoka, Y. **2009**. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*.459, pp. 931-937.
20. World Health Organization. **2012**. *Global Alert and Response (GAR).Pandemic (H1N1) 2009 - update 112*. [Online] Available at: [http://www.who.int/csr/don/2010\\_08\\_06/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/index.html) > [Accessed 02 March 2012]
21. Trifonov, V., Khiabani, H., and Rabadan, R. **2009**. Geographic Dependence, Surveillance, and Origins of the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. *The New England Journal of Medicine*. 361(02), pp. 115-119
22. Wood, M. J. and Robertson J. S. **2004**. From lethal virus to life-saving vaccine: developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nature reviews*. Vol. 2. pp. 842-847
23. Neumann, G., Fujii, K., Kino, Y., and Kawaoka, Y. **2005**. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *PNAS*. 102 (46) pp.16825-16829
24. National Institute for Biological Standard and Control (NIBSC), [http://www.nibsc.ac.uk/spotlight/influenza\\_resource\\_centre/new\\_h1n1\\_swine\\_flu.a.spx](http://www.nibsc.ac.uk/spotlight/influenza_resource_centre/new_h1n1_swine_flu.a.spx). [Accessed 30 January 2013]

25. Valdespino, J.L., García, L. and Ponce de León-Rosales, S. **2009**. Vaccines against Influenza A (H1N1) Pandemic. *Archives of Medical Research*.40 pp. 693-704
26. Cox, J. N., et al. **2010**. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).*MMWR Recommendations and Reports*. 59(rr08); pp.1-62
27. Korsman, S. Vaccines. In: Preiser, W., Htoffman, C., Kamps B.S. et al. **2006**. *Influenza Report 2006*. Cologne, Germany. Flying Publisher, pp. 127-149. ISBN: 3-924774-51-X
28. Davies, W.L. et al.**1964**. Antiviral Activity of 1-Amadantanamine (Amantadine). *Science*, 144; pp. 862
29. Scholtissek, C. And Webste, R. G.**1998**. Long-term stability of the anti-influenza A compounds—amantadine and rimantadine. *Antiviral Research*. 38 pp. 213-215.
30. Lamb, R. A., Zebedee, S. L. and Richardson, C. D. **1985**. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell*. 40(3), pp. 627-633.
31. Treanor, J.J. and Hayden, F.G. Volunteer Challenge Studies. In: Nicholson, K. G., Webster, R. G. and Hay, A. J. **1988**. *Textbook of influenza*. Blackwell Science Ltd., pp. 517-537.
32. Monto, A. S., Ohmit, S.E., Hornbuckle, K., and Pearce C. L. **1995**. Safety and efficacy of long-term use of rimantadine for prophylaxis of type A influenza in nursing homes. *Antimicrob Agents Chemother*. 39, pp. 2224-2228.

33. McCullers, J. A. **2004**. Effect of antiviral treatment on the outcome secondary bacterial pneumonia after influenza. *Journal of Infectious Disease*. 190, pp. 519-526
34. Hay, A.J. Amantadine and Rimantadine Mechanism. In: Richman, D. D. **1996**. *Antiviral Drug Resistance*. John Wiley and Sons Ltd, pp. 43-58
35. Abed, Y., Goyette, N., and Boiving, G. **2005**. Generation and Characterization of Recombinant Influenza A (H1N1) Viruses Harboring Amantadine Resistance Mutations. *Agents Chemother*. 49, pp. 556-559
36. Sipress, A. **2005**. Bird Flu Drug Rendered Useless. *The Washington Post*. [Online]. 18 june. Available at: <<http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2005/06/17/AR2005061701214.html>> [acceded 15 April 2012]
37. Dreitlein, W.B., Maratos, J., and Brocavich, J. **2001**. Zanamivir and Oseltamivir: Two New Options for the Treatment and Prevention of Influenza. *Clinical Therapeutics*. 23(03),pp. 327-355
38. Clercq, E. **2006**. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nature Reviews. Drug Discovery* 5, pp.1015-1025
39. Matrosovich, M. N., et al. **2004**. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of Virology*. 78, 12665-12667
40. Gubareva L.V. and Hayden F.G. M2 and neuraminidase inhibitors: anti-influenza activity, mechanisms of resistance, and clinical effectiveness. In: Kawaoka, Y. **2006**. *Influenza Virology Current Topics*. Caister Academic Press. England, pp. 169-201

41. Moscona, A. **2005**. Oseltamivir Resistance — Disabling Our Influenza Defenses. *The New England Journal of Medicine*. 353 (25),pp. 2633 – 2636
42. Macdonald, J. F., Cameron, R., Demaine E. A., et al. **2005**. Dimeric Zanamivir Conjugates with Various Linking Groups Are Potent, Long-Lasting Inhibitors of Influenza Neuraminidase Including H5N1 Avian Influenza. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48 (08), pp. 2964-2971
43. Macdonald, J. F., Watson, K. G., Cameron, R., et al. **2004**. Potent and Long-Acting Dimeric Inhibitors of Influenza Virus Neuraminidase Are Effective at a Once-Weekly Dosing Regimen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48 (12), pp. 4542-4549
44. Sidwell, R.S., Bailey, K. W., Wong, M. H., Barnard, D.L., and Smee, D.F. **2005**. *In vitro* and *in vivo* influenza virus-inhibitory effects of viramidine. *Antiviral Research*. 68, pp. 10-17
45. Saravolac, E.G. et al. **2001**. Immunoprophylactic strategies against respiratory influenza virus infection. *Vaccine*. 19, pp.2227-2232
46. Deng, T. et al. **2005**. *In vitro* assembly of PB2 with a PB1–PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *Journal of Virology*. 79, 8669–8674
47. Furuta, Y., Takahashi, K., Fukuda, Y. et al. **2002**. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of Anti-Influenza Virus Compound T-705. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46 (4), pp.977-981
48. Tomassini, J. et al. **1996**. A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 40, 1189-1193

49. Ge, Q., Philip, L., Bai, A., et al. **2004**. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *PNAS*. 101 (23), pp. 8676-8671
50. Tompkins, S. M., et al. **2004**. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *PNAS*. 101 (23), pp. 8682-8686
51. Malakhov, M. P. et al. **2006**. Sialidase fusion protein as a novel broad-spectrum inhibitor of influenza virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, pp. 1470–1479.
52. Gambaryan, A. S., Tuzikov, A. B., Chinarev, A. A., et al. **2002**. Polymeric inhibitor of influenza virus attachment protects mice from experimental influenza infection. *Antiviral Research*. 55, pp. 201-205
53. Gani, R., Hughes, H., et al. **2005**. Potential Impact of Antiviral Drug Use during Influenza. *Pandemic Emerging Infectious Diseases* 11(09), pp.1355-1362
54. Von Istein, M. **2007**. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, pp. 967-974
55. Farina, V., and Brown, J. D. **2006**. Tamiflu: The Supply Problem. *Angewandte Chemie* 45. pp .7330-7334
56. Federspiel, M., et al. **1999**. Industrial Synthesis of the Key Precursor in the Synthesis of the Anti-Influenza Drug Oseltamivir Phosphate (Ro 64-0796/002, GS-4104-02): Ethyl (3R,4S,5S)-4,5-epoxy-3-(1-ethyl-propoxy)-cyclohex-1-ene-1-carboxylate. *Organic Process Research & Development*. 03 (04) pp.266-274
57. Shibasaki, M., and Kanai, M. **2008**. Synthetic Strategies for Oseltamivir Phosphate. *European Journal of Organic Chemistry* 11 (02) pp. 1839-1850.



58. Magano, J. **2011**. Recent synthetic approaches to oseltamivir phosphate (Tamiflu™) for the treatment of influenza. *Tetrahedron* 67 pp. 7875-7899
59. Yeung, Y., Hong, S., and Corey, E. J. **2006**. A Short Enantioselective Pathway for the Synthesis of the Anti-Influenza Neuramidase Inhibitor Oseltamivir from 1,3-Butadiene and Acrylic Acid. *JACS* 128 (19) pp. 6310–6311
60. Ishikawa, H., Suzuki, T., and Hayashi, Y., **2009**. High-Yielding Synthesis of the Anti-Influenza Neuramidase Inhibitor (-)-Oseltamivir by Three “One-Pot” Operations. *Angewandte Chemie* 48, 1304 –1307
61. Held, H., Piechulla, B. and Held, F. **2011**. *Plant Biochemistry*. 4<sup>th</sup> Ed. USA Academic Press. ISBN13: 978-0-12-384986-1.
62. McConkey, G. A. **1999**. Targeting the Shikimate Pathway in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (01) pp.175–177
63. Gonzales, C., et al. **2011**. A Prodrug Approach for Improving Antituberculosis Activity of Potent Mycobacterium tuberculosis Type II Dehydroquinase Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54 pp. 6063–6084
64. Krämer, M., et al. **2003**. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabolic Engineering*. 5 pp. 277–283
65. Frost, J. W., et al. **2002**. *Biocatalytic synthesis of shikimic acid*. US Patent 240440
66. Koreeda, M., Teng, K., and Murata, T. **1990**. (1E,3E)-4-Acetoxy-1-phenyldimethylsilyl-1,3-butadiene as a Surrogate for (1E,3E)-1,4-Diacetoxy-1,3-butadiene: A Highly Efficient Synthesis of (±)-Shikimic Acid. *Tetrahedron Letters*. 31 (45) pp 5997-6000

67. Cano, J. H., and Volpato, G. **2004**. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *Journal of Ethnopharmacology* 90 pp. 293–316
68. Wang, G. W., et al. **2011**. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 136 pp. 10–20
69. Yang, J.F., et al. **2010**. Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens. *Journal of Medicinal Food* 13 pp. 1254–1262.
70. Upton, R., **2006**. Differentiation between star anise (*Illicium verum*) and the toxic adulterant shikimi (*Illicium anisatum*). *American Herbal Pharmacopoeia*, United States.
71. Ghosh S, et al, Production of shikimic acid, *Biotechnol Adv* (**2012**), doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.001
72. Sui, R. **2008**. Separation of Shikimic Acid from Pine Needles. *Chemical Engineering & Technology*. 31 (03) pp. 469–473
73. Lichtblau, D., Berger, J. M., and Nakanishi, K. **2002**. Efficient Extraction of Ginkgolides and Bilobalide from *Ginkgo biloba* Leaves. *Journal of Natural Products*. 65 (10) pp. 1501-1504
74. DeFeudi, F. V., Vassilios Papadopoulos, V., and Drieu, K. **2002**. *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 17 pp. 405–417
75. Oyama, Y., et al. **1996**. *Ginkgo biloba* extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Research* 712 pp. 349-352

76. De la Cruz, M. **1991**. *Libellus de medicinalibus indorum herbis*. Versión española. 2a. Ed. Fondo de cultura económica.
77. Peterson, A. A., and Peterson, A. T. **1992**. Aztec exploitation of cloud forests: tributes of liquidambar resin and quetzal feathers. *Global Ecology and Biogeography Letters* 2, pp. 165-173
78. Fernandez, X., **2005**. Chemical composition of the essential oils from Turkish and Honduras *Styrax*. *Flavour and Fragrance Journal* 20, pp. 70-73
79. Coon, N. **1975**. *The dictionary of useful plants*. 3<sup>rd</sup> Ed. Rodale Press ISBN: 087857090X
80. Liu, Z., et al. **2010**. *Sweetgum fruit extract as a therapeutic agent*. US Patent Application 20100189830
81. Anderson, K., A. **2006**. *Method of isolating shikimic acid from a plant*. US Patent 60841643
82. Angelova, Z., Georgiev, S., and Roos, W. **2006**. Elicitations of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 20 (02) pp. 72-83.
83. Ferrari, S. Biological Elicitors of Plant Secondary Metabolites: Mode of Action and Use in the Production of Nutraceuticals. In: Giardi, M. T., Rea, G., and Berra, B. **2010**. *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*. Austin, Texas. USA. *Landes Bioscience, Springer Ed.*, pp. 152-166. ISBN-13: 9781441973467
84. Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I., & Estelle., M. **2009**. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology.*, 5 (05) pp. 301-307

85. Ghai, N., Setia, R.C., and Setia, N., **2002**. Effects of paclobutrazol and salicylic acid on chlorophyll content, hill activity and yield components in *Brassica napus* L. *Phytomorphology*, 52 pp. 83-87.
86. Larque-Saavedra, A., **1979**. Stomatal closure in response to acetylsalicylic acid treatment. *Z. Pflanzenphysiol.*, 93 (4) pp. 371-375.
87. Jain, A., and Srivastava, H. S., **1981**. Effect of salicylic acid on nitrate reductase activity in maize seedlings. *Physiologia Plantarum*, 51: 339-342.
88. Raskin, I., Turner, I. M., and Melander, W. R., **1989**. Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *PNAS. USA*, 86: 2214-2218.
89. Gordon, L. K., et al. **2002**. Salicylic acid induces dissipation of the proton gradient on the plant cell membrane *Doklady Biological Sciences*, 387(06) pp. 581-583.
90. Martín-Mex, R. **2005**. Positive effect of salicylates on the flowering of African violet. *Scientia Horticulturae*. 103(4) pp. 499-502.
91. Wang, Y., Yuan, Y., and Wu, J. **2004**. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. mairei. *Biochemical Engineering Journal* 19 pp. 259–265
92. Reid, H., Taubenberger, J. K. and Fanning, T. **2001**. The 1918 Spanish influenza: integrating history and biology. *Microbes and Infection* 3, pp. 81-87
93. Youngken, W. **1951**. *Tratado de Farmacognosia.*, 6ª edición. México D. F., editorial Atlante.

94. Fukuyama, Y., and Huang, J. Chemical constituents of the genus *Illicium*. In: Miró, J. M. **2004**. *Illicium, Pimpinella and Foeniculum*. Florida, USA. CRC Press. ISBN 0-415-32246-4/04

# ANEXO

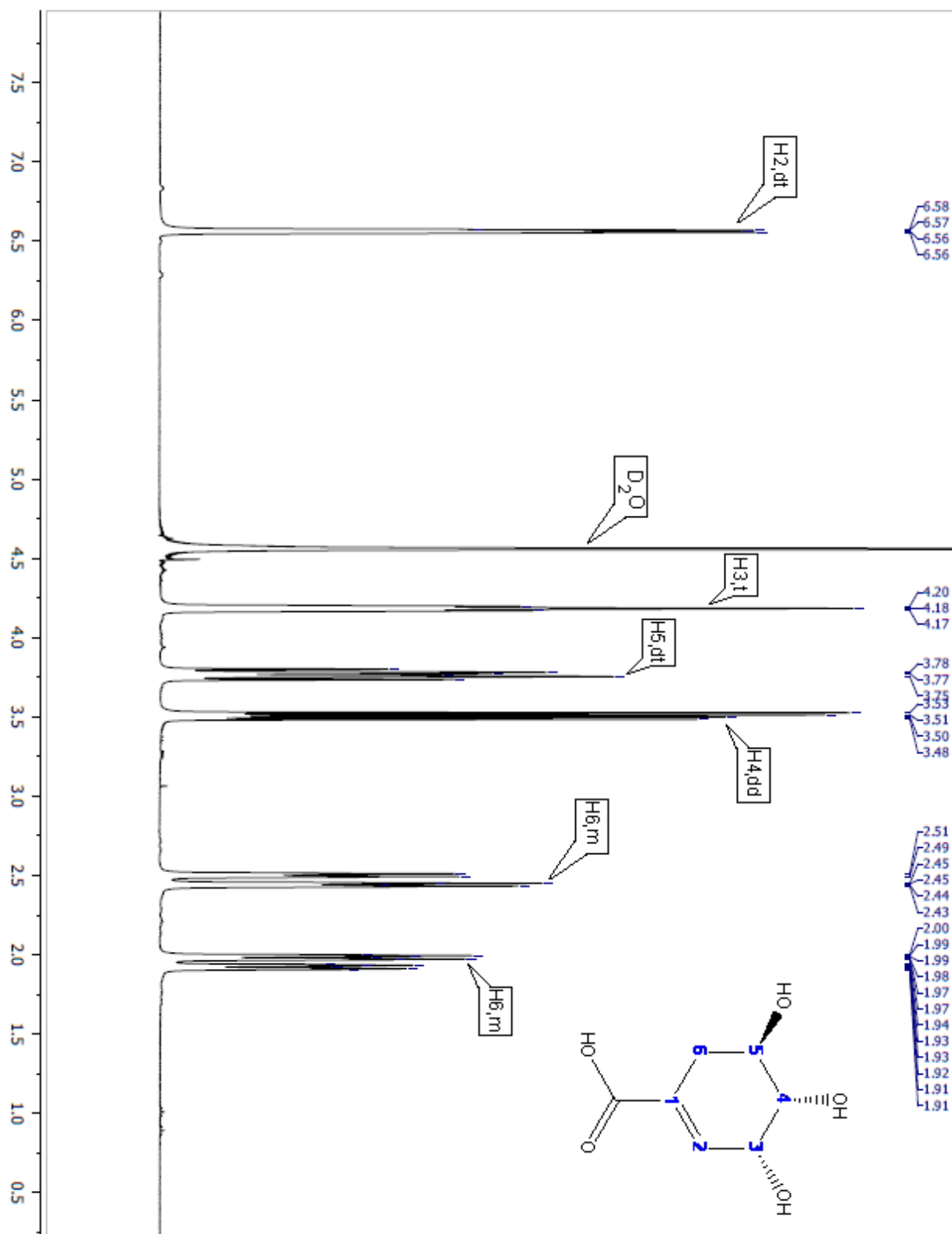


Figura 6.8. Espectro RMN- $^1\text{H}$  del ácido siquímico al 99%

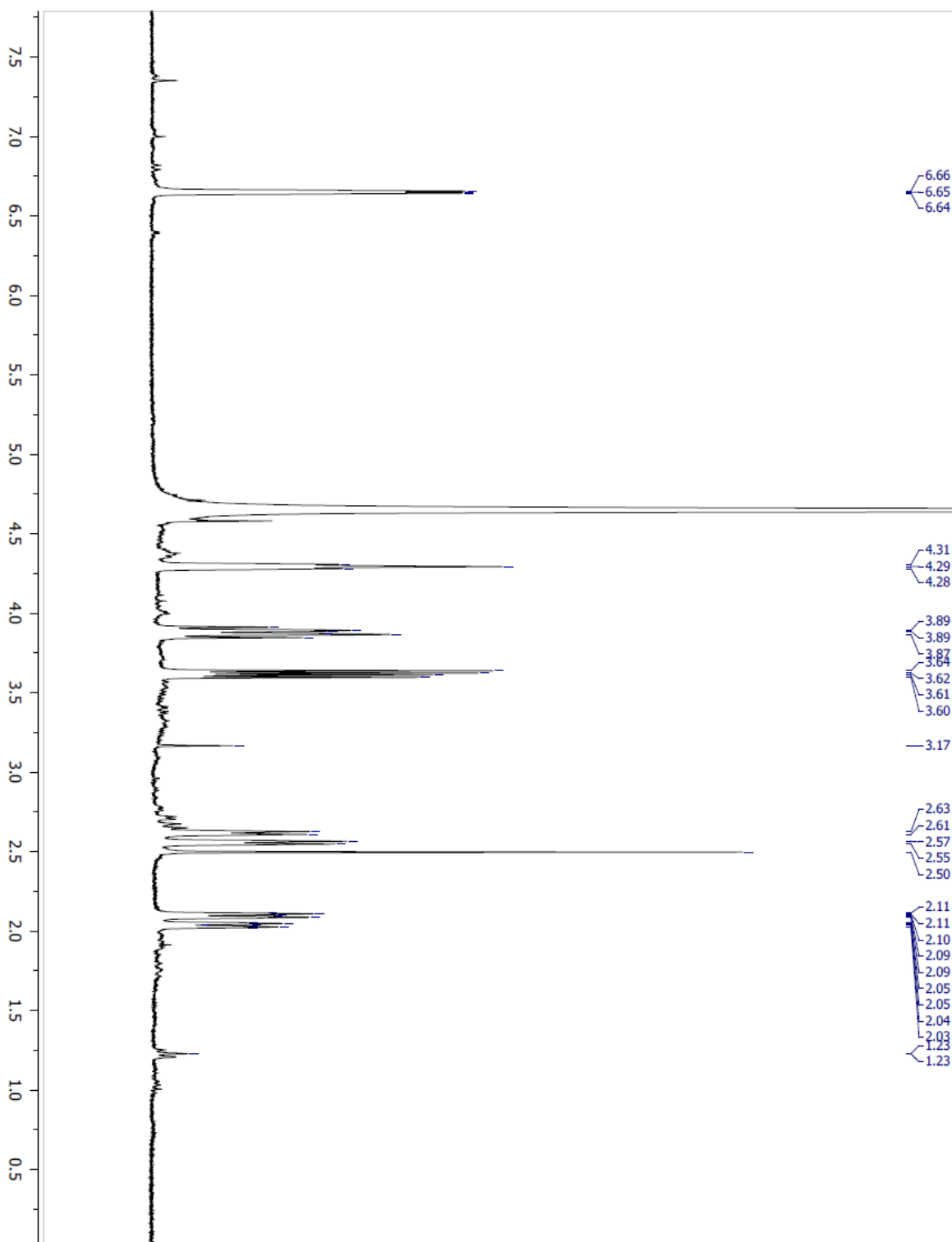
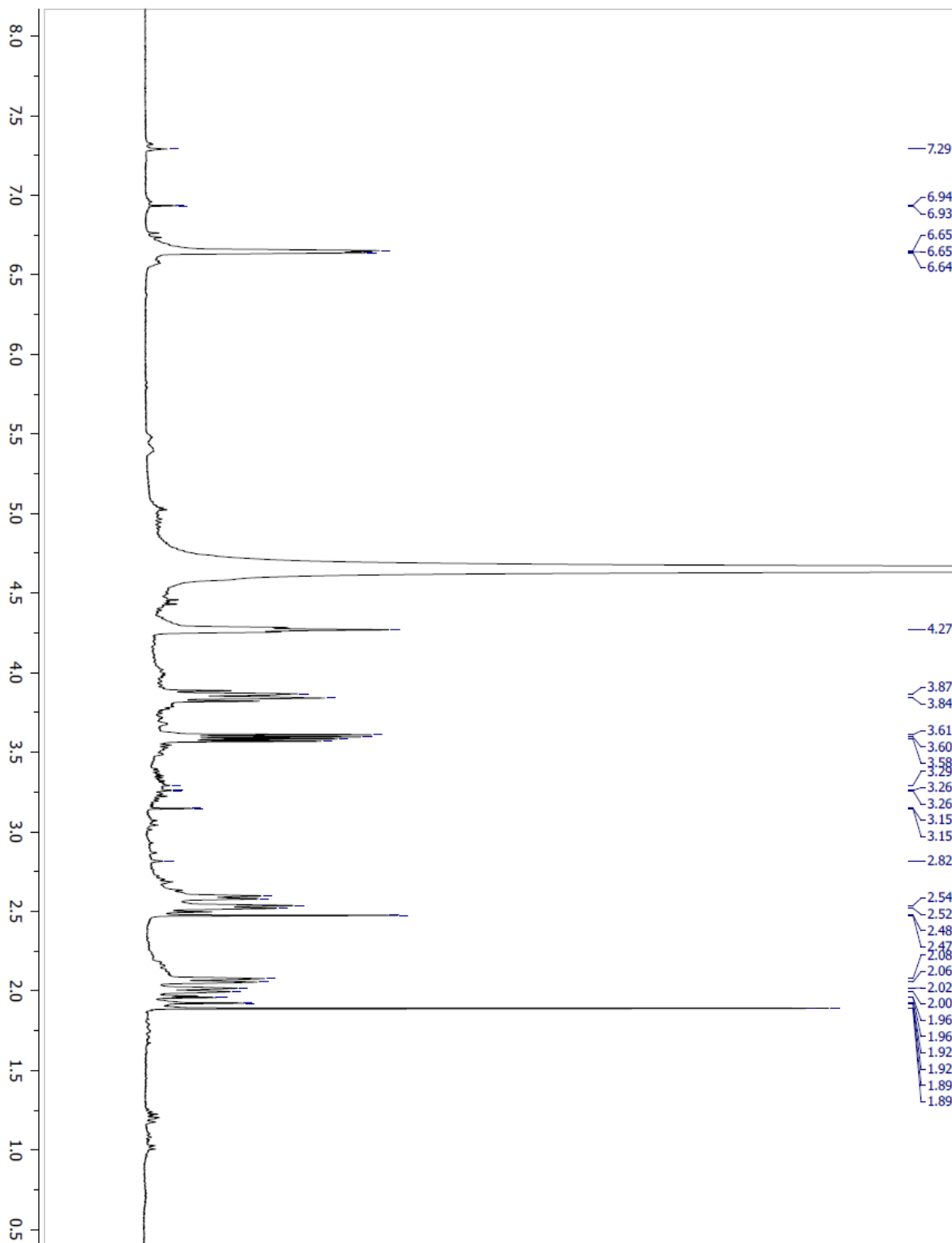


Figura 6.9. Espectro RMN- $^1\text{H}$  del extracto ácido estándar



**Figura 6.10.** Espectro RMN- $^1\text{H}$  del extracto ácido de la semana 1



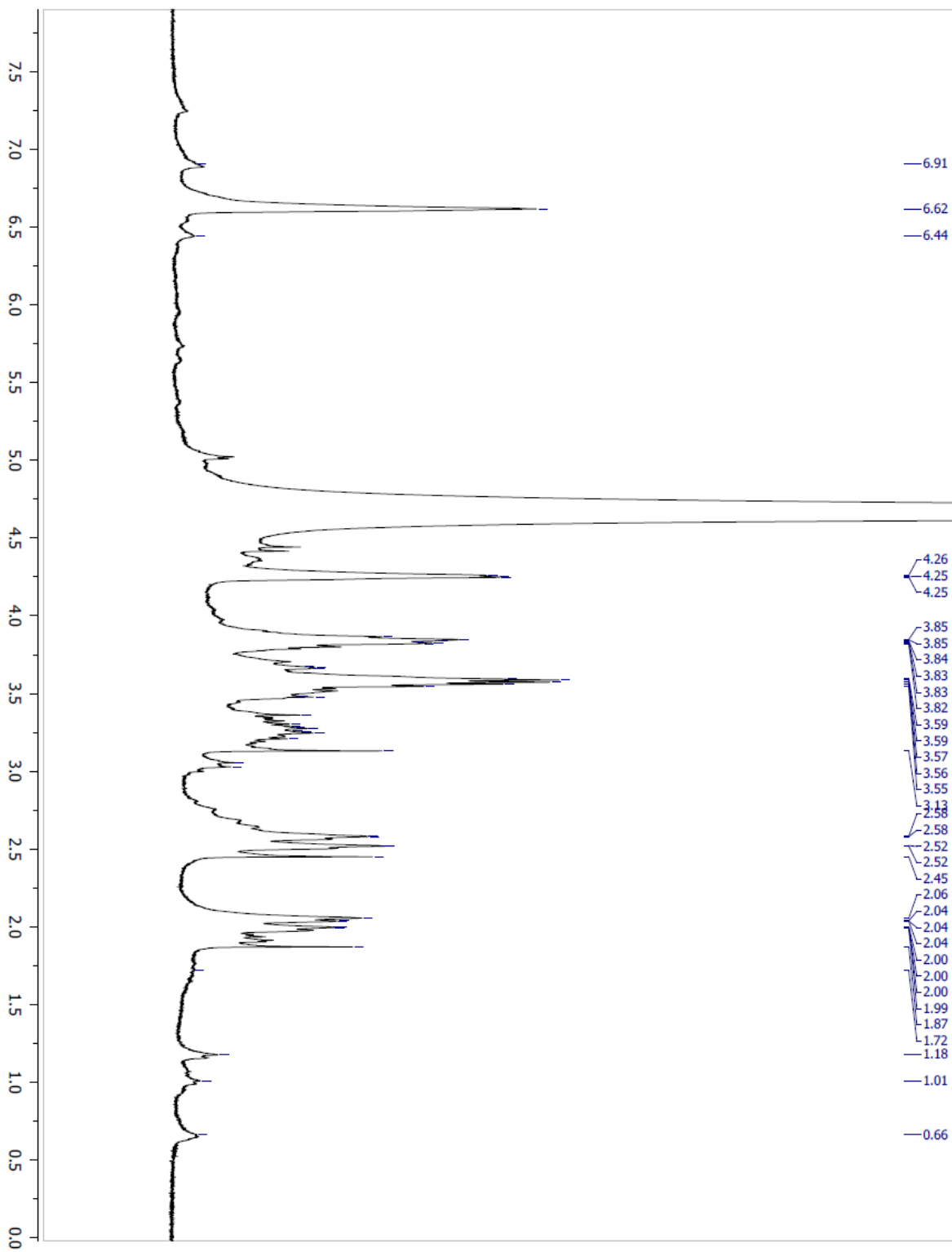


Figura 6.11. Espectro RMN- $^1\text{H}$  del extracto ácido de la semana 3

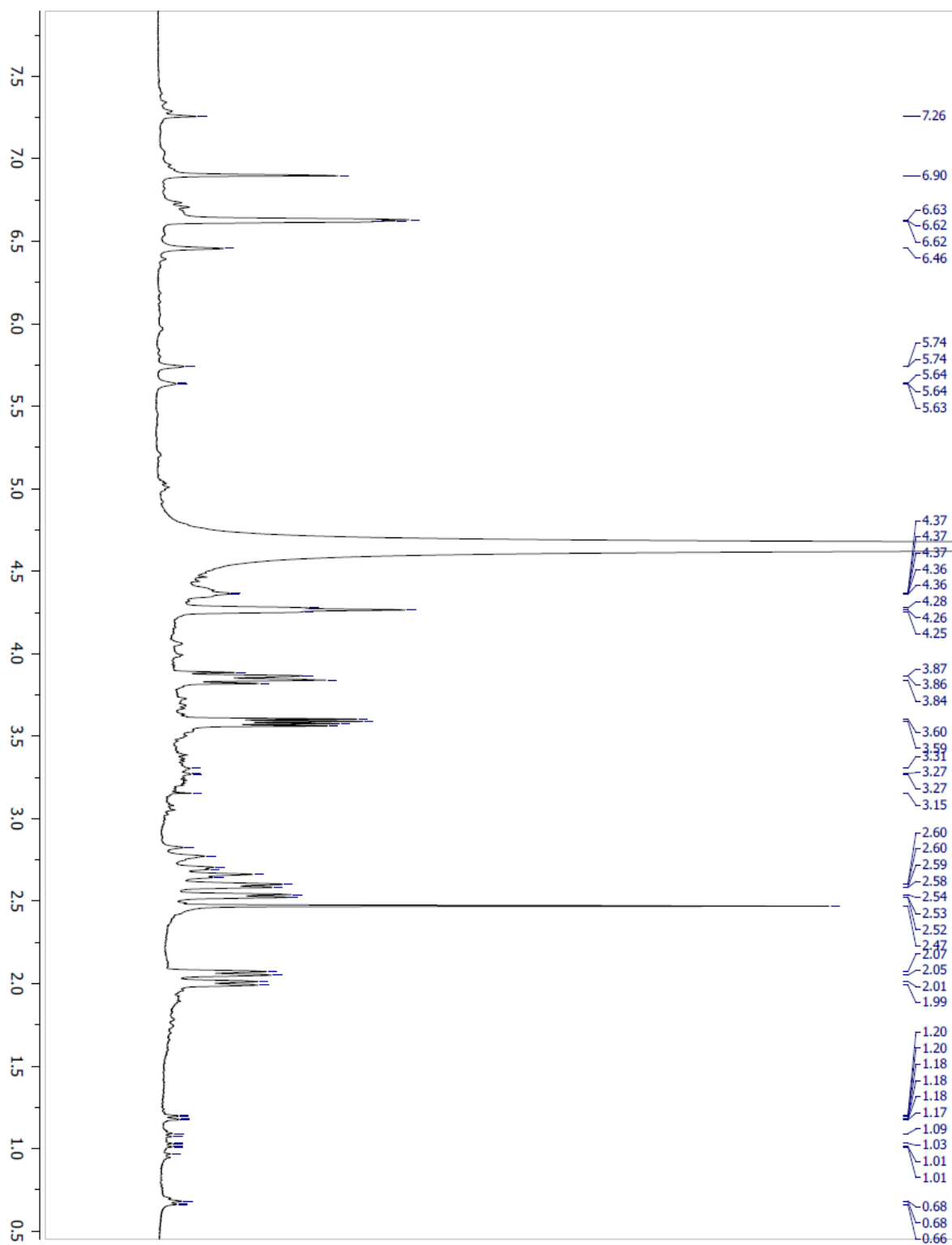


Figura 6.12. Espectro RMN- $^1\text{H}$  del extracto ácido de la semana 4

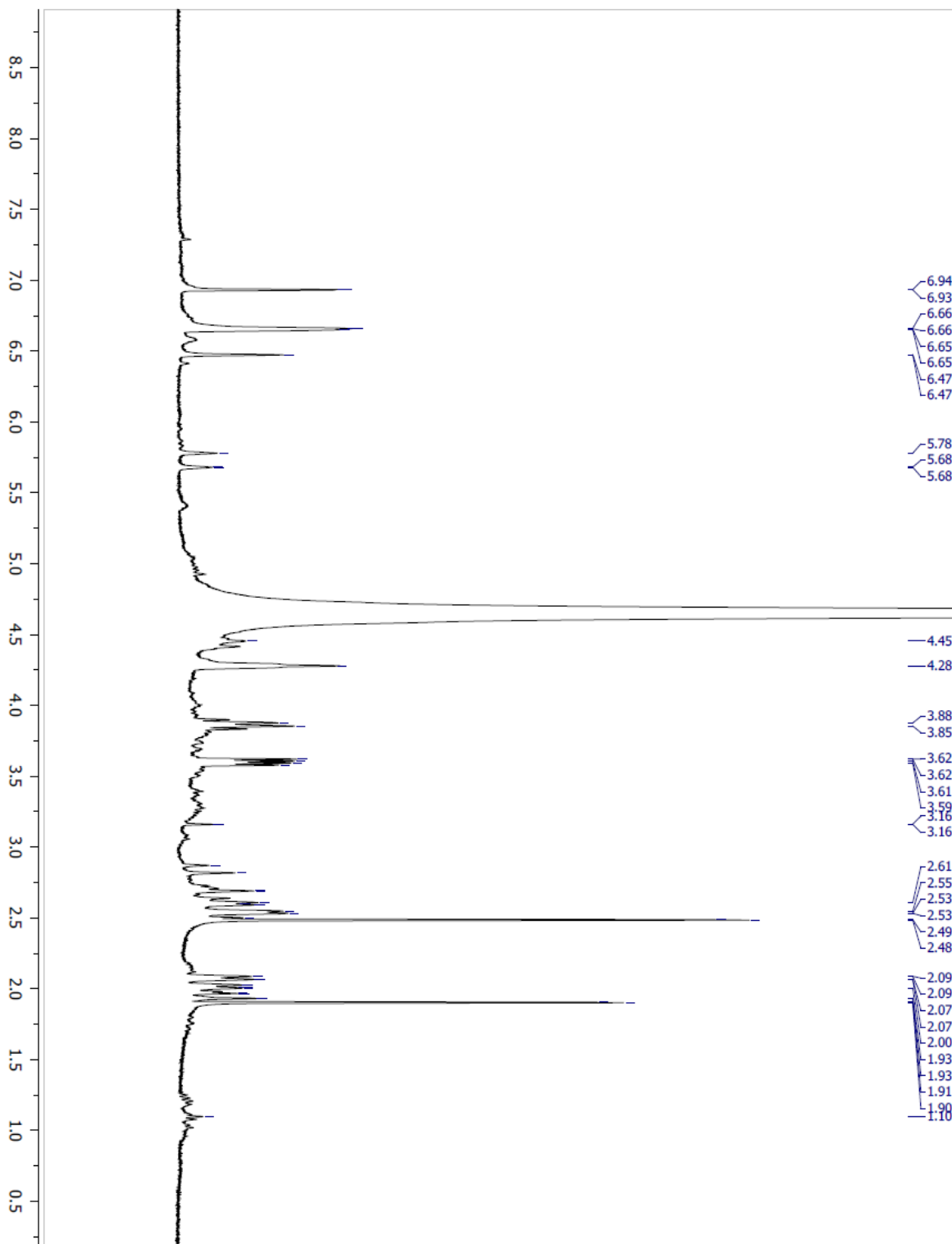
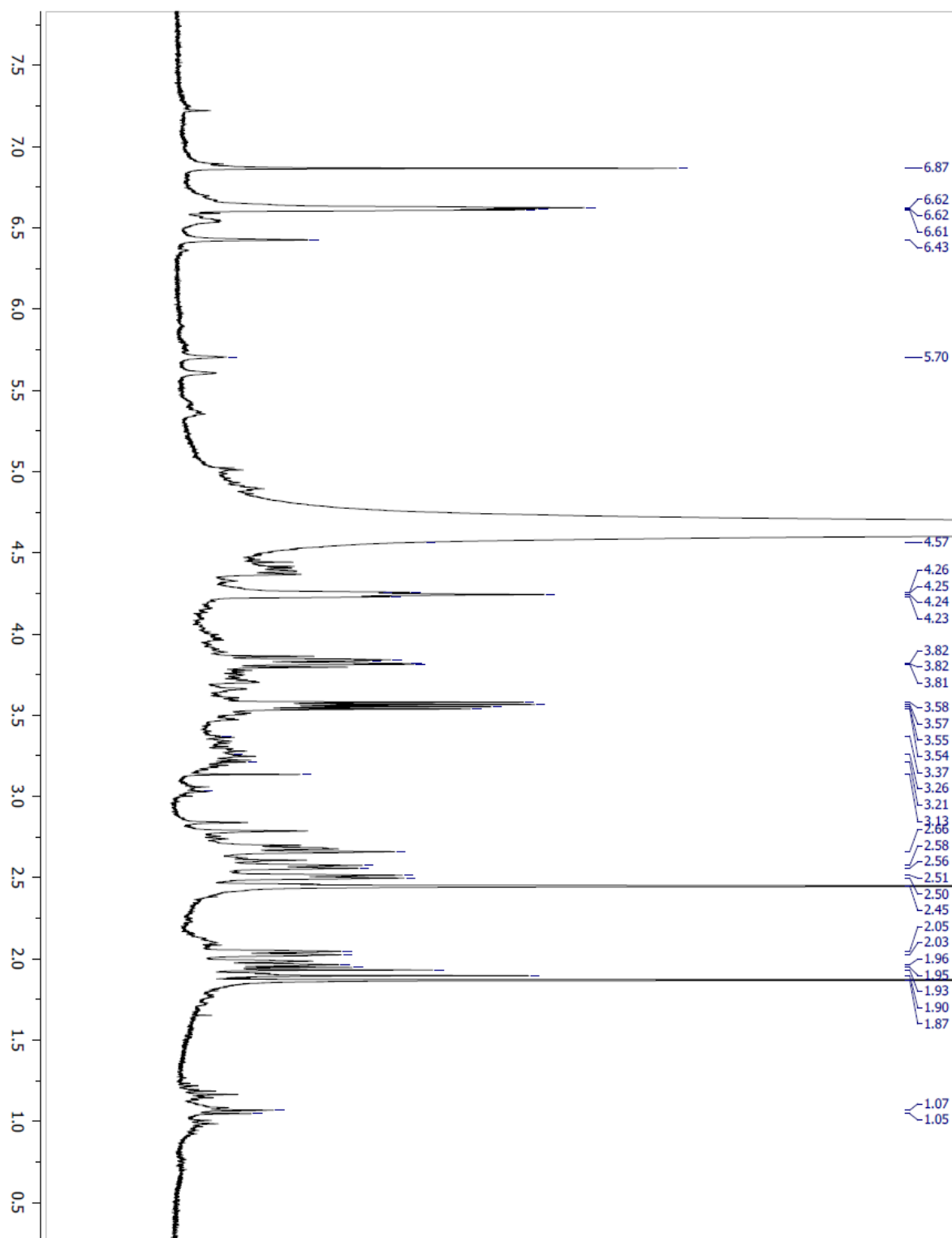


Figura 6.13. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del extracto ácido de la semana 5



**Figura 6.14.** Espectro RMN- $^1\text{H}$  del extracto ácido de la semana 6

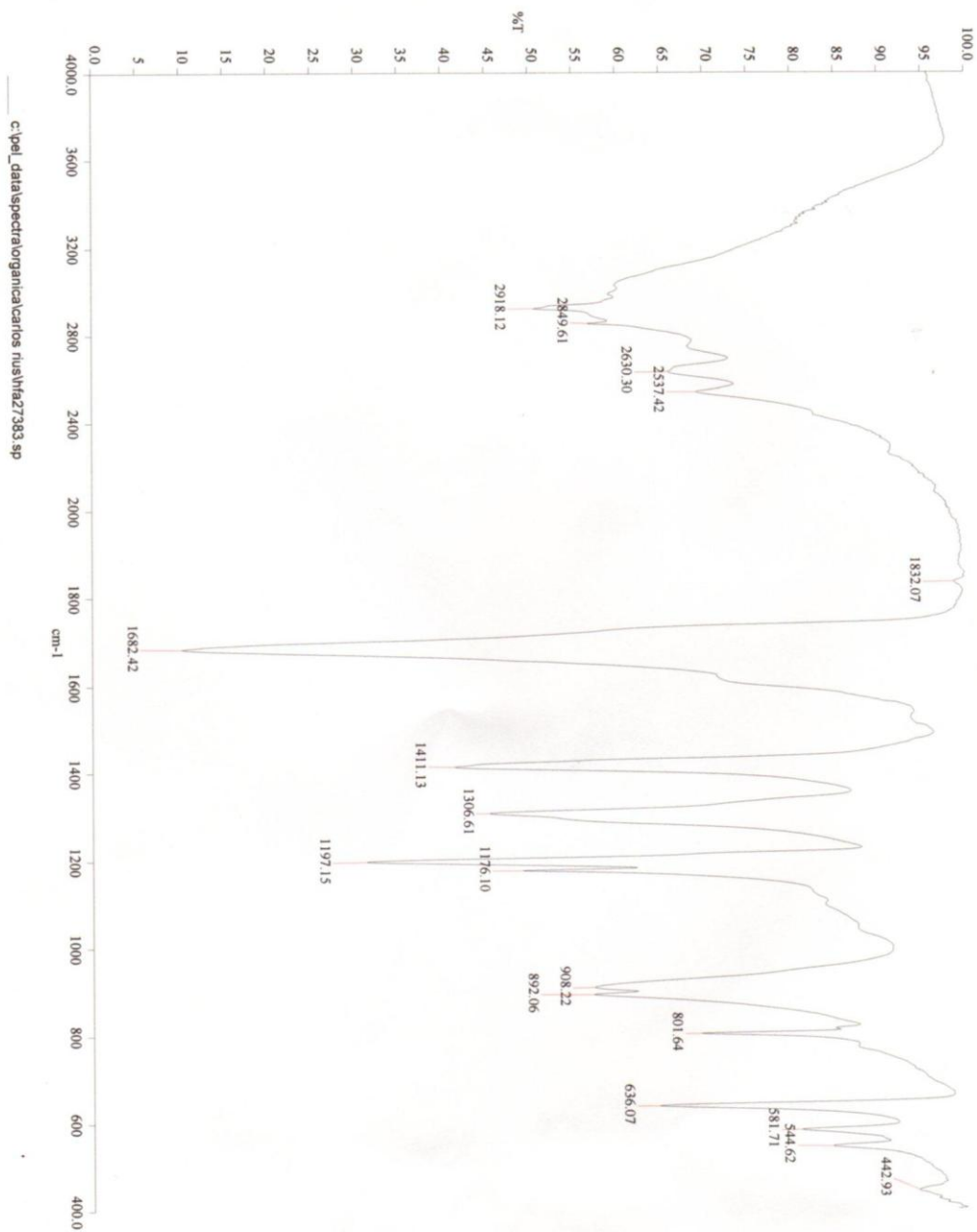


Figura 6.15. Espectro de Infrarrojo del ácido siquímico recristalizado