



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS NATURALES CON POSIBLE  
EFECTO INHIBITORIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA  
NEURAMINIDASA DE *Clostridium perfringens* POR MEDIO DE  
ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ENRIQUE ÁLVAREZ BOHÓRQUEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:	Profesora: María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL:	Profesora: Mireya Rodríguez Penagos
SECRETARIO:	Profesor: Luis Fernando Olguín Contreras
1er. SUPLENTE:	Profesor: Gerardo Omar Hernández Segura
2° SUPLENTE:	Profesora: Isabel del Carmen Rivero Cruz

## SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 102, Biofísicoquímica, Edificio B, Facultad de Química, UNAM.

## ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

## SUSTENTANTE:

Enrique Álvarez Bohórquez

Agradecimientos:

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal "ICyTDF" por el financiamiento del proyecto titulado: "Tecnología de microgotas en microchips para el descubrimiento de nuevos agentes antivirales", **Clave PIFUTP09-288**, con el cual se compraron los insumos para el desarrollo de esta tesis.

Al Programa 127 "Formación Básica en Investigación" de la Facultad de Química por el otorgamiento de una beca para realizar esta tesis correspondiente al periodo 2012-2013.

Al Dr. Luis Olgún por todo este tiempo, el conocimiento, los consejos y la confianza desde el primer día, y las facilidades en la comunicación con otros investigadores. A la M. en C. Margarita Romero Ávila, del departamento de orgánica, quien con mucho gusto me asesoró en la parte de la química en la menos habilidades poseo, una gran persona. Al Dr. Fausto Rivero Cruz, quien en todo momento me facilitó muestras y apoyo.

A todos los integrantes del autoproclamado y rimbombante Laboratorio de Biofísicoquímica, donde deberían acudir quienes piensan que no es posible realizar trabajos de calidad y divertirse al mismo tiempo, en especial al grupo cosmopolita del cuarto oscuro de microfluídica, cuyas charlas enriquecieron mis conocimientos en tantos aspectos de la vida y el trabajo, principalmente la idea original de Benjamín de evaluar el efecto del Umckaloabo, gracias.

A las pláticas tan interesantes de Zulem, a quien solo pude conocer por Adriana, con quien he compartido clases, infinitos momentos de ocio, datos curiosos y cafeterías que me han hecho el día tantos días, ¡buen trabajo de tu madre!.

A Xiao, por abrirme al mundo de los Q., por sus referencias analíticas que me sirvieron en esta tesis y porque muchos deberían tener tu paciencia y amabilidad.

A Miguel, porque ha estado desde hace tantos años que no es posible que todas las salidas y palabras no influyeran en mi estado de ánimo en este tiempo.

A mis amigos con quien no podido estar, pero con quienes he compartido mí día a día en charlas, los aprecio a todos. A Susana, siempre fue bueno conocer nuevos lugares.

Y a mi familia, a quienes a veces apenas puedo ver, pero que siempre ha creído en mí, quizás más de lo que yo lo hago o lo que he logrado hasta ahora, apoyando mis decisiones y no estableciéndolas, a pesar de lo que ello haya significado, gracias.

*Primero decide curarte, después deja de hacer lo que te enferma.*

# CONTENIDO

---

LISTA DE FIGURAS.....	3
1 INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVOS.....	11
Objetivo general .....	11
Objetivos particulares.....	11
HIPÓTESIS .....	12
2 ANTECEDENTES.....	13
<b>2.1 Importancia del estudio de las neuraminidasas</b> .....	13
<b>2.2 Generalidades de las neuraminidasas</b> .....	14
2.2.1 Neuraminidasa de <i>Clostridium perfringens</i> .....	15
<b>2.3 Métodos empleados en la medición de la actividad de las neuraminidasas</b> .....	16
2.3.1 Síntesis de sustrato fluorogénico.....	18
<b>2.4 Inhibición de la neuraminidasa con extractos naturales</b> .....	20
<b>2.5 Principios básicos de la enzimología</b> .....	22
2.5.1 Cinética enzimática.....	22
2.5.2 Inhibición enzimática.....	24
3 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	26
<b>3.1 Influencia del pH en la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i></b> .....	26
3.1.1 Preparación de reactivos.....	26
3.1.2 Metodología.....	27
<b>3.2 Caracterización de un control positivo de inhibición (Zanamivir)</b> .....	28
3.2.1 Preparación de reactivos.....	28
3.2.2 Metodología.....	28
<b>3.3 Evaluación de extractos naturales con posible actividad inhibitoria</b> .....	29
3.3.1 Preparación de reactivos.....	29
3.3.2 Soluciones de trabajo de los extractos naturales .....	29
<b>3.4 Síntesis del glucósido fluorogénico</b> .....	34
3.4.1 Preparación de reactivos.....	34
3.4.2 Metodología.....	35
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
<b>4.1 Efecto del pH en la actividad de la neuraminidasa</b> .....	43
4.1.1 Cinética a pH 6.....	46

4.1.2	Cinética a pH 7 .....	47
4.1.3	Cinética a pH 8 .....	48
4.1.4	Cinética a pH 9 .....	49
<b>4.2</b>	<b>Caracterización de un control positivo de inhibición (Zanamivir) .....</b>	<b>50</b>
4.2.1	Efecto del Zanamivir sobre la velocidad inicial .....	50
4.2.2	Determinación del tipo de inhibidor .....	51
4.2.3	Determinación de la IC <sub>50</sub> para el zanamivir .....	55
<b>4.3</b>	<b>Evaluación de extractos naturales con posible actividad inhibitoria .....</b>	<b>57</b>
4.3.1	Miel .....	59
4.3.2	<i>Pelargonium sidoides</i> .....	60
4.3.3	Xantonas .....	62
4.3.4	Propóleo .....	64
4.3.5	Tés .....	66
4.3.6	Comparación del efecto de los extractos en la actividad de la neuraminidasa ...	70
<b>4.4</b>	<b>Síntesis de glucósido fluorogénico .....</b>	<b>75</b>
4.4.1	Protección del ácido neuramínico .....	78
4.4.2	Cloración/acetilación .....	78
4.4.3	Unión a la fluoresceína sódica .....	79
4.4.4	Desprotección de la molécula .....	79
5	CONCLUSIONES .....	80
6	BIBLIOGRAFÍA .....	81
ANEXO 1	Curvas de calibración .....	83
	4-metilumbeliferona .....	83
	4-nitrofenol .....	85

# LISTA DE FIGURAS

---

FIGURA 2-1 Pandemias de influenza de 1700-2000 [1].....	13
FIGURA 2-2 Anclaje de la neuraminidasa viral con el ácido siálico en membrana celular del huésped [5]. .....	14
FIGURA 2-3 Reacción enzimática de la neuraminidasa. Tomado de Worthington [6]. .....	15
FIGURA 2-4 Estructura de la neuraminidasa NanI de <i>Clostridium perfringens</i> acomplejada con ácido siálico. PDB 2BF6.....	16
FIGURA 2-5 Hidrólisis del sustrato 4-MUNANA en presencia de la neuraminidasa. ....	17
FIGURA 2-6 Espectro de absorción y emisión de la 4-metilumbeliferona a pH 9 [13]. .....	17
FIGURA 2-7 Espectro de absorción del 4-nitrofenol y 2-O-(p-nitrofenil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico en solución alcalina [14]. .....	18
FIGURA 2-8 Espectro de excitación y emisión de la resorufina, Sigma-Aldrich, Product Information .....	19
FIGURA 2-9 Espectro de excitación (A) y emisión de la fluoresceína (B) [13]. .....	19
FIGURA 2-10 Reacción general de la síntesis del compuesto fluorogénico .....	20
FIGURA 2-11 Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática [27]. .....	24
FIGURA 2-12. Modelo de dobles recíprocos, o de Lineweaver-Burk.....	24
FIGURA 2-13. Modelo de la inhibición enzimática mixta. ....	25
FIGURA 3-1 Mezcla de xantonas provenientes de <i>Calophyllum brasiliensis</i> . .....	32
FIGURA 3-2 Procesos en la síntesis del glucósido fluorescente .....	35
FIGURA 3-3 Espectro de absorción (Uv-Vis) del sustrato fluorogénico metoxilado, como sustrato de la neuraminidasa de <i>Clostridium perfringens</i> .....	38
FIGURA 4-1 Progreso de la reacción de hidrólisis de 200 $\mu$ M de 4-MUNANA en amortiguador de fosfatos 50 mM de fosfatos pH 7, 150 mM KCl y 0.2 % de BSA, llevada a cabo por 65 minutos.....	39
FIGURA 4-2 Punto isobéptico a 320 nm registrado durante el progreso de la reacción de hidrólisis de 200 $\mu$ M de 4-MUNANA en amortiguador de fosfatos 50 mM de fosfatos pH 7, 150 mM KCl y 0.2 % de BSA. ....	40

FIGURA 4-3 Espectro de absorción del ácido 2-(4-metilumbilferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico 200 $\mu$ M a pH 7 en amortiguador de fosfatos y del producto de su hidrólisis: la 4-metilumbeliferona. ....	40
FIGURA 4-4 Diferencia de absorbancias entre el producto (4-MU) formado al finalizar la reacción y el sustrato (4-MUNANA) al inicio de la misma (200 $\mu$ M, pH 7).....	41
FIGURA 4-5. A, Espectro de absorción de la hidrólisis de 4-MUNANA a pH 7 en amortiguador de fosfatos por 80 minutos. B, formación de la 4-metilumbeliferona ( $\mu$ M) a pH 7 en amortiguador de fosfatos, a 370 nm, 80 minutos.....	42
FIGURA 4-6 Cambio en la concentración de 4-MU formada por la neuraminidasa a diferentes concentraciones de sustrato y a distintos tiempos, en amortiguador de fosfatos 50 mM de fosfatos pH 7, 150 mM KCl y 0.2 % de BSA. ....	43
FIGURA 4-7 Influencia del pH en: A. la $V_{max}$ ; B. la $K_m$ y; C. comparación en la disminución de los valores de las constantes cinéticas expresadas como porcentajes. ....	44
FIGURA 4-8 Gráfica de Michaelis-Menten para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000 $\mu$ M en pH 6. Ajuste no lineal.....	46
FIGURA 4-9 Gráfica de dobles inversos para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000 $\mu$ M en pH 6. Ajuste lineal empleando Origin 8. ....	46
FIGURA 4-10 Gráfica de Michaelis-Menten para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000 $\mu$ M en pH 7. Ajuste no lineal empleando Origin 8.....	47
FIGURA 4-11 Gráfica de dobles inversos para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000 $\mu$ M en pH 7. Ajuste lineal empleando Origin 8. ....	47
FIGURA 4-12 Gráfica de Michaelis-Menten para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000 $\mu$ M en pH 8. Ajuste no lineal.....	48
FIGURA 4-13 Gráfica de dobles inversos para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000 $\mu$ M a pH 8. Ajuste lineal empleando Origin 8. ....	48
FIGURA 4-14 Gráfica de Michaelis-Menten para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000 $\mu$ M en pH 9. Ajuste no lineal.....	49
FIGURA 4-15 Gráfica de dobles inversos para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000 $\mu$ M a pH 9. Ajuste lineal empleando Origin 8. ....	49
FIGURA 4-16 Efecto del zanamivir en la $V_o$ a diferentes concentraciones de sustrato sobre la enzima neuraminidasa de <i>Clostridium perfringens</i> a pH 7 en amortiguador de fosfatos 50 mM, KCl 150 mM y 0.2 % de BSA. ....	51

FIGURA 4-17 Ajuste al modelo de Lineweaver-Burk del efecto del zanamivir a diferentes concentraciones de sustrato sobre la neuraminidasa a pH 7 en amortiguador de fosfatos 50 mM, KCl 150 mM y 0.2 % de BSA. ....	52
FIGURA 4-18 Determinación de la constante de disociación del complejo E-I, $K_i$ , a partir de diferentes concentraciones de zanamivir en la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA por la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, 25°C a 370 nm. ....	53
FIGURA 4-19 Determinación de la constante de disociación del complejo ESI, $K'_i$ , a partir de diferentes concentraciones de zanamivir en la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA por la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, 25°C a 370 nm. ....	53
FIGURA 4-20 Efecto del zanamivir a diferentes concentraciones de sustrato sobre la enzima neuraminidasa a pH 7 en amortiguador de fosfatos 50 mM, KCl 150 mM y 0.2 % de BSA. Ajuste a un modelo de inhibición no competitiva (valores de $K_m$ iguales).....	54
FIGURA 4-21 Efecto del zanamivir a diferentes concentraciones de sustrato sobre la enzima neuraminidasa a pH 7 en amortiguador de fosfatos 50 mM, KCl 150 mM y 0.2 % de BSA. Ajuste a un modelo de inhibición competitiva (valores de $V_{max}$ iguales).....	55
FIGURA 4-22 Reducción de la velocidad inicial de la reacción enzimática a diferentes concentraciones de zanamivir (5, 10, 15 y 20 mM) a pH 7 en amortiguador de fosfatos 50 mM, KCl 150 mM y 0.2 % de BSA. ....	56
FIGURA 4-23 Efecto de la miel comercial sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubacion de 15 mins. ....	59
FIGURA 4-24 Efecto de la miel a granel sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubacion de 15 mins. ....	60
FIGURA 4-25 Efecto de la disolución metanólica de <i>Pelargonium sidoides</i> sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubacion de 15 mins.....	61
FIGURA 4-26 Efecto de la solución acuosa de <i>Pelargonium sidoides</i> [0.34 mg/mL] sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubacion de 15 mins.....	61
FIGURA 4-27 Efecto de la disolución acuosa de <i>Pelargonium sidoides</i> [0.2 mg/mL] y [0.4 mg/mL] sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubacion de 15 mins. ....	62

FIGURA 4-28 Cromatograma del extracto de <i>Pelargonium sidoides</i> . Agua-MeOH, 95:5 (0-4 min), 80:20 (8-11 min), 65:35 (16-19 min), 40:60 (21-25 min), 0:100 (27-28 min). Columna Premier Ultra II C18 (30 x 2.1 mm x 3 $\mu$ m) a $\lambda$ =330 nm. ....	62
FIGURA 4-29 Efecto de las xantonas en metanol sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubacion de 15 mins. (4-nitrofenol),	63
FIGURA 4-30 Cromatograma del extracto de xantonas. Agua-MeOH 50:50 (0-2 min), 25:75 (6-9 min), 5:95 (14-17 min), 50:50 (20-25 min). Columna Premier Ultra II C18 (30 x 2.1 mm x 3 $\mu$ m) a $\lambda$ =276 nm.....	63
FIGURA 4-31 Efecto del propóleo A (Acuexcomatl) en metanol sobre la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.....	64
FIGURA 4-32 Efecto del propóleo B (1era colecta de Trojes) en metanol sobre la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 min.....	65
FIGURA 4-33 Efecto del extracto acuoso del propóleo C (2da. colecta de Trojes) sobre la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins. ....	66
FIGURA 4-34 Efecto del extracto de té de limón sobre la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubacion de 15 mins. ....	66
FIGURA 4-35 Efecto del extracto de té de jamaica sobre la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.....	67
FIGURA 4-36 Efecto del extracto de té de hierbabuena sobre la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.....	67
FIGURA 4-37 Efecto del extracto de té de limón sobre la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubacion de 15 mins. ....	68
FIGURA 4-38 Efecto del extracto de té de jamaica sobre la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubacion de 15 mins.....	69

FIGURA 4-39 Efecto del extracto de té de hierbabuena sobre la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.....	70
FIGURA 4-40 Efecto de distintos extractos naturales sobre la velocidad inicial. Resultados de baja inhibición.....	71
FIGURA 4-41 Efecto de distintos extractos naturales sobre la velocidad inicial. Resultados de alta inhibición.....	71
FIGURA 4-42 Comparación de las concentraciones inhibitorias 50 (IC <sub>50</sub> ) de los extractos con alta inhibición y del control positivo: zanamivir. ....	74
FIGURA 4-43 Rendimientos de cada paso en la síntesis del compuesto fluorogénico .....	76
FIGURA 4-44 Resonancia protónica del ácido neuramínico <b>(1)</b> .....	77
FIGURA 4-45 Resonancia protónica del ácido neuramínico metoxilado <b>(2)</b> . ....	78
FIGURA 4-46 Resonancia protónica del ácido neuramínico metoxilado, acetilado y clorado <b>(3)</b> . ....	78
FIGURA 4-47 Resonancia protónica del glucósido fluorogénico protegido <b>(5)</b> . ....	79
FIGURA 4-48 Resonancia protónica del glucósido fluorogénico metoxilado <b>(6)</b> . ....	79

Tabla 2-1 Comparativa de estudios sobre extractos naturales relacionados con la inhibición enzimática de la neuraminidasa o del crecimiento viral del virus de la influenza .....	20
Tabla 2-2 Tipos de inhibición enzimática [28]. ....	25
Tabla 3-1 Preparación de los amortiguadores de fosfatos .....	26
Tabla 3-2 Preparación de los ensayos de influencia del pH en la actividad de la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> . ....	27
Tabla 3-3 Preparación de los ensayos de inhibición con Zanamivir. ....	28
Tabla 3-4 Preparación de los ensayos de inhibición con el producto Umckaloabo. ....	30
Tabla 3-5 Preparación de ensayos de inhibición, por triplicado, del producto Umckaloabo. ....	31
Tabla 3-6 Preparación de los ensayos de inhibición con miel. ....	31
Tabla 3-7 Preparación de los ensayos de inhibición con xantonas. ....	32
Tabla 3-8 Preparación de los ensayos de inhibición con propóleo. ....	33
Tabla 3-9 Preparación de los ensayos de inhibición con té de limón. ....	34
Tabla 4-3 Solubilidad de los extractos de <i>P. sidoides</i> , miel, propóleo y xantonas. ....	57

## Abreviaturas

4-MU, 4-metilumbeliferona

4-MUNANA, ácido 2-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-n-acetilneuramínico

BSA, albúmina de suero bovino

CCF, cromatografía en capa fina

D. E. Desviación estándar

HPLC, cromatografía líquida de alta eficacia

EC<sub>50</sub>, Concentración efectiva 50

IC<sub>50</sub>, concentración inhibitoria 50

ID<sub>50</sub>, dosis inhibitoria 50

K<sub>m</sub>, constante de Michaelis-Menten

MIC, concentración mínima inhibitoria

nm, nanómetros

NA, neuraminidasa

RMN, resonancia magnética nuclear

R<sub>f</sub>, factor de retención (cromatografía)

V<sub>0</sub>, velocidad inicial

V<sub>max</sub>, velocidad máxima

# 1 INTRODUCCIÓN

---

Dentro de las enfermedades respiratorias la influenza es una de las de mayor importancia, tanto por su incidencia como por su gravedad.

Su agente causal es un virus que contiene en su superficie diversas proteínas que le sirven como herramientas en su ciclo infectivo. Dos de ellas tienen una relevancia mayor en los esfuerzos recientes para evitar la propagación del virus: la hemaglutinina y la neuraminidasa. La primera de ellas es empleada por el virus para anclarse a la membrana celular del huésped, con lo cual el virus logra penetrar la célula, acceder a la maquinaria celular del huésped y reproducirse. La segunda, la neuraminidasa, entra en acción cuando las nuevas copias del virus requieren salir de la célula, pero quedan adheridas a la membrana de ésta. Esta adhesión es debida a la interacción de la superficie viral con los ácidos siálicos, también conocidos como ácidos neuramínicos, que se encuentran expuestos en la membrana celular del huésped. La ruptura de ésta interacción es catalizada por la enzima neuraminidasa.

El estudio de inhibidores de estas proteínas llevó a desarrollar fármacos como el zanamivir y el oseltamivir, que reducen de forma importante la actividad de la neuraminidasa y detienen la propagación del virus. Sin embargo, la propensión del virus por mutar su contenido genómico ha generado variantes resistentes a los mencionados fármacos.

El objetivo de esta tesis es la búsqueda de nuevos inhibidores de la neuraminidasa a partir de extractos naturales de plantas. Ya que la neuraminidasa viral no está disponible comercialmente ni se cuenta con las medidas de seguridad necesarias para obtenerla, se decidió emplear la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, que es una enzima homóloga a la del virus. Para realizar el estudio se empleó una técnica espectrofotométrica con la que se cuantifica la hidrólisis de un

ácido neuramínico acoplado a un fluoróforo (4-metilumbeliferona) que tiene un espectro de absorción diferente en estado libre que en el estado acoplado.

Para la búsqueda de inhibidores se reunieron posibles candidatos basados en conocimientos populares de remedios empleados en enfermedades respiratorias como son los productos avícolas (mieles y propóleos); productos comerciales que anuncian tales propiedades (umckaloabo y té de limón); y familias de compuestos relacionados con la capacidad de inhibir a la neuraminidasa (xantonas).

Por último, se estableció una metodología para la síntesis de un nuevo compuesto fluorogénico que sirva como nuevo sustrato para reacciones de laboratorio con la neuraminidasa, es decir, un compuesto como el acoplado a la 4-metilumbeliferona, pero que se encuentre unido a otro compuesto fluorescente, cuya espectro de absorción coincida con las necesidades específicas necesarias para montar ensayos en sistemas a microescala, denominados microchips.

# OBJETIVOS

---

## OBJETIVO GENERAL

---

Evaluar la capacidad de distintos extractos naturales para inhibir la actividad enzimática de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* y sintetizar un sustrato fluorogénico que permita, en un futuro, la cuantificación de ésta actividad enzimática en sistemas de microchips.

## OBJETIVOS PARTICULARES

---

- Desarrollar un ensayo espectrofotométrico para cuantificar la actividad catalítica de la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens* empleando como sustrato el ácido 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico.
- Determinar el efecto del pH en la actividad catalítica de la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens*,
- Evaluar la capacidad del Zanamivir, fármaco que bloquea a la neuraminidasa del virus de la influenza, de inhibir la actividad catalítica de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, con la finalidad de ser considerado como referencia en el análisis de los extractos naturales.
- Cuantificar el efecto inhibitorio de los extractos naturales seleccionados sobre la actividad enzimática de la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens*.
- Determinar las condiciones experimentales necesarias para la marcación del ácido neuramínico con un compuesto fluorescente, como lo es la fluoresceína sódica, con el fin de emplearlo como sustrato de la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens* en un ensayo en microchips para su detección de fluorescencia.

# HIPÓTESIS

---

Debido a que existen reportes en la literatura sobre extractos naturales con capacidad de reducir la incidencia de enfermedades respiratorias, inhibir la actividad viral e incluso inhibir la actividad enzimática de neuraminidasas, entonces es posible suponer que estos efectos puedan reproducirse en la sialidasa de *Clostridium perfringens* y sirvan como base de estudios posteriores con la neuraminidasa viral.

# 2 ANTECEDENTES

---

## 2.1 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LAS NEURAMINIDASAS

---

La incidencia de las enfermedades en las vías respiratorias es un problema recurrente en el campo de la salud pública. Estos padecimientos son causados por infecciones de origen bacterial, o viral, o bien por elementos tóxicos o irritantes en el aire. Su tratamiento es tan diverso como el origen de

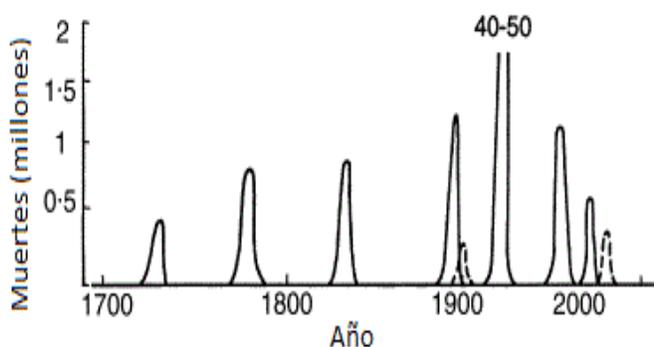


FIGURA 2-1 Pandemias de influenza de 1700-2000 [1]

estas afecciones. En años recientes se ha elevado la importancia de algunas de estas enfermedades, como es el caso de la influenza, una afección de la cual se tienen registros históricos que demuestran la gravedad de sus pandemias a través de los últimos siglos (FIGURA 2-1). El vector responsable de esta enfermedad es el virus de la influenza.

El estudio del virus de la influenza ha hecho posible identificar dos enzimas clave en su proceso infeccioso, por lo que la investigación referente al mismo ha sido dirigida en atacar a estas proteínas: la hemaglutinina y la neuraminidasa.

En el caso de la neuraminidasa se tienen ya inhibidores sintéticos de su actividad (FIGURA 2-2), el Zanamivir y el Oseltamivir, sin embargo han aparecido cepas resistentes a dichos fármacos [2], lo cual ha generado una búsqueda de nuevos inhibidores de la actividad de esta enzima.

## 2.2 GENERALIDADES DE LAS NEURAMINIDASAS

Las neuraminidasas, o sialidasas, catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos que unen al ácido neuramínico con glicoconjugados presentes normalmente en membranas celulares (FIGURA 2-3).

Las neuraminidasas existen en una amplia variedad de organismos, como en virus, bacterias, hongos e incluso en el humano, relacionándose en diversas enfermedades, dentro de las que se encuentran septicemias (*Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Corynebacteria*), mal de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) y enfermedad del sueño (*Trypanosoma Brucei*). La importancia de esta enzima en las enfermedades que ocasiona depende de cada microorganismo, sin embargo es posible señalar que varias de las bacterias con sialidasa la utilizan porque obtienen del ácido siálico una fuente de carbono y de energía [3]. En el caso del virus de la influenza, su presencia se ve implicada fuertemente en la liberación de los viriones del virus de la influenza en la célula huésped [4].

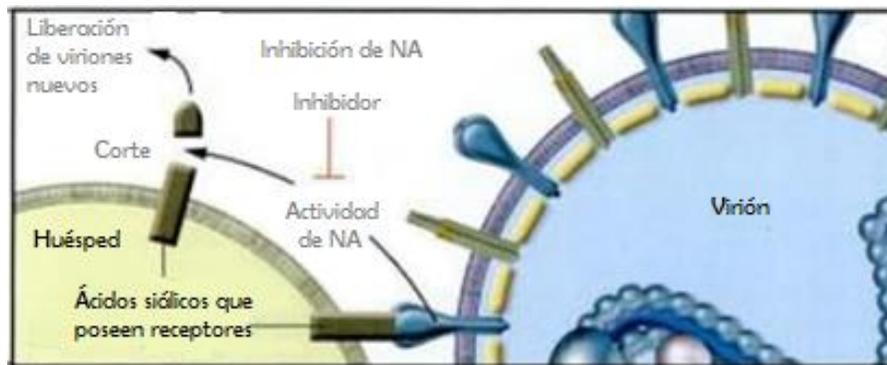


FIGURA 2-2 Anclaje de la neuraminidasa viral con el ácido siálico en membrana celular del huésped [5].

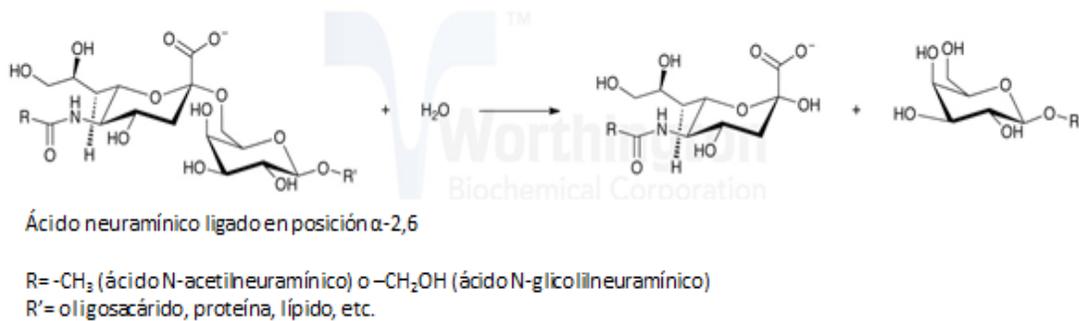


FIGURA 2-3 Reacción enzimática de la neuraminidasa. Tomado de Worthington [6].

En las bacterias, se puede decir que la presencia de sialidasas influye en la patogenicidad del microorganismo, presentando diferencias en la especificidad de sustratos y patrones de expresión. Otra característica de las sialidasas bacterianas es que pueden encontrarse en forma de monómeros (*NanA* y *NanB* de *Streptococcus pneumoniae*), pero también existen estudios donde reportan neuraminidasas con estructuras en forma de dímeros y trímeros (*Pseudomonas aeruginosa*) [7].

### 2.2.1 NEURAMINIDASA DE *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* es una bacteria gram positiva, anaerobia estricta, causante de intoxicaciones que derivan en enteritis necrótica (enfermedad que destruye la mucosa intestinal) y gangrena gaseosa (muerte celular en heridas del tejido blando debidas a una toxina de la bacteria) [8]. Secreta dos neuraminidasas distintas (además de una tercera que no es secretada): NanI (FIGURA 2-4) y NanJ, las cuales no son esenciales para su virulencia [9].

No obstante, la función de la enzima continúa siendo la hidrólisis de los enlaces glicosídicos del ácido neuramínico, por lo que se emplea como uno de los modelos en el estudio de las sialidasas de manera segura [10-12].



FIGURA 2-4 Estructura de la neuraminidasa NanI de *Clostridium perfringens* acomplejada con ácido siálico. PDB 2BF6

### 2.3 MÉTODOS EMPLEADOS EN LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS NEURAMINIDASAS

---

Los trabajos enfocados en la actividad de la neuraminidasa como blanco patogénico se llevaron a cabo principalmente, utilizando algunos métodos ya establecidos.

Generalmente se trabaja con neuraminidasas aisladas de los microorganismos, y se estudia el efecto de posibles inhibidores en la actividad enzimática utilizando ensayos con sustratos sintéticos que tienen marcadores fluorogénicos.

Para ello, se emplea principalmente la enzima aislada de *Clostridium perfringens*, junto con el ácido 2-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico (4-MUNANA), un glicósido fluorogénico que se encuentra formado por un ácido neuramínico y una cumarina, cuyo enlace es hidrolizado por la neuraminidasa. La fluorescencia de la 4-metilumbeliferona se mide en un rango de 440-450 nm, excitada a 375 nm en un pH alcalino, FIGURA 2-5 y FIGURA 2-6.

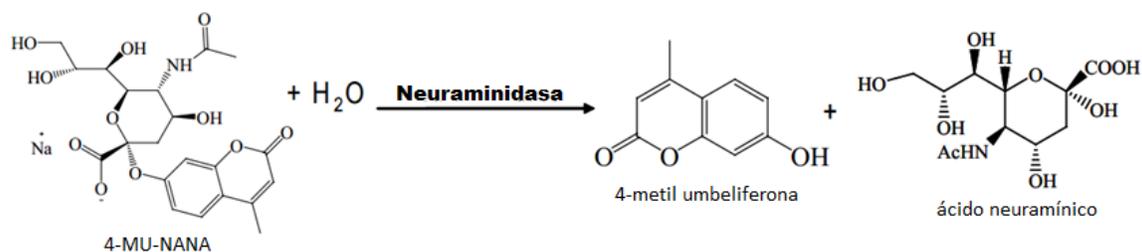


FIGURA 2-5 Hidrólisis del sustrato 4-MUNANA en presencia de la neuraminidasa.

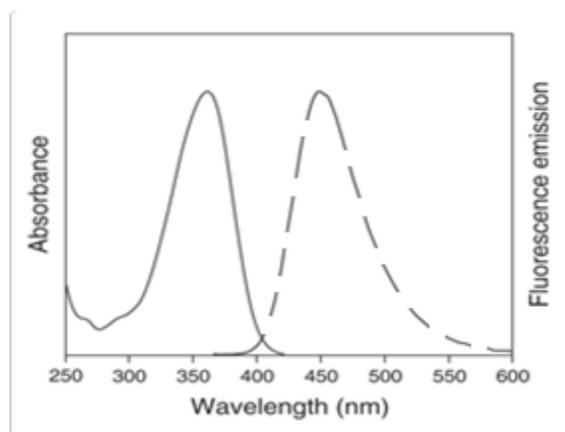


FIGURA 2-6 Espectro de absorción y emisión de la 4-metilumbeliferona a pH 9 [13].

También se han realizado ensayos utilizando como sustrato al ácido 2-O-(*p*-nitrofenil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico. A diferencia de la 4-MUNANA, el glicósido con nitrofenol no se emplea en técnicas fluorométricas, sino en espectrofotométricas. En este caso, la hidrólisis del sustrato, que absorbe aproximadamente a 300 nm, genera el 4-nitrofenol, que absorbe a 400 nm siempre y cuando se encuentre en medio alcalino. A un pH mayor a 7.1, pka del 4-nitrofenol, este compuesto se ioniza en 4-nitrofenolato, cuya absorción se presenta a 400 nm. FIGURA 2-7 [14].

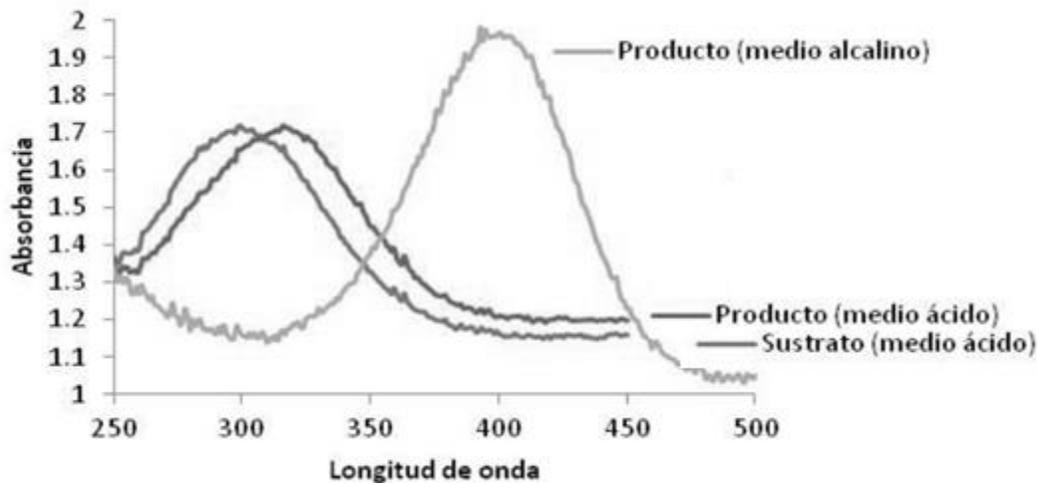


FIGURA 2-7 Espectro de absorción del 4-nitrofenol y 2-O-(p-nitrofenil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico en solución alcalina [14].

### 2.3.1 SINTESIS DE SUSTRATO FLUOROGÉNICO

Junto con el presente trabajo, se trató de implementar un sistema de microchips, microcanales en los cuales fluirían cientos de gotas conteniendo a la neuraminidasa y un sustrato compuesto del ácido neuramínico acoplado a un fluoróforo con capacidad de emitir fluorescencia al hidrolizarse su enlace con el ácido siálico. Una limitante del sistema era el láser con el que se contaba para excitar al fluoróforo pues es un haz de luz con longitud de onda de 488 nm, por lo que se requería que el fluoróforo fuera capaz de absorber ésta longitud de onda.

En este caso la 4 -MU queda fuera del rango de absorción de la que se ha descrito anteriormente, FIGURA 2-6. Debido a que no se tienen más sustratos comerciales que se puedan emplear, se planteó la idea de sintetizar un glicósido fluorogénico conformado por el ácido neuramínico y un fluoróforo capaz de absorber la luz incidida por el láser disponible.

Dentro de los fluoróforos comerciales capaces de absorber a tal longitud de onda, se encuentran la resorufina y la fluoresceína.

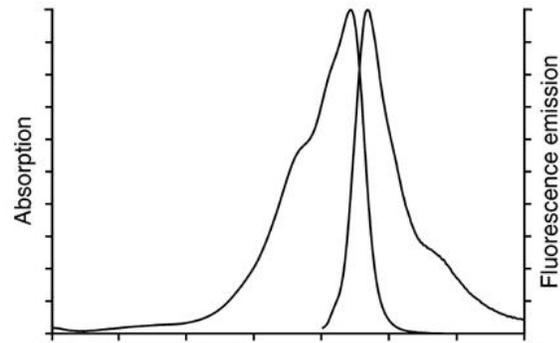


FIGURA 2-8 Espectro de excitación y emisión de la resorufina, Sigma-Aldrich, Product Information

La primera de ella, la resorufina, posee un máximo de excitación a 572 nm y uno de emisión a 583 a pH 7.7 con buffer de fosfatos 50 mM, FIGURA 2-8.

La segunda, la fluoresceína, tiene su máximo de excitación a entre 460 y 490 nm, dependiendo del pH, y el de emisión a 515 nm, FIGURA 2-9.

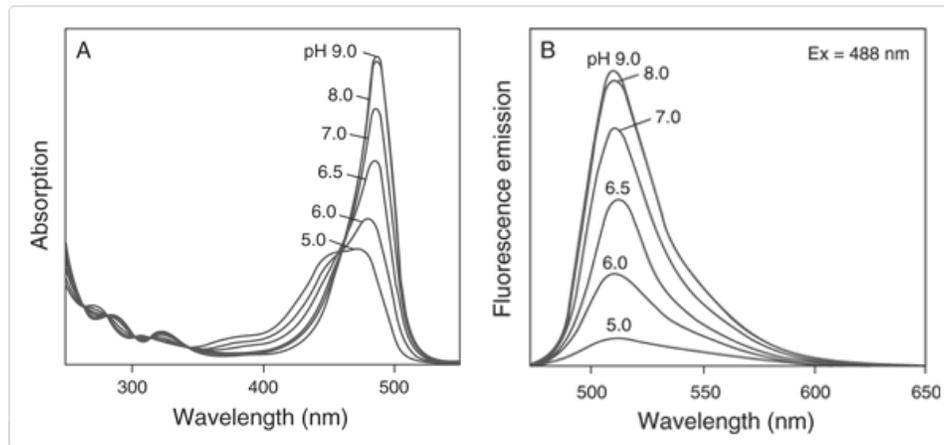


FIGURA 2-9 Espectro de excitación (A) y emisión de la fluoresceína (B) [13].

Con base en lo anterior, se consideró a la fluoresceína como un mejor candidato para realizar la síntesis del sustrato.

Siendo el ácido neuramínico un azúcar, contiene grupos hidroxilos fácilmente expuestos que impedirían la unión específica con la fluoresceína, por lo que el primer paso a llevarse a cabo es la protección de dichos grupos, para posteriormente realizar la unión de las moléculas y finalizar con su desprotección (FIGURA 2-10).

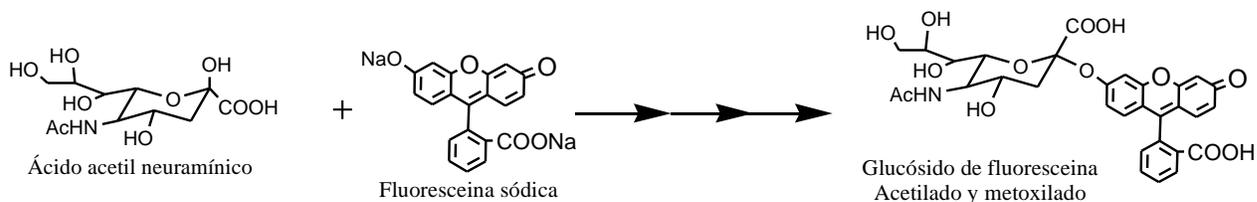


FIGURA 2-10 Reacción general de la síntesis del compuesto fluorogénico

## 2.4 INHIBICIÓN DE LA NEURAMINIDASA CON EXTRACTOS NATURALES

Uno de los objetivos del presente trabajo consiste en evaluar la influencia de algunos extractos naturales en la actividad enzimática de la sialidasa.

Existen actualmente estudios sobre diferentes extractos naturales con capacidad de reducir la incidencia de enfermedades respiratorias, como la influenza, e incluso, de actuar específicamente sobre la neuraminidasa. Aquí se exponen algunos detalles de estos trabajos.

TABLA 2-1 Comparativa de estudios sobre extractos naturales relacionados con la inhibición enzimática de la neuraminidasa o del crecimiento viral del virus de la influenza

Fuente natural	Fracción estudiada	Método de análisis o de cuantificación	Inhibición	Ref.
Propóleo	Isopentil ferulato (análogo sintético de un componente de la fracción etanólica)	Medición de la actividad infectiva de los virus H1N1, H2N2 y H3N2 en huevos de gallina.	Para el isopentil ferulato el $\log ID_{50}/mL=2.5$ , comparado con $\log ID_{50}/mL=2.3$ de la fracción total etanólica, en H3N2.	[15]
	13 fracciones etanólicas	Cuantificación de la concentración efectiva 50 para la reducción del placa de virus H1N1 en células MDCK	Se tuvo hasta una $EC_{50}=19.5 \pm \mu g/mL$ para una fracción.	[16]

		Sobrevivencia de ratones en ensayos <i>in vivo</i> .	71.4 % de los ratones infectados, inoculados con 10mg/kg de una fracción, sobreviven tras 10 días.	
	Etanólica, propóleo brasileño	Concentración mínima inhibitoria (MIC) por método de microdilución.	Se reporta una MIC entre 0.2-0.8 µg/mL para <i>S. pneumoniae</i> .	[17]
<i>Pelargonium sidoides</i>	Acetona-agua	Concentración mínima inhibitoria (MIC) por Método de microdilución.	MIC para <i>S. aureus</i> de 3.3 mg/mL	[18]
	Acetónica	Fluorescencia por la hidrólisis de 4-MUNANA en cultivo de virus H1N1.	IC <sub>50</sub> =121.7 µg/mL	[19]
<i>Cudrania tricuspidata</i>	Xantonas extraídas en acetato de etilo.	Fluorescencia por la hidrólisis de 4-MUNANA por neuraminidasa de <i>Clostridium perfringens</i> .	Los compuestos muestran IC <sub>50</sub> entre 0.08-1.27 µM, con control positivo de apigenina y mangiferina 17.4-16.2 µM.	[10]
<i>Garcinia mangostana</i>	Xantonas extraídas en cloroformo	Fluorescencia por la hidrólisis de 4-MUNANA (pH 5) por neuraminidasa de <i>Clostridium perfringens</i> .	IC <sub>50</sub> entre 0.27-65.7 µM	[11]
<i>Polygala karensium</i> **	Xantonas, extraídas en acetato de etilo	Fluorescencia por la hidrólisis de 4-MUNANA (pH 5) por neuraminidasa del virus de la influenza H1N1 y H9N2	IC <sub>50</sub> entre 15.46-28.42 µg/mL	[20]

<i>Echinacea purpurea</i>	Extracto etanólico	Concentración mínima inhibitoria (MIC) por efecto citopático en virus de la influenza H3N2	MIC 0.32 µg/mL para 10 <sup>2</sup> UFP*/mL de H3N2 (*Unidades formadoras de placa)	[21]
<i>Cleistocalyx operculatus</i>	Flavonoides del extracto metanólico	Fluorescencia por la hidrólisis de 4-MUNANA (pH 6.5) por neuraminidasa del virus de la influenza A H1N1 y H9N2	IC <sub>50</sub> de 8.15 µM para H1N1 y 3.31 µM para mutante de H1N1 resistente a Oseltamivir. Inhibidores no competitivos	[22]
<i>Gouania obtusifolia</i> , <i>Zizyphus cambodianay</i> <i>Mangifera odorata</i>	Extracción en MeOH, EtOAc y MeOH, respectivamente	Fluorescencia por la hidrólisis de 4-MUNANA (pH 5.9, 0.2 mM) por neuraminidasa (sin especificar)	IC <sub>50</sub> de 0.81 µM debido a mangiferina, 4.82-9.87 µM por flavonoides, 5.49-10.22 µM por catequinas.	[12]

Además de los ejemplos anteriores, existen otros estudios que podrían tener alguna implicación indirecta sobre la inhibición de la neuraminidasa. Una de ellas es la reducción en la actividad de otro tipo de sialidasas, las *trans*-sialidasas (que pueden actuar como sialidasas débiles [3]), de las cuales los extractos de polen se han reportado como fuerte inhibidor, así como un ligero efecto por parte de extractos de miel [23]. Se encuentran también extractos de diversas especies de equináceas a las cuales los virus de la influenza son vulnerables [24] así como infusiones a las que se les otorga la propiedad de ayudar en el tratamiento de gripe en general, como las del té de limón (*Cymbopogon citratus*) [25].

## 2.5 PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA ENZIMOLOGÍA

### 2.5.1 CINÉTICA ENZIMÁTICA

La actividad de una enzima, como la neuraminidasa, provoca la producción de un producto a partir de un sustrato inicial. La determinación de la velocidad de esta

reacción enzimática, sustrato a producto, y el modo en que ésta cambia en respuesta a cambios en los parámetros experimentales, es lo que se conoce como *cinética enzimática* [26].

Ya que la concentración del sustrato varía con el tiempo en una reacción catalizada por una enzima, por la transformación en producto, generalmente se mide la denominada velocidad inicial de la reacción,  $V_0$ , cuando la concentración de sustrato es mucho mayor que concentración de la enzima y por ende es posible considerarla constante.

Un rasgo característico de las reacciones enzimáticas es la saturación de la enzima por parte del sustrato. En la FIGURA 2-11, se observa que a bajas concentraciones del sustrato, la velocidad inicial de la reacción es proporcional a la concentración de sustrato. A concentraciones posteriores de sustrato, más altas, ésta proporcionalidad se pierde, para que, finalmente, a concentraciones de sustrato elevadas, la velocidad inicial de la reacción sea independiente de subsecuentes aumentos en la concentración del sustrato. Esta sección de la FIGURA 2-11, cuando se alcanza una meseta máxima en la velocidad inicial, tiene el nombre de velocidad máxima de la reacción,  $V_{max}$ . La constante de Michaelis,  $K_m$ , es la concentración del sustrato a la cual  $V_0$  es la mitad de  $V_{max}$ , y se puede considerar una medida de la afinidad de la enzima por su sustrato, ya que un valor bajo de  $K_m$  indica que se requiere poca cantidad de sustrato para alcanzar la  $V_{max}$ , y por lo tanto la afinidad de la enzima por el sustrato es alta. El ajuste de los datos de  $V_0$  en función de la  $[S]$  de la FIGURA 2-11 se encuentra descrito por el modelo de Michaelis-Menten.

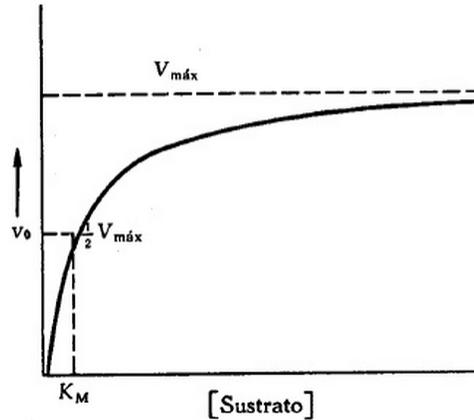


FIGURA 2-11 Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática [27].

Un modelo alternativo para determinar la velocidad máxima y la constante de Michaelis es el de dobles recíprocos, o modelo de Lineweaver-Burk.

En el modelo de Lineweaver-Burk, representado en la FIGURA 2-12, el inverso de la velocidad inicial se encuentra en función del inverso de la concentración de sustrato. La  $V_{\max}$  se obtiene como el inverso de la ordenada al origen y la  $K_m$  como el inverso de signo contrario  $1/V_0=0$ .

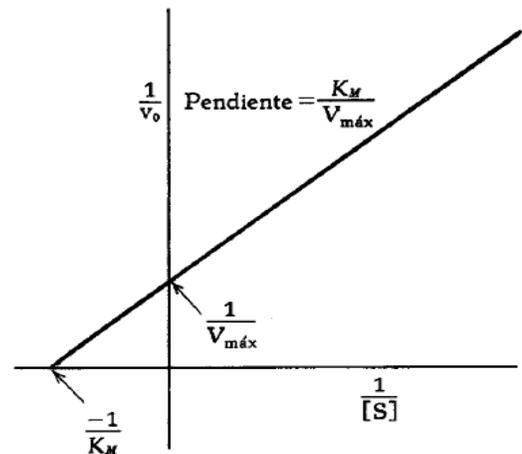


FIGURA 2-12. Modelo de dobles recíprocos, o de Lineweaver-Burk.

## 2.5.2 INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

La actividad catalítica de las enzimas es susceptible a la presencia de compuestos o metabolitos con capacidad de inhibir su funcionamiento.

Esta inhibición puede presentarse siguiendo distintos mecanismos que pueden ser clasificados en cuatro categorías, cuya influencia en las constantes cinéticas se resume en la TABLA 2-2:

Tabla 2-2 Tipos de inhibición enzimática [28].

Tipo de inhibición	Efecto en $V_{max}$	Efecto en $K_m$	
Competitiva	Ninguno	Aumenta	Impide unión E-S
Acompetitiva	Disminuye	Disminuye	Se une a E-S
No competitiva	Disminuye	Ninguno	Se une a E y a E-S
Mixta	Disminuye	Aumenta	Se une a E y a E-S

Cabe destacar que la inhibición mixta es una inhibición que conjuga tanto una inhibición competitiva como una no competitiva, cuyas constantes de equilibrio están dadas por  $K_i$  y  $K'_i$ , respectivamente, como se muestra en la FIGURA 2-13.

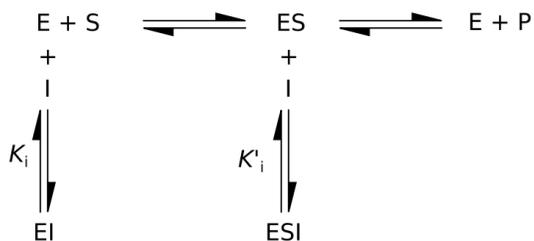


FIGURA 2-13. Modelo de la inhibición enzimática mixta.

# 3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los ensayos de la actividad enzimática de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* fueron realizados con una técnica espectrofotométrica en un equipo Varian Bio50, con el fin de monitorear la velocidad de hidrólisis del ácido 2-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico (4-MUNANA) en 4-metilumbeliferona (4-MU) en un rango de concentración de sustrato comprendido entre 40-1000  $\mu$ M, con temperatura constante de 25 °C, en celdas de 1 cm, a 370 nm.

## 3.1 INFLUENCIA DEL pH EN LA ACTIVIDAD DE LA NEURAMINIDASA DE *C. perfringens*

### 3.1.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

3.1.1.1 Medio de reacción: Amortiguador 50 mM de fosfatos pH 6, 7, 8 y 9, con 150 mM KCl y 0.2% BSA.

Se empleó un amortiguador con 150 mM de KCl (cristales J.T. Baker ACS, 99.8%), 50 mM fosfatos  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (J.T. Baker ACS, 100%) y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , (J.T. Baker ACS, 99.6 %) y 0.2% BSA (albúmina de suero bovino, Sigma A6003-5G), del cual se prepararon 100 mL de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 3-1 Preparación de los amortiguadores de fosfatos

pH	6	7	8	9
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (137.99 g/mol)	0.60617 g	0.28983 g	0.09629 g	0.00491 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (268.07 g/mol)	0.16242 g	0.77707 g	1.15327 g	1.33032 g
KCl (74.55 g/mol)	1.11821 g	1.11830 g	1.11810 g	1.11810 g
BSA	1.9997 g	0.19994 g	0.19985 g	0.19985 g
pH	6.01	7.03	7.95	9.00

### 3.1.1.2 Solución concentrada de la sal sódica del ácido 2-(4-metilumbilferil)- $\alpha$ -D-n-acetilneuramínico (P.M. 489.41 g/mol, Sigma M8639-1MG)

---

Se disolvió 1 mg del 4-MUNANA en 255.4  $\mu$ L de agua desionizada, para obtener una concentración 8 mM, de la cual se tomaron alícuotas para formar el stock de trabajo, a 1.5 mM en amortiguador de fosfatos del pH correspondiente, que fue el usado directamente en el ensayo.

### 3.1.1.3 Solución stock de la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Sigma Aldrich N2876-100UN)

---

Se preparó un stock inicial con 0.86 mg de enzima, diluida en 430  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos pH 7 para obtener una concentración de 6 U/mL (cada mg posee 3 unidades).

A continuación se requería un stock de trabajo menos concentrado, 0.4 U/mL, el cual se preparó a partir de la dilución de 10  $\mu$ L en 140  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos a su respectivo pH.

## 3.1.2 METODOLOGÍA

---

Para cada pH se determinó la cinética de la hidrólisis enzimática, utilizando 5 concentraciones diferentes de sustrato. La reacción se monitoreó 120 minutos como máximo, registrándose la absorbancia a intervalos de 2 minutos los primeros 20 minutos y cada 5 minutos del minuto 22 al 120. Sin importar el pH, la cinética se determinó mezclando las siguientes cantidades de reactivos, de acuerdo al esquema siguiente:

TABLA 3-2 Preparación de los ensayos de influencia del pH en la actividad de la neuraminidasa de *C. perfringens*.

Enzima (U)	[Sustrato]	Enzima 0.4U/mL	Sustrato 1.5mM	Amortiguador
0.0033	1 mM	8.3 $\mu$ L	80 $\mu$ L	31.7 $\mu$ L
0.0033	0.4 mM	8.3 $\mu$ L	32 $\mu$ L	79.7 $\mu$ L
0.0033	0.2 mM	8.3 $\mu$ L	16 $\mu$ L	95.7 $\mu$ L
0.0033	0.1 mM	8.3 $\mu$ L	8 $\mu$ L	103.7 $\mu$ L
0.0033	0.04 mM	8.3 $\mu$ L	3.2 $\mu$ L	108.5 $\mu$ L

## 3.2 CARACTERIZACIÓN DE UN CONTROL POSITIVO DE INHIBICIÓN (ZANAMIVIR)

### 3.2.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Se empleó la misma preparación que en los casos 3.1.1.1, y 3.1.1.3, considerándose que todo es medido en un amortiguador de fosfatos a pH 7.0 solamente. Para el stock del sustrato se empleó 4-MUNANA (Goldbio M5205-50MG), 0.000926 g en 25  $\mu$ L (75.73 mM). A partir de ahí se obtuvieron los concentrados diluidos de trabajo, tomando 9.9  $\mu$ L del concentrado principal y llevándolos a 500  $\mu$ L con amortiguador de fosfatos pH 7, para obtener una concentración de 1.5 mM.

#### 3.2.1.1 Solución concentrada de Zanamivir

Se partió de un concentrado de Zanamivir, el cual se preparó con 4 dosis del producto disueltas en 400  $\mu$ L de agua. Considerando que cada dosis corresponde a 5 mg de Zanamivir y la masa molar del mismo es de 332.32 g/mol, la concentración final del stock era de 150 mM.

### 3.2.2 METODOLOGÍA

Se efectuaron ensayos de la medición de la velocidad de hidrólisis de 5 concentraciones de zanamivir a 5 concentraciones de sustrato distintas, y manteniendo constante la concentración de enzima en 0.0033 U/mL El siguiente cuadro representa las concentraciones y volúmenes empleados:

TABLA 3-3 Preparación de los ensayos de inhibición con Zanamivir.

[Sustrato] en celda	Sustrato 1.5 mM ( $\mu$ L)	[Zanamivir] (mM) en celda	Zanamivir 150 mM ( $\mu$ L)	Amortiguador ( $\mu$ L)
1 mM	80	0	0	31.7
		5	4	27.7
		10	8	23.7
		15	12	19.7
		20	16	15.7
0.4 mM	32	0	0	79.7
		5	4	75.7
		10	8	71.7
		15	12	67.7

		20	16	63.7
0.2 mM	16	0	0	95.7
		5	4	91.7
		10	8	87.7
		15	12	83.7
		20	16	79.7
0.1 mM	8	0	0	103.7
		5	4	99.7
		10	8	95.7
		15	12	91.7
		20	16	87.7
0.04 mM	3.2	0	0	108.5
		5	4	104.5
		10	8	100.5
		15	12	96.5
		20	16	92.5

### 3.3 EVALUACIÓN DE EXTRACTOS NATURALES CON POSIBLE ACTIVIDAD INHIBITORIA

---

#### 3.3.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

---

Se empleó la misma preparación que en los casos 3.1.1.1, 3.1.1.2 y 3.1.1.3 (salvo en el caso de las xantonas), considerándose que todo se trabajó en un amortiguador de fosfatos a pH 7.0. Cada evaluación de actividad enzimática se realizó en una celda, comparada con un blanco al mismo tiempo. Dicho blanco contenía el mismo volumen de metanol añadido en el caso de la alícuota del inhibidor, para descartar cualquier interferencia del solvente por sí mismo.

Además cada extracto o infusión tenía un periodo de incubación en el cual se dejaba en reposo en el medio de reacción con la enzima añadida por 15 minutos antes de adicionar el sustrato, con la finalidad de detectar inhibidores competitivos de unión lenta [29].

#### 3.3.2 SOLUCIONES DE TRABAJO DE LOS EXTRACTOS NATURALES

---

A continuación se desglosa el procedimiento para la preparación de los stocks de trabajo empleados para cada extracto natural:

### 3.3.2.1 *Pelargonium sidoides* (Umckaloabo)

Los datos fueron obtenidos de la presentación en tabletas como de un producto comercial del extracto de *Pelargonium sidoides*, Umckaloabo® (Farmasa Schwabe).

Cada tableta contenía 20 mg del extracto y se encontraban recubiertas, por lo cual se procedió a la separación de la cubierta mediante raspados finos superficiales, que desprendían con relativa facilidad la cubierta, para luego triturar la tableta sin cubierta (294.50 mg<sub>(tableta)</sub>), con la cual se preparó un concentrado a 71.012 mg<sub>(tableta)</sub>/mL en metanol (4.822 mg<sub>(extracto)</sub>/mL) del cual se tomó solamente el sobrenadante soluble.

Se repitió el proceso pero ahora disolviendo en agua la tableta sin cubierta a una concentración de 70.36 mg<sub>(tableta)</sub>/mL (4.778 mg<sub>(extracto)</sub>/mL). Los volúmenes empleados, en cada caso, fueron los siguientes:

TABLA 3-4 Preparación de los ensayos de inhibición con el producto Umckaloabo.

<b>[Extracto de <i>P. sidoides</i>]<sub>celda</sub></b>	<b>Enzima 0.4 U/mL</b>	<b>4-MUNANA 1.5 mM</b>	<b>Extracto de <i>P. sidoides</i></b>	<b>Amortiguador</b>
MeOH [0.342 mg/mL]	8.3 µL	16 µL	8.5 µL	87.2 µL
MeOH [0.844 mg/mL]	8.3 µL	16 µL	21 µL	74.7 µL
H <sub>2</sub> O [0.338 mg/mL]	8.3 µL	16 µL	8.5 µL	87.2 µL
H <sub>2</sub> O [0.848 mg/mL]	8.3 µL	16 µL	21.3 µL	74.4 µL

Debido a la inhibición importante en la actividad enzimática que producían las soluciones acuosas de *Pelargonium sidoides*, FIGURA 4-26, se realizaron nuevos ensayos por triplicado con la finalidad de comprobar la inhibición. Esta vez se pesó de nuevo una tableta sin cubierta (356.04 mg<sub>(tableta)</sub>) y se preparó un stock que tenía una concentración de 35.064 mg<sub>(tableta)</sub>/mL (2 mg<sub>(extracto)</sub>/mL).

De este concentrado (2mg/mL) se realizaron 2 pruebas, por triplicado, una a 0.2 mg/mL y otra a 0.4 mg/mL en el volumen final de 120 µL de la celda.

Tabla 3-5 Preparación de ensayos de inhibición, por triplicado, del producto Umckaloabo.

<b>[Extracto de <i>P. sidoides</i>]<sub>celda</sub></b>	<b>Enzima (0.4 U/mL)</b>	<b>4-MUNANA (1.5 mM)</b>	<b>Extracto de <i>P. sidoides</i> (2 mg/mL)</b>	<b>Amortiguador</b>
H <sub>2</sub> O [0.2 mg/mL]	16.6 µL	16 µL	12 µL	75.4 µL
H <sub>2</sub> O [0.4 mg/mL]	16.6 µL	16 µL	24 µL	63.4 µL

### 3.3.2.2 Miel

Se probaron 2 tipos de miel, la A, que fue un producto envasado y comercializado (marca Great Value) y B, que se consiguió a granel en Huejutla, estado de Hidalgo

Ambas muestras fueron analizadas a 5 mg/mL y 25 mg/mL, a partir de un stock preparado a 300.09 mg/mL en agua para A y 219.468 mg/mL de B.

TABLA 3-6 Preparación de los ensayos de inhibición con miel.

	<b>Enzima (0.4 U/mL)</b>	<b>Sustrato (1.5 mM)</b>	<b>Miel</b>	<b>Amortiguador</b>
A [5 mg/mL] SI	8.3 µL	16 µL	2 µL	93.7 µL
A [25 mg/mL] SI	8.3 µL	16 µL	10 µL	85.7 µL
B [12 mg/mL] SI	8.3 µL	16 µL	6.8 µL	88.9 µL
B [25 mg/mL] SI	8.3 µL	16 µL	13.7 µL	82 µL

### 3.3.2.3 Xantonas

Para este estudio se empleó una mezcla de xantonas proporcionadas por el Dr. Ricardo Reyes Chilpa del Instituto de Química de la UNAM, extraídas del duramen (madera que ocupa la parte central de los troncos) de *Calophyllum brasiliensis*[30]. Los componentes de la mezcla se muestran en la FIGURA 3-1.

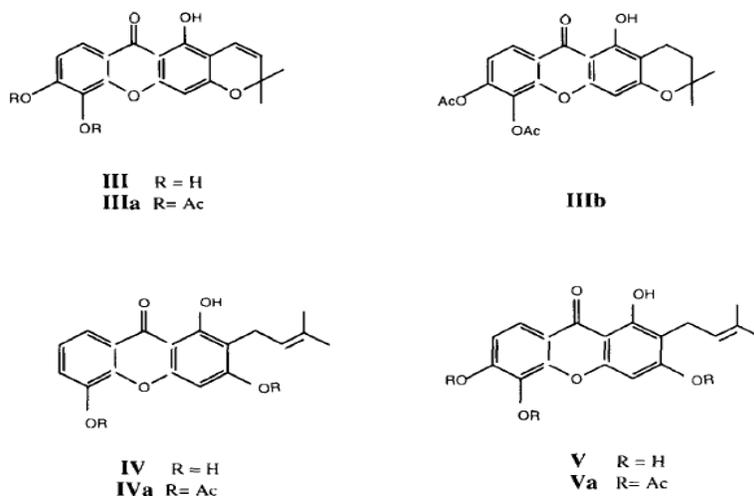


FIGURA 3-1 Mezcla de xantonas provenientes de *Calophyllum brasiliensis*.

Debido a la absorción intensa que provenía de las xantonas, se probaron 2 distintas concentraciones de ellas, siendo lo máximo cuantificable a 0.05 mg/mL, y partiendo de un stock de 1 mg/mL.

Añadido a lo anterior, la absorción elevada se presentaba en un rango que abarcaba la lectura a 370 nm del producto de la hidrólisis del 4-MUNANA, por lo que se decidió emplear como sustrato el p-nitrofenol unido al ácido acetil neuramínico, que tiene un máximo de absorción a 400 nm.

TABLA 3-7 Preparación de los ensayos de inhibición con xantonas.

Enzima 0.4 U/mL	Sustrato p- nitrofenol 1.5 mM	[Xantonas] mg/mL en celda	Xantonas 1 mg/mL	Xantonas 2 mg/mL	Amortiguador
18 µL	10 µL	0.025	6 µL	-	86
18 µL	10 µL	0.05	12 µL	-	74

### 3.3.2.4 Propóleo

Se tenían 3 muestras de extractos etanólicos de propóleo, identificadas como las muestras A, B y C, proporcionadas por el Dr. José Fausto Rivero Cruz de la Facultad de Química, UNAM. La muestra A procedente de la colecta en

Acuexcomatl, y la B y C de Trojes, primera y segunda colecta del año, respectivamente[31].

El propóleo A fue añadido a la reacción para obtener concentraciones de 1.5 y 1.0 mg/mL, dado que la concentración de 1.5 mg/mL arrojaba absorbancias muy elevadas la cuantificación no fue posible.

En el caso del propóleo B se realizó el mismo procedimiento, mostrando el problema de absorbancia incluso a 1.0 mg/mL, por lo que se trabajó con una concentración inferior, 0.5 mg/mL.

Para el propóleo tipo C se probaron concentraciones a 0.75 y a 1.5 mg/mL con p-nitrofenol como sustrato, los resultados fueron tan variables que se repitieron con un nuevo extracto acuoso a partir del etanólico a las mismas concentraciones

TABLA 3-8 Preparación de los ensayos de inhibición con propóleo.

<b>[Propóleo] en celda</b>	<b>Enzima 0.4 U/mL</b>	<b>Sustrato 1.5 mM</b>	<b>Propóleo 10 mg/mL</b>	<b>Amortiguador</b>
A [1 mg/mL] SI	8.3 µL	16 µL	12 µL	83.7 µL
B[0.5 mg/mL] SI	16.6 µL	8 µL	6 µL	89.4 µL
C[0.75 mg/mL]	8.3 µL	16 µL	9 µL	86.7 µL
C [1.5 mg/mL]	8.3 µL	16 µL	18 µL	77.7 µL
C <sub>(aq)</sub> [0.75 mg/mL]	16.6 µL	16 µL	9 µL	78.4 µL
C <sub>(aq)</sub> [1.5 mg/mL]	16.6 µL	16 µL	18 µL	69.4 µL

### 3.3.2.5 Tés

Para el estudio del efecto de los componentes de los tés, se empleó una porción individual del producto comercial, de la cual se tomaron, 0.90540 g (limón, LAGG's), 1.16141 g (jamaica, LA PASTORA) y 0.96932 g (hierbabuena, LAGG's), mismos a los que se les vertieron 15 mL de agua destilada en ebullición y se mantuvieron en contacto por 5 minutos, luego de los cuales las infusiones se homogenizaron. Los stocks se consideraron, en base a la masa empleada para realizar las soluciones, como 60.36, 77.43 y 64.62 mg/mL para el limón, la jamaica y la hierbabuena, respectivamente. Los tres stocks se emplearon para realizar soluciones a 50 mg/mL, y de esta concentración otras a 25 y 12.5 mg/mL.

A partir de dicha concentración se evaluaron concentraciones 10, 20 y 40 veces diluidas, de acuerdo a la siguiente tabla:

TABLA 3-9 Preparación de los ensayos de inhibición con té de limón.

[Té de limón] en celda (mg/mL)	Enzima 0.4 U/mL (μL)	4-MUNANA 1.5 mM (μL)	Té [50 mg/mL] (μL)	Té [25 mg/mL] (μL)	Té [12.5 mg/mL] (μL)	Amortiguador (μL)
5.87	16.6 μL	16 μL	12 μL	-	-	75.4 μL
2.93	16.6 μL	16 μL	-	12 μL	-	75.4 μL
1.47	16.6 μL	16 μL	-	-	12 μL	75.4 μL

### 3.4 SÍNTESIS DEL GLUCÓSIDO FLUOROGÉNICO

#### 3.4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A lo largo del proceso se emplearon MeOH y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en crudo para la elución de las cromatoplasmas. Se utilizó MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, benceno y tolueno destilados cuando se requería para una reacción y MeOH y cloruro de acetilo secos cuando la metodología así lo requería. Aquí se mencionan los pasos seguidos en el caso de éstos últimos.

##### 3.4.1.1 Secado de disolventes

Se tomaba un exceso de la cantidad necesaria de disolventes emplearse (MeOH o cloruro de acetilo) y se colocaba en un matraz bola de tamaño apropiado, posteriormente se agregaba sodio al matraz y se mantenía en agitación hasta consumirse el sodio por completo.

Después de esto, se mantenía a una temperatura elevada, en agitación, para ser destilado y recolectado el disolvente seco. Todo material se lavaba y secaba en horno previamente al contacto con el disolvente.

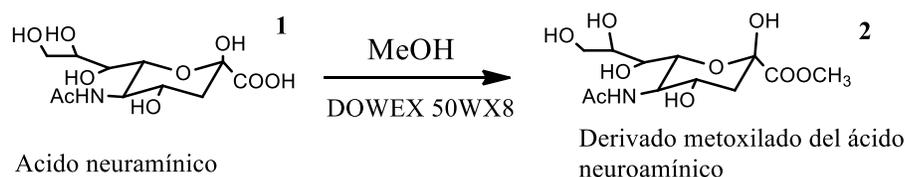
### 3.4.2 METODOLOGÍA

Esta parte experimental fue realizada en el laboratorio del Dr. José Norberto Farfán García, bajo la asesoría de la M. en C. Margarita Romero Ávila, en la Facultad de Química de la UNAM.

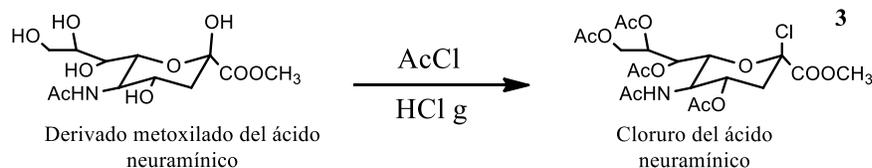
El trabajo se repartió en 4 procesos, los cuales consistían en la protección de los grupos hidroxilos del ácido neuramínico, cloración del mismo, reacción con la sal de fluoresceína y desprotección de la nueva molécula.

A continuación se habla de dichos pasos:

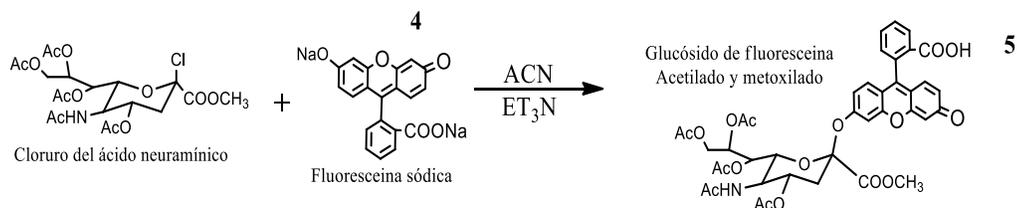
#### 1. Protección del ácido neuramínico



#### 2. Cloración/acetilación del ácido neuramínico



#### 3. Unión a la fluoresceína sódica



#### 4. Desprotección de la molécula

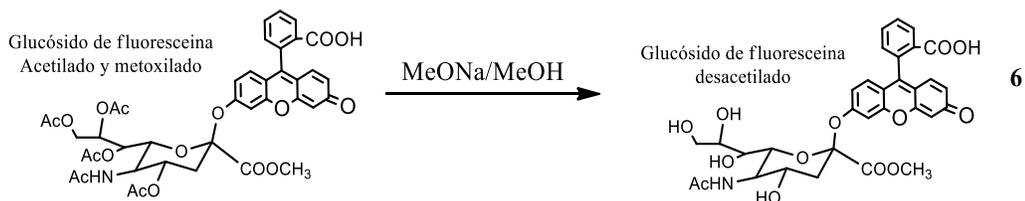


FIGURA 3-2 Procesos en la síntesis del glucósido fluorescente

#### 3.4.2.1 Protección del ácido neuramínico [32]

---

Se tomaron 0.4998 g de ácido neuramínico **(1)** (Rose Scientific Ltd.) (1.6160 mmol) (309.27 g/mol m.m) y se disolvieron en 98 mL de MeOH seco, luego de lo cual se agregaron 1.2496 g de la resina DOWEX 50WX8-400 (Aldrich 21,751-4, 500g). La mezcla se mantuvo en agitación por tres días a temperatura ambiente, en atmósfera inerte de nitrógeno, tiempo en el cual se observó, mediante cromatografía en capa fina (CCF) , que la materia prima se había consumido.

El producto **(2)** (323.27 g/mol m.m.) fue filtrado al vacío con lavados de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 70:30 y después evaporado, siendo una reacción cuantitativa del 100% de materia prima metoxilada (1.62 mmol). El producto era ceroso y amarillento. Bajo CCF se presentaba solamente un producto con un  $R_f$  de 0.8, en un sistema de elución de mezcla acuosa: 60%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 40% MeOH, 0.5 % agua.

#### 3.4.2.2 Cloración/acetilación [33]

---

Se tomaron 0.2842 g del producto metilado **(2)**(0.88 mmol) y se le añadieron 17 mL de cloruro de acetilo en un matraz bola de tres bocas, donde una se tapa, otra está conectado a un refrigerante y la última un burbujeador donde se agrega  $\text{HCl}_{(g)}$  hasta saturación, y en baño de hielo. Se mantiene la reacción en agitación por 22 horas y se evapora, lavando después con porciones de tolueno y benceno 3 veces, obteniéndose un sólido blanco, ligeramente amarillento, **(3)** (0.3586 g, 509.89 g/mol, 0.7 mmol. 79.5%). Bajo CCF se aprecian 3 productos, todos de menor polaridad, además de la materia prima, en un sistema de elución  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH 9:1.

#### 3.4.2.3 Unión a la fluoresceína sódica [34]

---

Se colocan 53 mL de acetonitrilo a 0.3160 g del producto anterior **(3)** (0.62 mmol) hasta disolverse, luego 1.8 mL de trietanolamina y 0.2697 g de fluoresceína sódica **(4)** (0.72 mmol, 376.27 g/mol). Se mantuvo a reflujo la reacción a lo largo de 4 días. La cromatografía en placa fina en un sistema de elución  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 95:5 mostró la presencia de al menos 4 productos, por lo que se procedió a realizar una cromatografía en columna del producto (de color rojizo), el cual se eluyó con 200

mL de hexano, 200 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, varias veces CH<sub>2</sub>-MeOH 99:1 y CH<sub>2</sub>-MeOH 98:2. Las fracciones recolectadas y su cuantificación se muestran en la siguiente tabla:

Fracción	Masa
A	-----
B	0.1902 g
C	0.0113 g
D	0.1106 g
E	0.0585 g

Tras realizar resonancia de protón a las muestras se determinó que los posibles candidatos eran las fracciones C y D, que además eran el mismo producto **(5)** (0.1210 g, 0.15 mmol, 805.73 g/mol).

Ambas fracciones se reunieron y se lavaron con agitación en hexano durante una noche, luego de lo cual, solamente hubo una pérdida de 0.9 mg del producto.

#### 3.4.2.4 Desprotección de la molécula [34]

En primera instancia se trató a la molécula para eliminar los grupos acetilos de su molécula. El procedimiento consistió en 0.0493 g del producto anterior **(5)** (0.06 mmol) en 2 mL de MeOH, con 4 mg de MeONa, en atmósfera inerte de nitrógeno y con todo el material totalmente seco.

Tras 1 y 2.5 hrs, se realizó CCF, de la cual se observó la presencia de 2 productos minoritarios menos polares que la molécula original, y 1 mucho más polar, así como materia prima, por lo que se mantuvo la reacción por una noche. Después de este tiempo la muestra se filtró y se obtuvieron 0.0439 g de compuesto en el que se determinó, por RMN, que aún contenía grupos acetilos, por lo que la reacción se repitió con 2 mL de MeOH y 8 mg de MeONa, por una noche.

La materia prima dejó de estar presente, por lo que la reacción se detuvo y se neutralizó el medio con DOWEX 50WX8 en frío y se filtró, obteniendo 0.0416 g de mezcla de productos, la cual se concentró, para disolverla en 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 1:1 y se purificó por CCF, de donde se despreciaron los 2 productos minoritarios y se extrajeron otros 2 que eran polares. Por resonancia se concluyó

que la fracción más polar era aquella que contaba con el espectro de la fluoresceína y una parte parecida al ácido neuramínico, pero contaminada, por lo que se repitió la purificación en CCF de ésta fracción, ésta vez con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :mezcla acuosa 80:20 donde tres bandas aparecieron, una de fluoresceína, una muy polar y otra de polaridad intermedia pero poco abundante. Se analizaron las 3 por resonancia de protones y carbono, siendo el mejor candidato la muestra en mayor cantidad y polaridad **(6)** (0.0253 g, 0.04 mmol, 637.59 g/mol), pero no coincidía con el espectro del producto esperado.

Este producto fue empleado como sustrato de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, en una concentración de 200  $\mu\text{M}$  a pH 7 en el medio de reacción. Tras 60 minutos, el espectro de absorción sólo presentó una pequeña variación y sin la presencia de un punto isobéptico, por lo que esta variación es debida a un fenómeno físico, como la evaporación del medio y no a una reacción enzimática, FIGURA 3-3.

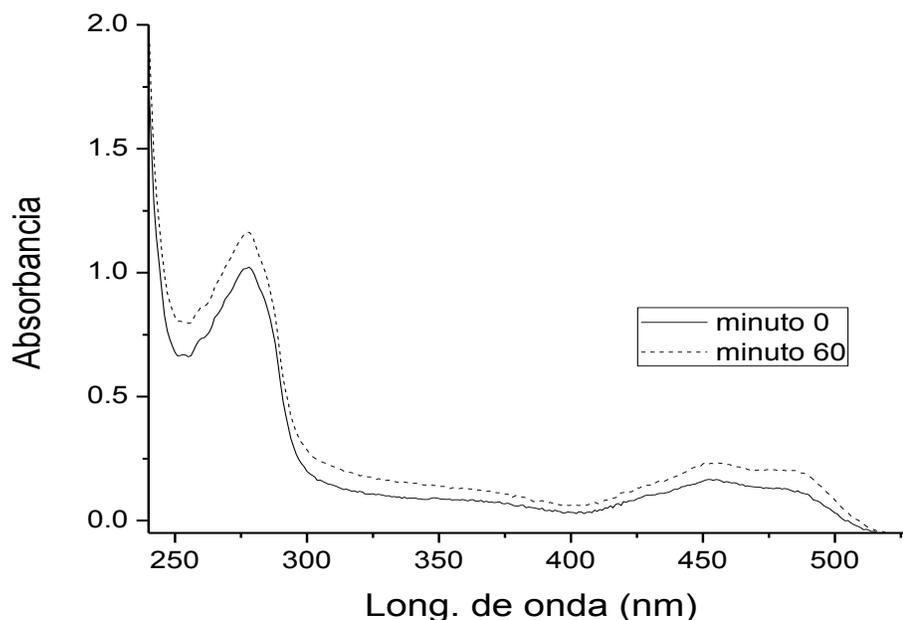


FIGURA 3-3 Espectro de absorción (Uv-Vis) del sustrato fluorogénico metoxilado, como sustrato de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Con el fin de establecer un ensayo espectrofotométrico para medir la actividad de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, se realizaron pruebas de la actividad de esta enzima catalizando la hidrólisis del 4-MUNANA.

Para establecer la longitud de onda a la cual se mediría esta actividad, se realizaron espectros de absorción en un rango de 230 nm a 430 nm de la reacción enzimática, (FIGURA 4-1 y FIGURA 4-2),

Un ejemplo de este experimento, es el espectro que se muestra en la FIGURA 4-3, en él se aprecia la variación de la absorbancia en un rango de longitudes de onda comprendido entre 240 y 420 nm, por 65 minutos. Existe un aumento en la absorbancia en función del tiempo a longitudes de onda mayores a 320 nm , y una disminución de la misma a longitudes de onda menores, presentándose entonces un punto isosbético a 320 nm (FIGURA 4-2).

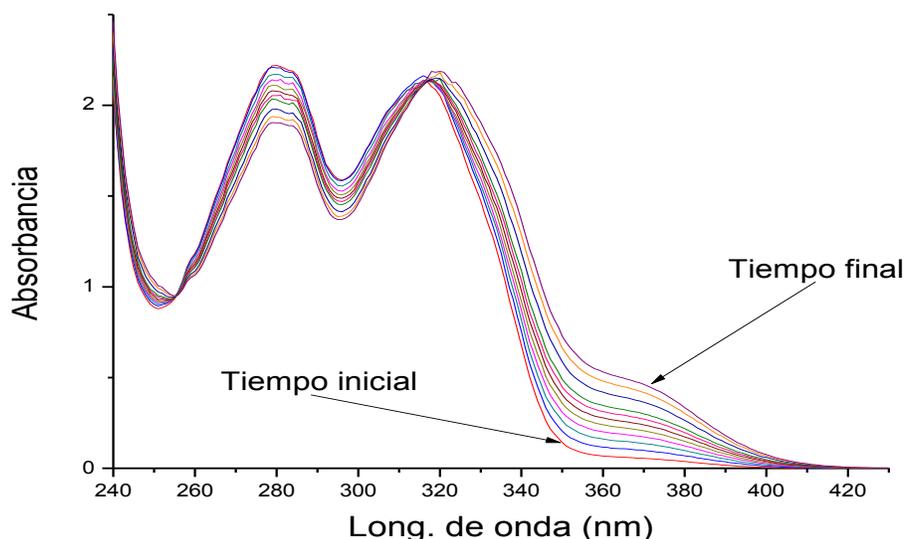


FIGURA 4-1 Progreso de la reacción de hidrólisis de 200  $\mu$ M de 4-MUNANA en amortiguador de fosfatos 50 mM de fosfatos pH 7, 150 mM KCl y 0.2 % de BSA, llevada a cabo por 65 minutos.

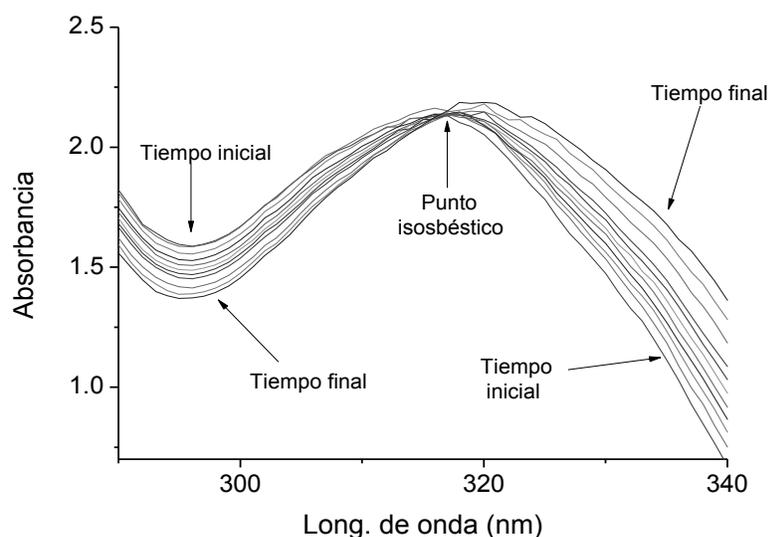


FIGURA 4-2 Punto isobéptico a 320 nm registrado durante el progreso de la reacción de hidrólisis de 200  $\mu\text{M}$  de 4-MUNANA en amortiguador de fosfatos 50 mM de fosfatos pH 7, 150 mM KCl y 0.2 % de BSA.

Para verificar que los resultados obtenidos en el experimento de la FIGURA 4-1, se compararon los espectros de absorción UV-Vis tanto del sustrato como el del producto, ambos a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  (FIGURA 4-3).

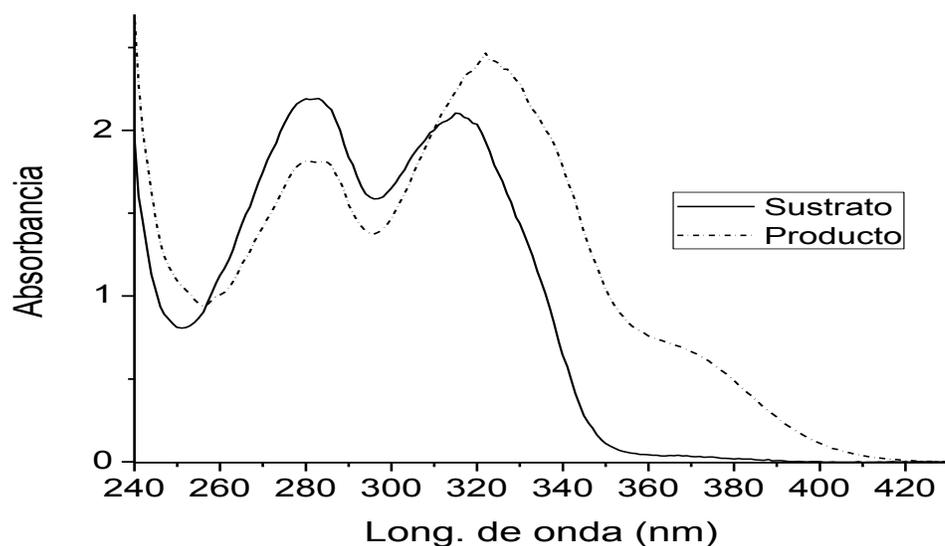


FIGURA 4-3 Espectro de absorción del ácido 2-(4-metilumbilferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico 200  $\mu\text{M}$  a pH 7 en amortiguador de fosfatos y del producto de su hidrólisis: la 4-metilumbeliferona.

A partir de la FIGURA 4-1 y la FIGURA 4-3, se aprecia que a 200  $\mu\text{M}$  de 4-MUNANA, la absorbancia del producto es considerablemente mayor a 1 en longitudes de onda inferiores a 350 nm, por lo que se determinó trabajar a  $\lambda > 360$  nm, con el fin de no rebasar los límites de cuantificación del equipo. Por otro lado, la diferencia de absorbancias a partir de 380 nm en adelante es poco perceptible, por lo que el rango de lectura se redujo dentro de 360 nm-380 nm.

Al comparar el espectro del sustrato con el del producto (sustrato 100% hidrolizado) se obtiene la FIGURA 4-3. La diferencia de absorbancias ( $\Delta A$ ) entre el sustrato y el producto en función de cada longitud de onda en el rango estudiado se muestra en la FIGURA 4-4. En ella se puede apreciar que en el intervalo de 360 nm hasta 380 nm (intervalo de lectura antes propuesto), el delta de absorbancia disminuye, por lo que se decidió tomar el punto intermedio a 370 nm para cuantificar la cinética enzimática.

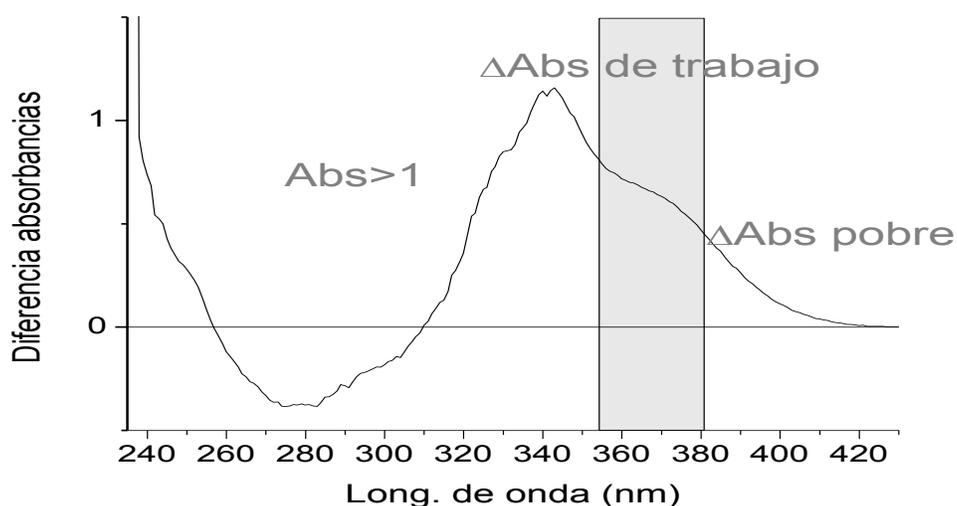


FIGURA 4-4 Diferencia de absorbancias entre el producto (4-MU) formado al finalizar la reacción y el sustrato (4-MUNANA) al inicio de la misma (200  $\mu\text{M}$ , pH 7).

Por su parte, la comparación de los espectros de absorción del transcurso de la reacción enzimática de la formación de la 4-MU, en los primeros 20 minutos se muestra en la FIGURA 4-5A, en la cual se aprecia que a una longitud de onda de 370 nm, la cuantificación es posible.

Así, la FIGURA 4-5B es el gráfico de formación de 4-MU ( $\mu\text{M}$ ) por la enzima neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7,  $25^\circ\text{C}$  y a 370 nm a través del tiempo (s) a partir de la hidrólisis de 200 mM de 4-MUNANA.

Así, estas condiciones de pH, temperatura y longitud de onda, en ensayos a 60 minutos, se reproducen a lo largo de esta tesis, con tan sólo modificaciones en la concentración tanto de la enzima como del sustrato, con el fin de adaptarse a cada extracto analizado.

Los resultados reportados son generados a partir de gráficas del tipo de la FIGURA 4-5B, de las que se estudia la velocidad inicial de la reacción enzimática, FIGURA 4-6, con el fin de ser considerada la pendiente como la velocidad inicial de la reacción ( $\mu\text{M s}^{-1}$ ).

Los datos procesados para las figuras 4-5 y 4-6 son los obtenidos para los ensayos enzimáticos a pH 7 que se ajustaron tanto a un modelo lineal como a uno no lineal, cuyas gráficas se encuentran representadas en la FIGURA 4-10 y FIGURA 4-11.

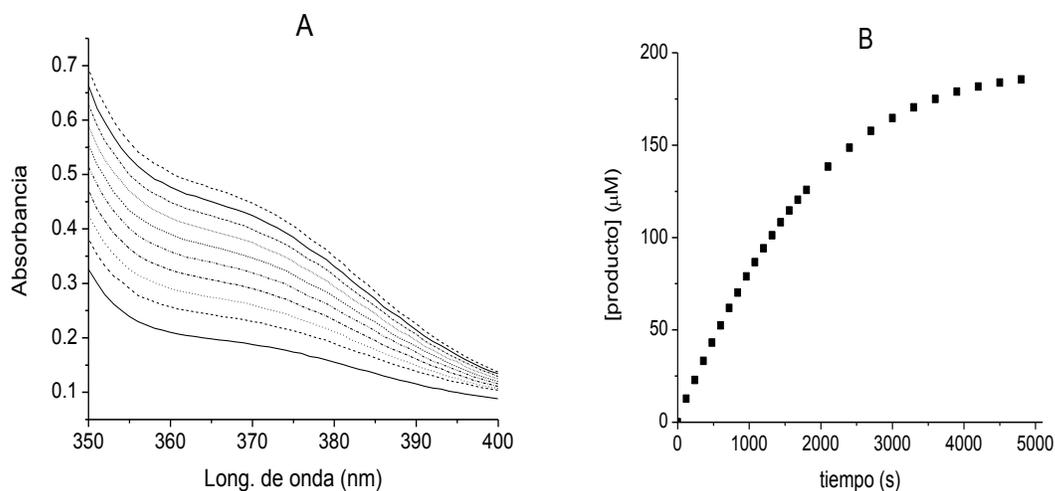


FIGURA 4-5. A, Espectro de absorción de la hidrólisis de 4-MUNANA a pH 7 en amortiguador de fosfatos por 80 minutos. B, formación de la 4-metilumbeliferona ( $\mu\text{M}$ ) a pH 7 en amortiguador de fosfatos, a 370 nm, 80 minutos.

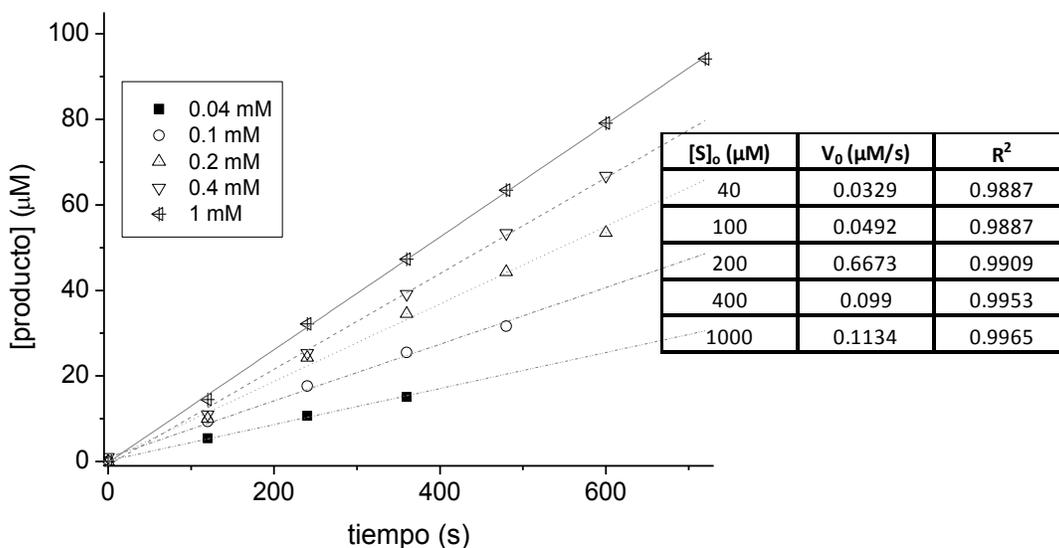


FIGURA 4-6 Cambio en la concentración de 4-MU formada por la neuraminidasa a diferentes concentraciones de sustrato y a distintos tiempos, en amortiguador de fosfatos 50 mM de fosfatos pH 7, 150 mM KCl y 0.2 % de BSA.

#### 4.1 EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD DE LA NEURAMINIDASA

La FIGURA 4-7 muestra las gráficas resultantes de la determinación de las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$  a pH's del medio de reacción de 6, 7, 8 y 9 para 200  $\mu$ M de 4-MUNANA, medidas a una longitud de onda de 370 nm, a 25 °C, empleando un ajuste no lineal a los datos de  $V_0$  en función del tiempo, los cuales mostraban una  $R^2$  mayor a 0.96 en todas las rectas, a diferencia del modelo lineal de Lineweaver-Burk que pH 7 mostraba un valor de  $R^2$  inferior (FIGURA 4-11).

En la FIGURA 4-7A, es posible observar que existe un aumento en la velocidad máxima con respecto a la disminución del pH, y que tal efecto no posee un comportamiento lineal, ya que al aproximarse a un pH alcalino, los valores de  $V_{max}$  disminuyen.

La  $K_m$  presenta un comportamiento similar en la FIGURA 4-7B, mostrando una disminución en su valor al elevar el pH.

Además, expresando la disminución de las constantes cinéticas en porcentajes, como se muestra en la FIGURA 4-7C, se hace notar que conforme el pH del medio disminuye, es la  $V_{max}$  la que se encuentra mucho más afectada en comparación de la  $K_m$ .

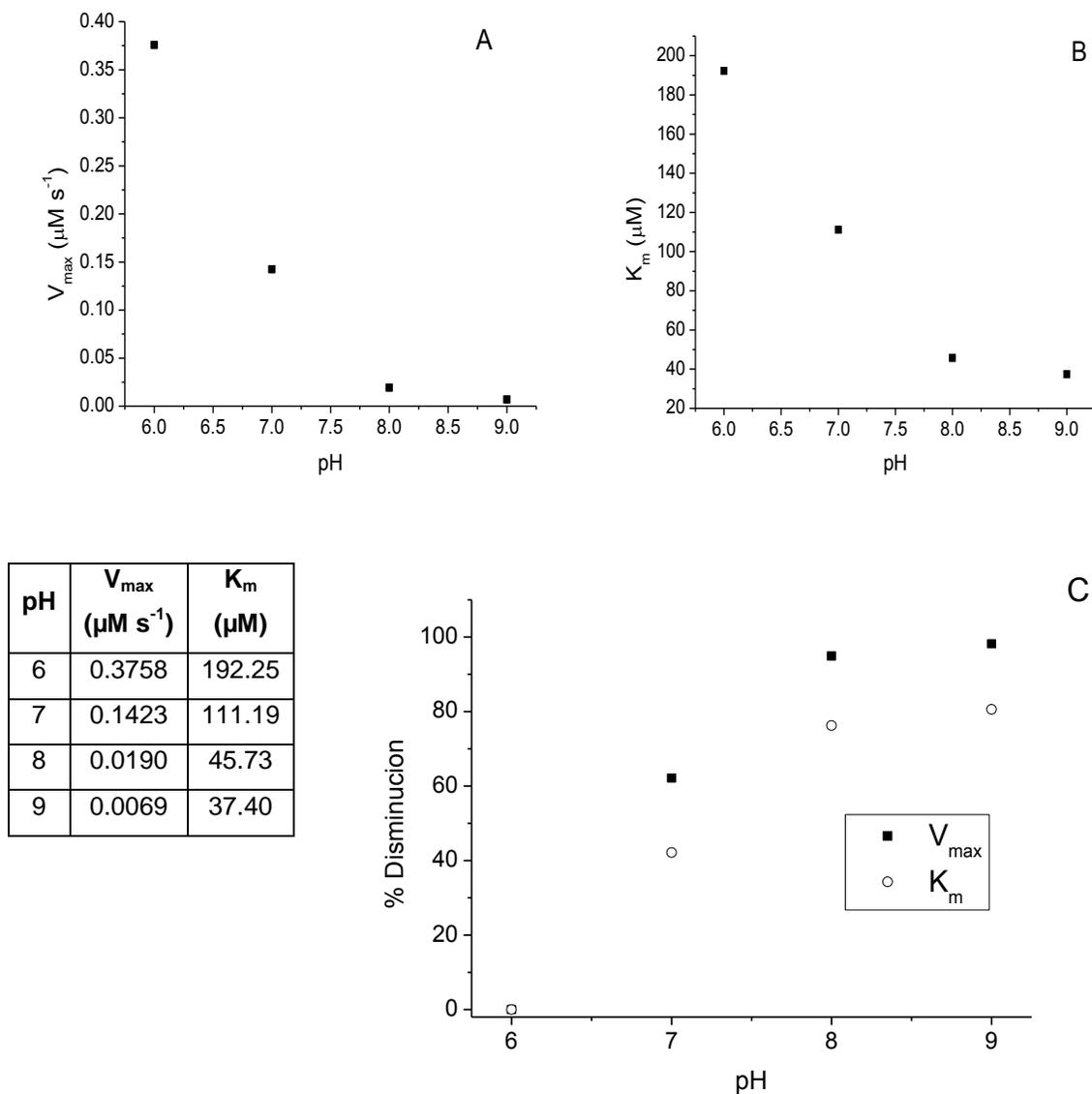


FIGURA 4-7 Influencia del pH en: A. la  $V_{max}$ ; B. la  $K_m$  y; C. comparación en la disminución de los valores de las constantes cinéticas expresadas como porcentajes.

Con la información de las constantes cinéticas en la FIGURA 4-7 se observa la desventaja de realizar ensayos a pH 6, ya que a este pH la  $K_m$  tiene un valor grande, reflejando una afinidad muy disminuida por su sustrato. Asimismo, una elevación del pH de 8 a 9 conlleva la reducción de la  $K_m$  en sólo un 20%.

Para los ensayos de inhibición se buscaba un medio de reacción que permitiera la cuantificación óptima de los productos de la hidrólisis del sustrato que, además, no se distanciara del pH fisiológico (7.4), ya que se contaba con los datos anteriores se optó por realizar los ensayos en un amortiguador de fosfatos a pH 7.

Para la determinación de las velocidades iniciales ( $\mu\text{M s}^{-1}$ ) que dieron como resultado la FIGURA 4-7, se cuantificó la formación de 4-MU en micromoles por segundo, interpolados en una curva patrón de 4-MU (Anexo I) a partir de los datos de las absorbancias medidas a una longitud de onda de 370 nm y a 25 °C desde el minuto 0 y hasta la formación del 30% del producto.

A partir de esto, se obtuvieron los datos de velocidad inicial ( $V_0$ ) en función de concentración de sustrato para cada pH y, posteriormente, se empleó el modelo de dobles inversos comparado con los datos de regresión no lineal en el software Origin 8.

### 4.1.1 CINÉTICA A pH 6

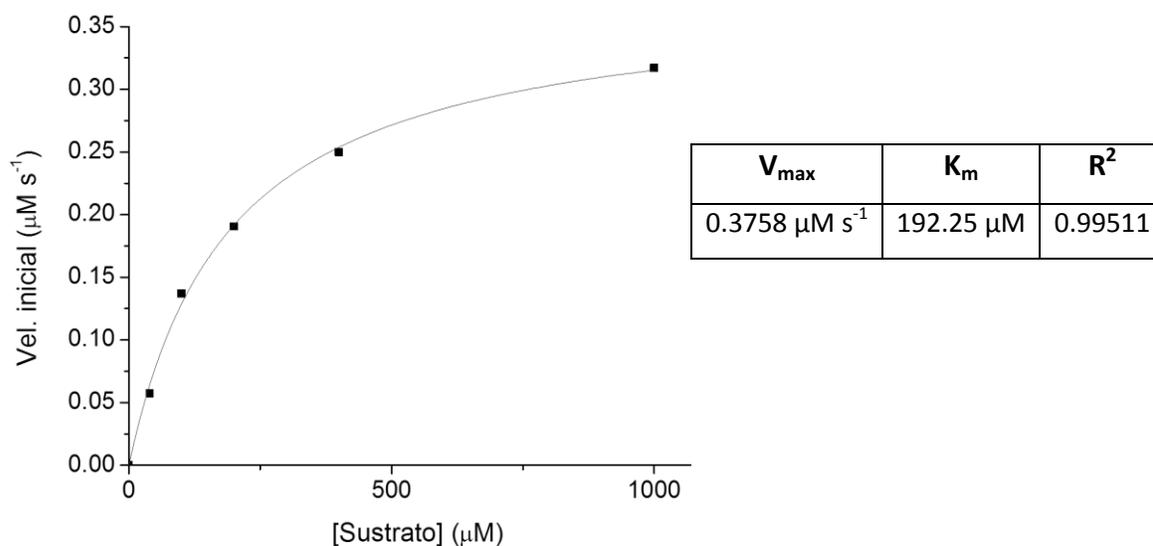


FIGURA 4-8 Gráfica de Michaelis-Menten para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000  $\mu\text{M}$  en pH 6. Ajuste no lineal

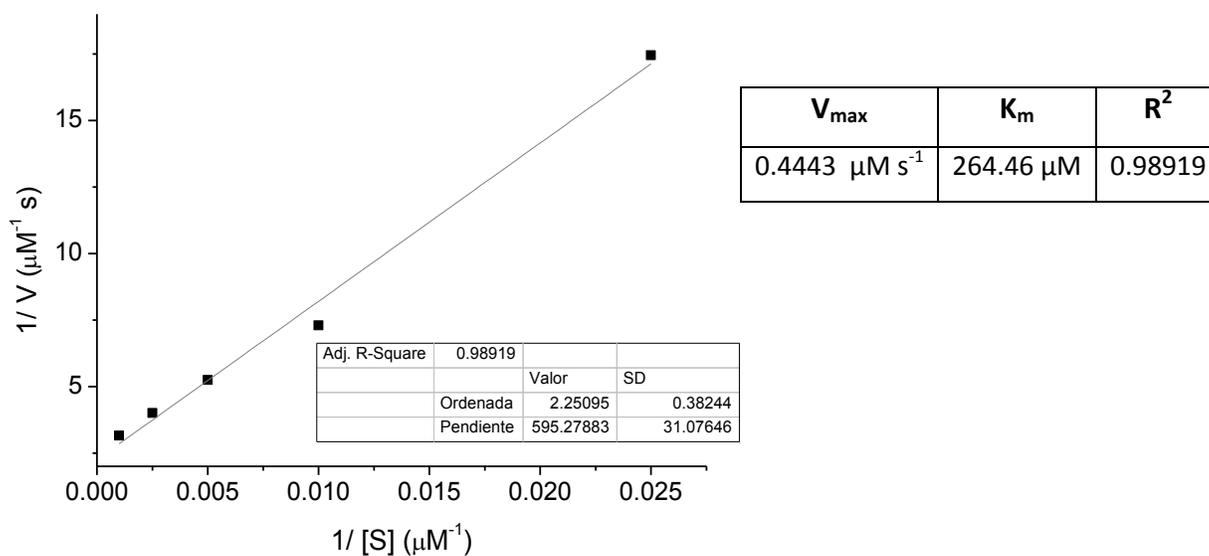


FIGURA 4-9 Gráfica de dobles inversos para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000  $\mu\text{M}$  en pH 6. Ajuste lineal empleando Origin 8.

### 4.1.2 CINÉTICA A PH 7

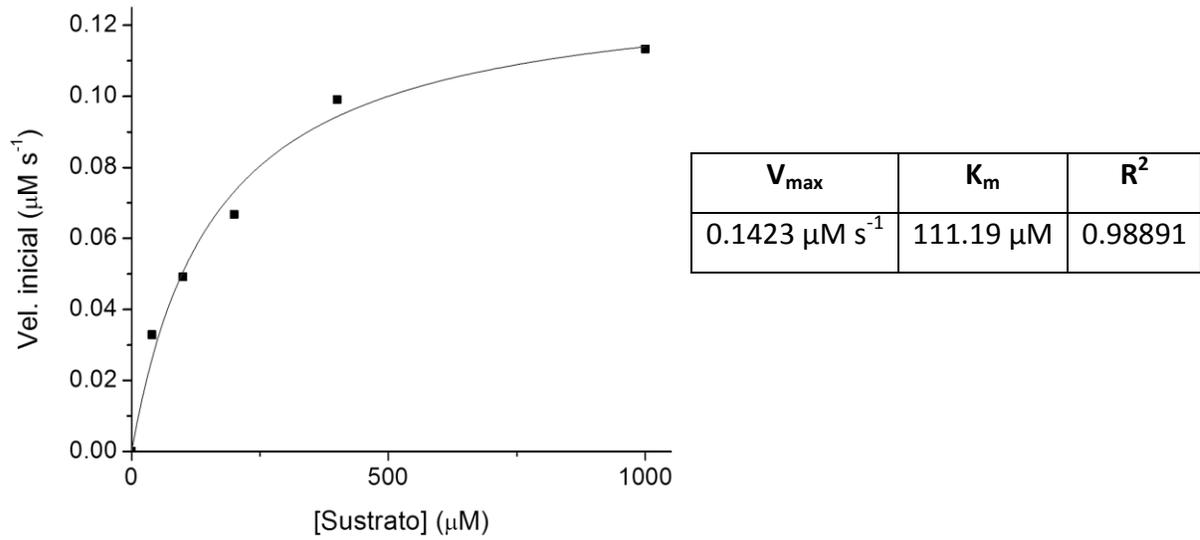


FIGURA 4-10 Gráfica de Michaelis-Menten para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000  $\mu\text{M}$  en pH 7. Ajuste no lineal empleando Origin 8.

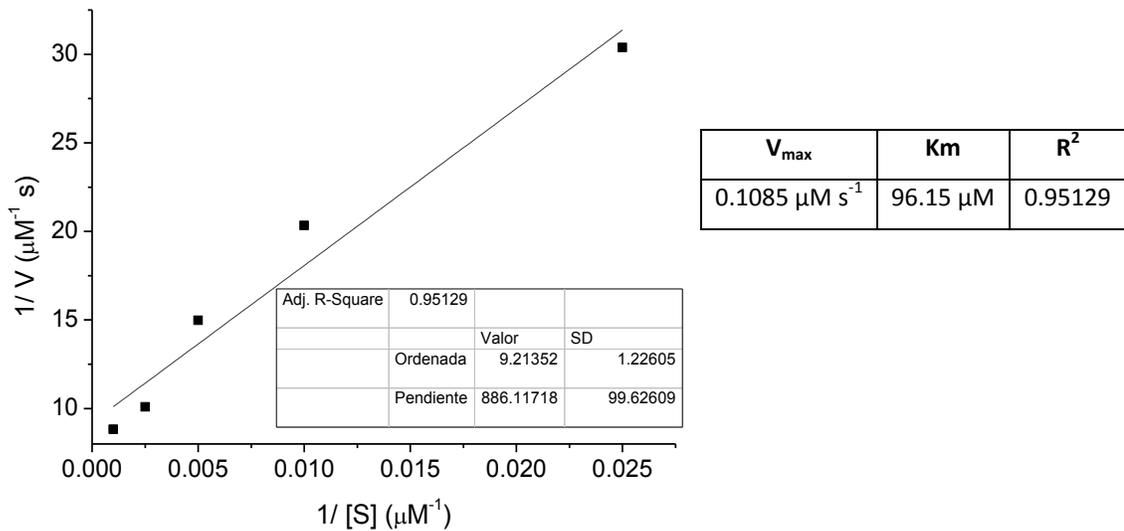


FIGURA 4-11 Gráfica de dobles inversos para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000  $\mu\text{M}$  en pH 7. Ajuste lineal empleando Origin 8.

### 4.1.3 CINÉTICA A PH 8

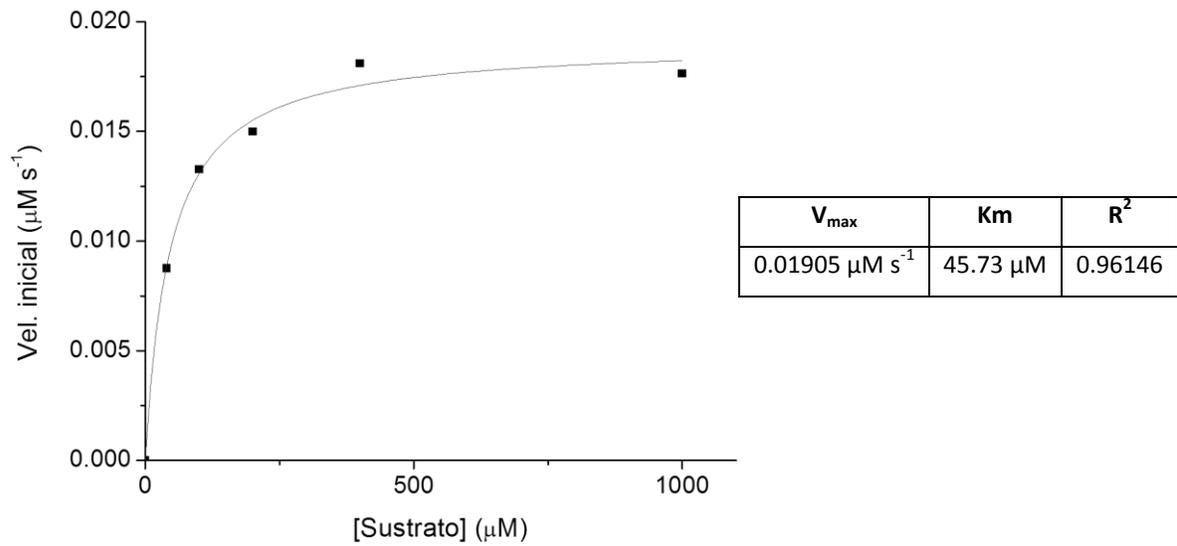


FIGURA 4-12 Gráfica de Michaelis-Menten para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000  $\mu\text{M}$  en pH 8. Ajuste no lineal

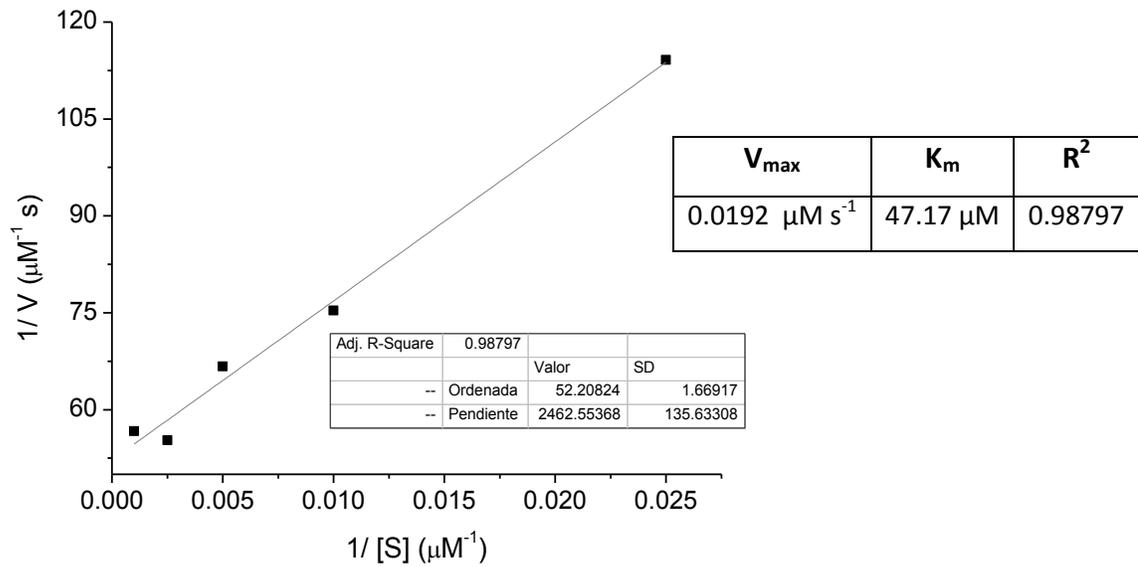


FIGURA 4-13 Gráfica de dobles inversos para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000  $\mu\text{M}$  a pH 8. Ajuste lineal empleando Origin 8.

#### 4.1.4 CINÉTICA A PH 9

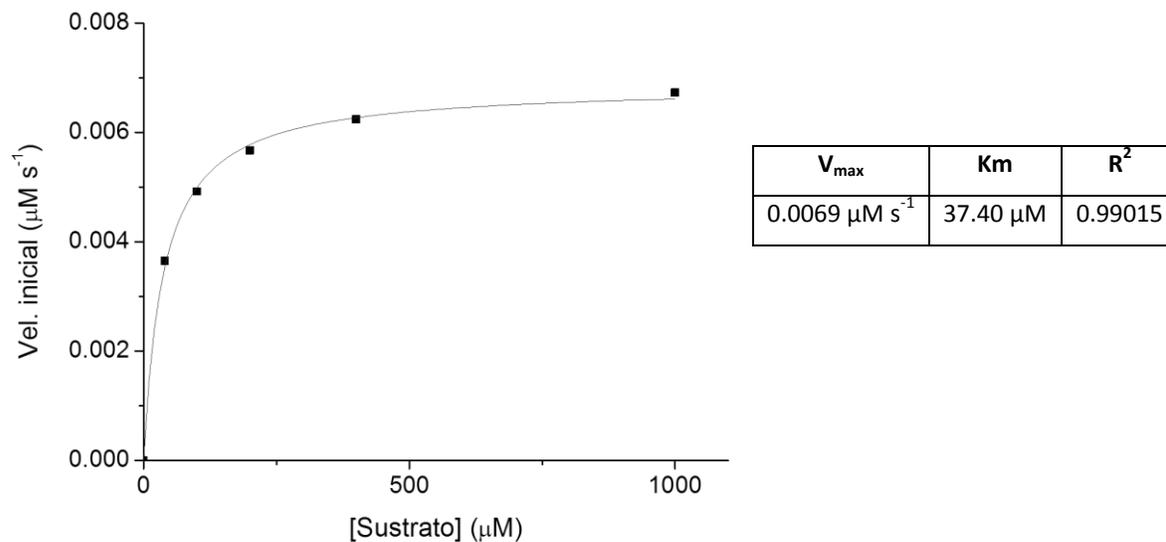


FIGURA 4-14 Gráfica de Michaelis-Menten para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000  $\mu\text{M}$  en pH 9. Ajuste no lineal

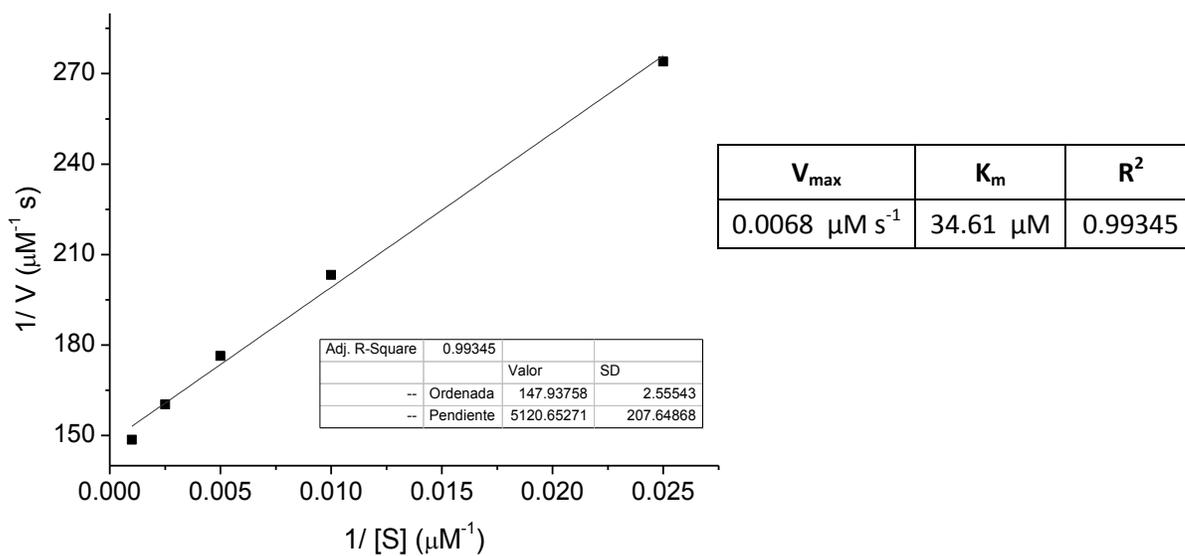


FIGURA 4-15 Gráfica de dobles inversos para 4-MUNANA 40, 100, 200, 400 y 1000  $\mu\text{M}$  a pH 9. Ajuste lineal empleando Origen 8.

## **4.2 CARACTERIZACIÓN DE UN CONTROL POSITIVO DE INHIBICIÓN (ZANAMIVIR)**

---

Para determinar el efecto de la adición de un inhibidor conocido de la neuraminidasa se empleó el fármaco zanamivir, cuyo poder inhibitorio puede servir como un control positivo con el cual comparar la posible inhibición por extractos naturales bajo la metodología espectrofotométrica utilizada hasta ahora, ver Tabla 3-3 de la metodología.

### **4.2.1 EFECTO DEL ZANAMIVIR SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL**

---

A partir de las determinaciones de la actividad de la enzima, se calcularon los parámetros cinéticos de velocidades máximas y constantes de Michaelis, para cada concentración de sustrato a cada concentración de inhibidor. Estos valores fueron empleados para calcular el modelo más adecuado para inferir el tipo de comportamiento que tiene el inhibidor, ya sea competitivo o no competitivo.

En la FIGURA 4-16 se observa la actividad enzimática de la neuraminidasa a todas las concentraciones de sustrato probadas a diferentes concentraciones de inhibidor, en ella se muestra que a mayor concentración de zanamivir le sigue una mayor inhibición de la enzima.

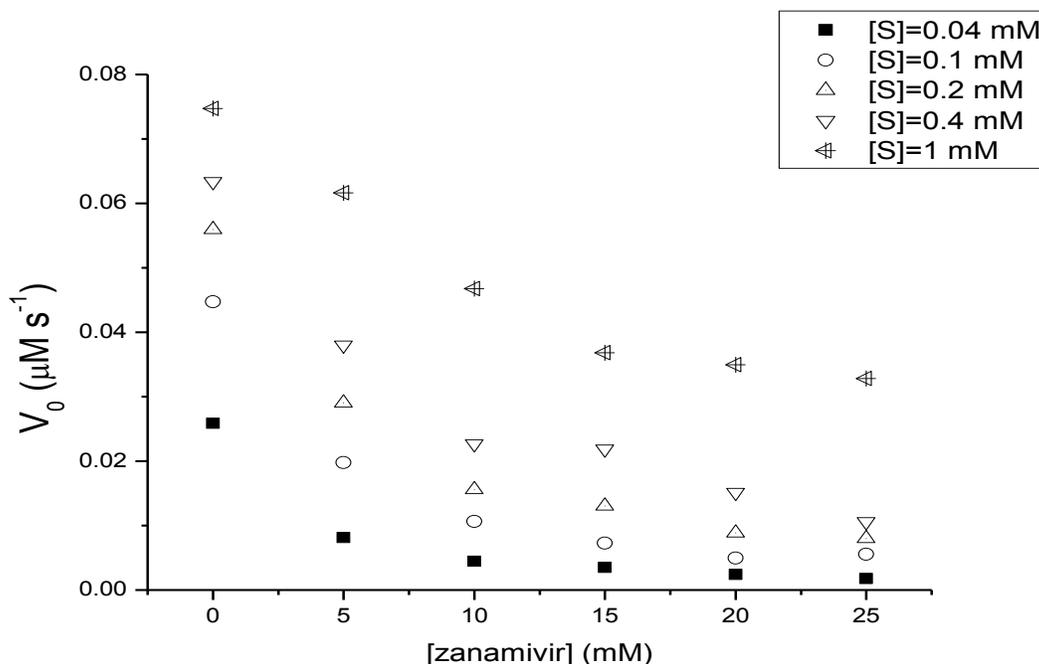


FIGURA 4-16 Efecto del zanamivir en la  $V_0$  a diferentes concentraciones de sustrato sobre la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens* a pH 7 en amortiguador de fosfatos 50 mM, KCl 150 mM y 0.2 % de BSA.

#### 4.2.2 DETERMINACIÓN DEL TIPO DE INHIBIDOR

Las velocidades iniciales fueron obtenidas en función de la concentración de sustrato, para cada concentración de zanamivir empleado. Para determinar el tipo de inhibición del fármaco se utilizó una regresión lineal ajustada al modelo de Lineweaver-Burk y una no lineal.

En el caso de la lineal, se graficaron los inversos de las velocidades iniciales en función de los inversos de las concentraciones del sustrato. De la regresión lineal es posible notar las diferencias en cuanto a las  $V_{max}$  y  $K_m$ .

La FIGURA 4-17 muestra el ajuste al modelo de Lineweaver-Burk. En ella los valores de  $K_m$  muestran un aumento para cada elevación de la concentración de zanamivir, mientras las  $V_{max}$  disminuyen por cada aumento en la concentración del inhibidor.

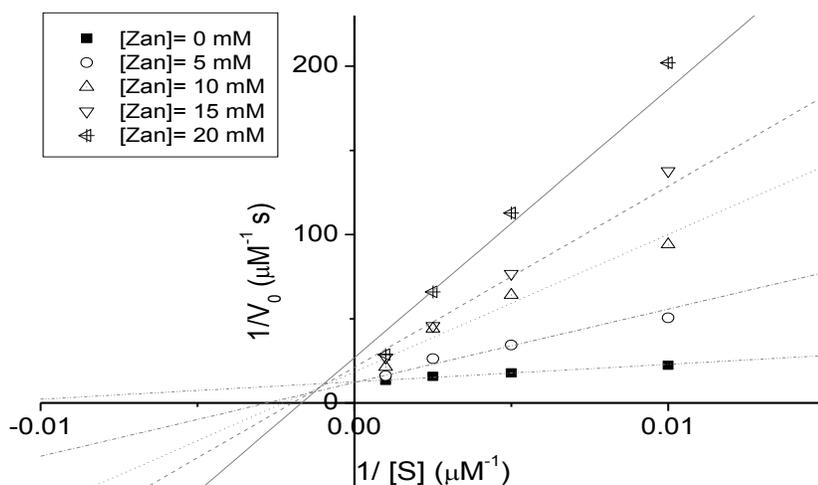


FIGURA 4-17 Ajuste al modelo de Lineweaver-Burk del efecto del zanamivir a diferentes concentraciones de sustrato sobre la neuraminidasa a pH 7 en amortiguador de fosfatos 50 mM, KCl 150 mM y 0.2 % de BSA.

En este caso, se podría considerar una inhibición del tipo mixto, en la que se tiene tanto inhibición competitiva en el sitio activo de la enzima libre, lo que provoca que se requiera mayor concentración de sustrato para poder favorecer la interacción de éste con la enzima libre; como inhibición al unirse al complejo E-S, que ocasiona que la velocidad máxima de la reacción no llegue a ser de la misma magnitud que la original sin zanamivir (FIGURA 2-13).

Con el fin de cuantificar los equilibrios presentes por la adición del zanamivir, es posible determinar los valores tanto de  $K_i$  como de  $K'_i$  regrificando los valores de las pendientes y las ordenadas al origen de cada recta en la FIGURA 4-7 en función de la concentración de zanamivir [27]:

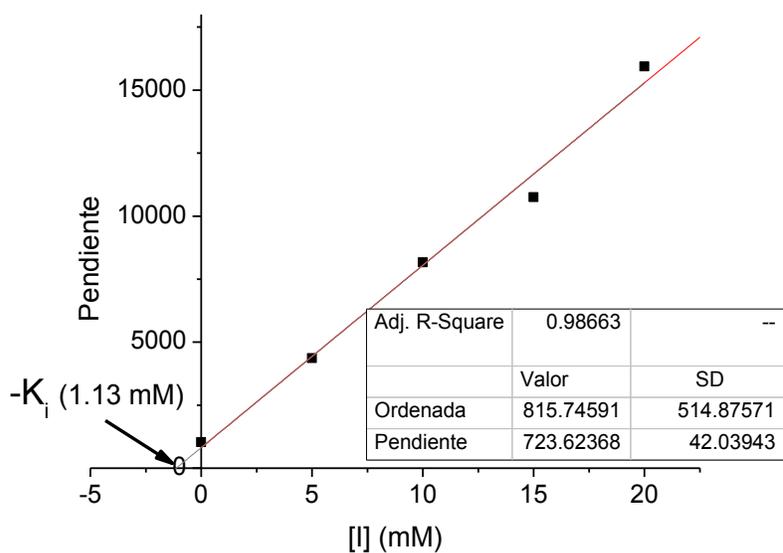


FIGURA 4-18 Determinación de la constante de disociación del complejo E-I,  $K_i$ , a partir de diferentes concentraciones de zanamivir en la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA por la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, 25°C a 370 nm.

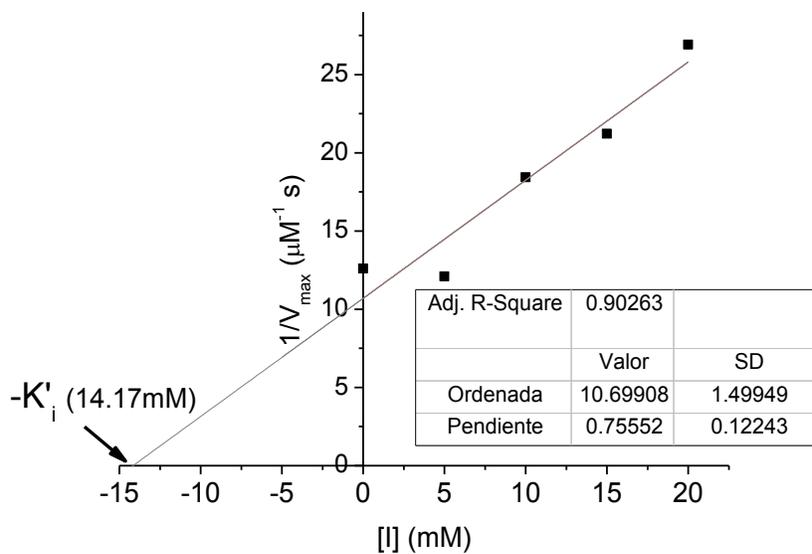


FIGURA 4-19 Determinación de la constante de disociación del complejo ESI,  $K'_i$ , a partir de diferentes concentraciones de zanamivir en la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA por la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, 25°C a 370 nm.

De esta forma se puede apreciar que  $K'_i$  (14.17 mM)  $\gg$   $K_i$  (1.3 mM) para concentraciones de 5, 10, 15 y 20 mM de fármaco, lo que indica que la enzima libre se encuentra en mayor medida ocupada por el inhibidor (EI), y menos favorecida para formar el complejo ESI.

Posteriormente, con la ayuda del software Origin 8 se realizó una regresión no lineal con la ecuación de Michaelis-Menten utilizando las cinco series de datos de inhibición simultáneamente (ajuste global no lineal). Los datos se ajustaron a dos posibles escenarios, el primero, uno en el cual la constante de Michaelis fuese la misma para todas las series de datos y; el segundo, un modelo en cual la velocidad máxima fuese la que no variara.

De esta manera se obtuvieron la FIGURA 4-20, que es el ajuste considerando una única  $K_m$ , ( $r^2=0.888$ ), y la FIGURA 4-21, que hace ese ajuste a una sola  $V_{max}$  ( $r^2=0.991$ ).

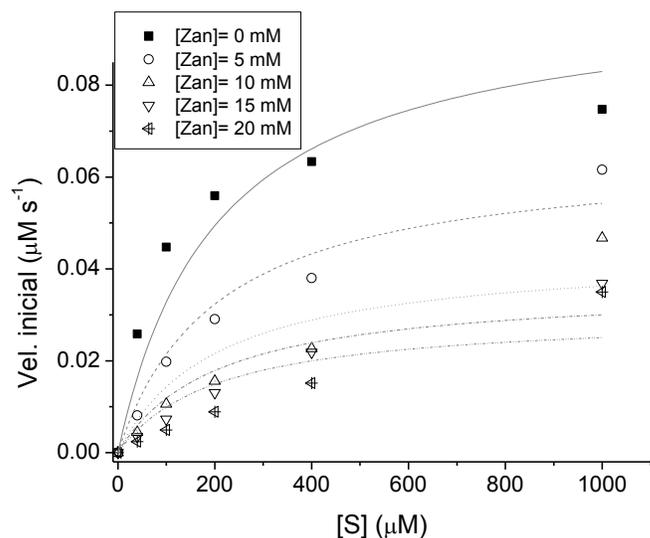


FIGURA 4-20 Efecto del zanamivir a diferentes concentraciones de sustrato sobre la enzima neuraminidasa a pH 7 en amortiguador de fosfatos 50 mM, KCl 150 mM y 0.2 % de BSA. Ajuste a un modelo de inhibición no competitiva (valores de  $K_m$  iguales).

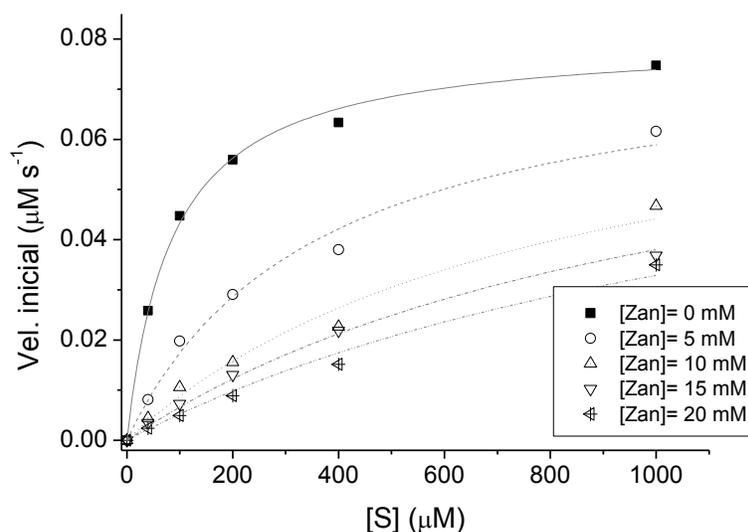


FIGURA 4-21 Efecto del zanamivir a diferentes concentraciones de sustrato sobre la enzima neuraminidasa a pH 7 en amortiguador de fosfatos 50 mM, KCl 150 mM y 0.2 % de BSA. Ajuste a un modelo de inhibición competitiva (valores de  $V_{max}$  iguales).

A partir del ajuste global no lineal se puede observar que el mejor modelo de inhibición es el competitivo (un valor diferente de  $K_m$  para cada serie de datos y la misma  $V_{max}$  para todas). Estos resultados son congruentes con el aumento en la  $K_m$  observado en el ajuste al modelo de Lineweaver-Burk.

Partiendo de esto, se propone al modelo de inhibidor de tipo mixto como el que mejor se ajusta a los datos, siendo mayor la inhibición en el sitio activo que la inhibición al complejo enzima-sustrato.

#### 4.2.3 DETERMINACIÓN DE LA $IC_{50}$ PARA EL ZANAMIVIR

Se consideraron las velocidades iniciales anteriormente calculadas, para la serie de datos correspondiente a la concentración de 200 µM de sustrato a diferentes concentraciones de zanamivir (5 mM, 10 mM, 15 mM y 20 mM), estas velocidades iniciales se compararon con la velocidad inicial de la reacción en ausencia de zanamivir con el fin de determinar el porcentaje de reducción de la velocidad inicial, dado por la ecuación:

$$\frac{V. \text{ inicial en ausencia de zanamivir} - V. \text{ inicial a } X [\text{Zanamivir}]}{V. \text{ inicial en ausencia de zanamivir}} \times 100$$

Los datos del porcentaje de reducción de  $V_0$  fueron luego graficados en función de la concentración de zanamivir (FIGURA 4-22) y los datos se ajustaron a un modelo no lineal exponencial ( $r^2=0.995$ ) cuya ecuación se expresa como sigue:

$$Y = Ae^{\left(\frac{-x}{t}\right)} + Y_0, \quad \therefore X = -t \ln \frac{Y - Y_0}{A}$$

siendo:  $A=-86.2323$ ,  $t=1.98205$  y  $Y_0=86.131$ , se obtuvo la  $IC_{50}$ , es decir,  $Y=50$ ,

$$IC_{50} = -1.98205 \ln \frac{50 - 86.131}{-86.2323} = 1.724 \text{ mg/mL}$$

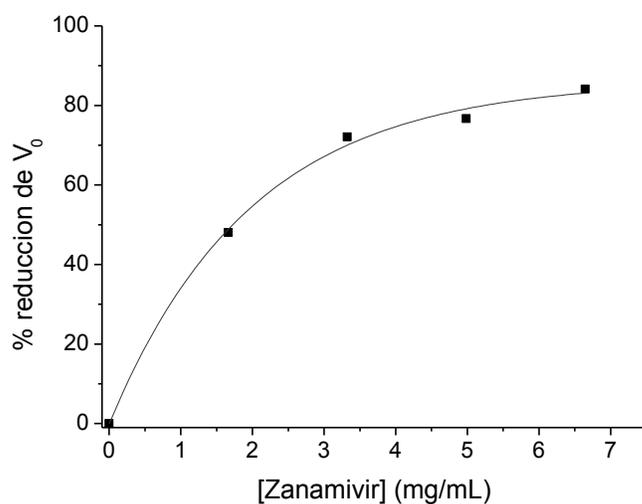


FIGURA 4-22 Reducción de la velocidad inicial de la reacción enzimática a diferentes concentraciones de zanamivir (5, 10, 15 y 20 mM) a pH 7 en amortiguador de fosfatos 50 mM, KCl 150 mM y 0.2 % de BSA.

### 4.3 EVALUACIÓN DE EXTRACTOS NATURALES CON POSIBLE ACTIVIDAD INHIBITORIA

---

Debido a las diferencias en la solubilidad de cada extracto y el espectro de absorción que cada uno posee, los ensayos difieren en las concentraciones empleadas para cada extracto.

El primer paso realizado fue la evaluación cualitativa de la solubilidad de cada extracto. Para ello se observó hasta qué concentración del extracto se presentaba precipitación. Con el fin de no alterar el medio en que se iba a llevar a cabo la hidrólisis enzimática, se prefirió que el disolvente en que se disolvieran los extractos fuese siempre agua.

TABLA 4-1 Solubilidad de los extractos de *P. sidoides*, miel, propóleo y xantonas.

<b>Extracto</b>	<b>Solubilidad máxima</b>	<b>Concentración máxima en ensayos</b>	<b>Disolvente</b>
Umckaloabo	≈14 mg/mL	0.844 mg/mL	Etanol
Miel	300 mg/mL	25 mg/mL	Agua
Propóleo A	10 mg/mL	1 mg/mL	Agua
Propóleo B	10 mg/mL	1 mg/mL	Agua
Propóleo C	15 mg/mL	1.5 mg/mL	Agua
Xantonas	≈2 mg/mL	0.05 mg/mL	Agua

Como puede observarse en la Tabla 4-1, la solubilidad de los extractos es 10 veces mayor a la estudiada, esta dilución se consideró adecuada para evitar que hubiese precipitación en celda, puesto que en las reacciones el volumen empleado de la solución concentrada de cada extracto nunca sobrepasaba el 20% del volumen total, es decir, el otro 80% estaba compuesto por los demás componentes de la reacción, así como del amortiguador (sales y BSA), que podían disminuir considerablemente la solubilidad del extracto.

En el caso de las xantonas la concentración se redujo aun más debido a su gran absorbancia a longitudes de onda donde el sustrato era cuantificado. Para el extracto del producto Umckaloabo se empleó la máxima solubilidad que se tiene en su presentación líquida en etanol (≈14 mg/mL) como comparativo para

determinar la solubilidad en agua, así se decidió partir de su presentación sólida, suponiendo que todo el principio activo se hubiese disuelto por completo en medio acuoso a una concentración menor a 5 mg/mL. En el caso de los téis, dado que la solubilidad no es tan perceptible a simple vista, se optó por probar cada uno a concentraciones de 1.25, 2.5 y 5 mg/mL.

Para contrarrestar estas diferencias se realizó un blanco para cada extracto. Este blanco consistía en un ensayo paralelo cuya composición era la misma que con el inhibidor, pero añadiendo un volumen igual de agua desionizada sin el extracto a prueba. De esta manera se compensaba la diferencia de volúmenes que pudiesen existir y la variabilidad día a día en los ensayos.

Los ensayos se realizaron a una concentración 10 veces menor a la solubilidad en la Tabla 4-1) para cada extracto, cuando esta concentración presentaba problemas en su medición, debida a problemas de solubilidad, se realizaban nuevos ensayos a una concentración inferior. En los casos en que se registraba una inhibición mayor del 30% en  $V_0$  se realizaron nuevos ensayos por triplicado con la finalidad de comprobar los datos y obtener su  $IC_{50}$ . Para las infusiones se realizaron directamente los triplicados a 3 concentraciones debido a que el procedimiento empleado para obtener los concentrados podía diferir en la concentración del extracto de manera significativa.

Las velocidades iniciales fueron obtenidas considerando las absorbancias a 370 nm, en amortiguador de fosfatos a pH 7, en el lapso de tiempo durante el cual se había generado el 30% del producto total, determinado al terminar la reacción.

Los resultados más representativos son presentados gráficamente a continuación. Es importante mencionar que cada extracto analizado procede de un concentrado inicial cuyo disolvente puede ser tanto agua como metanol (ver el Desarrollo Experimental de esta tesis).

Al final de algunos de los datos se muestra el cromatograma correspondiente del extracto, en los cuales fue posible conseguirlo, con el fin de facilitar futuros ensayos con cada fracción separada e identificar cuál de ellas es la que permite la inhibición.

#### 4.3.1 MIEL

Tanto para la miel a granel como para la miel comercial, los ensayos se efectuaron a 5 mg/mL y, ya que no se contaba con problemas de solubilidad, se duplicó la concentración a 10 mg/mL.

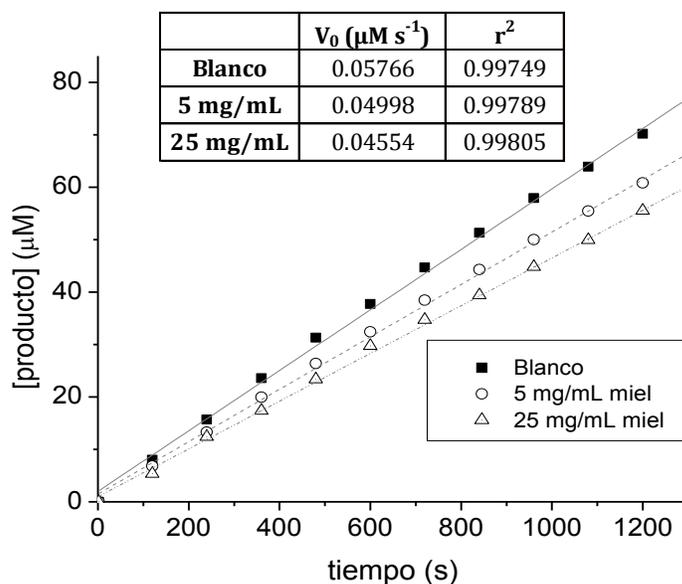


FIGURA 4-23 Efecto de la miel comercial sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

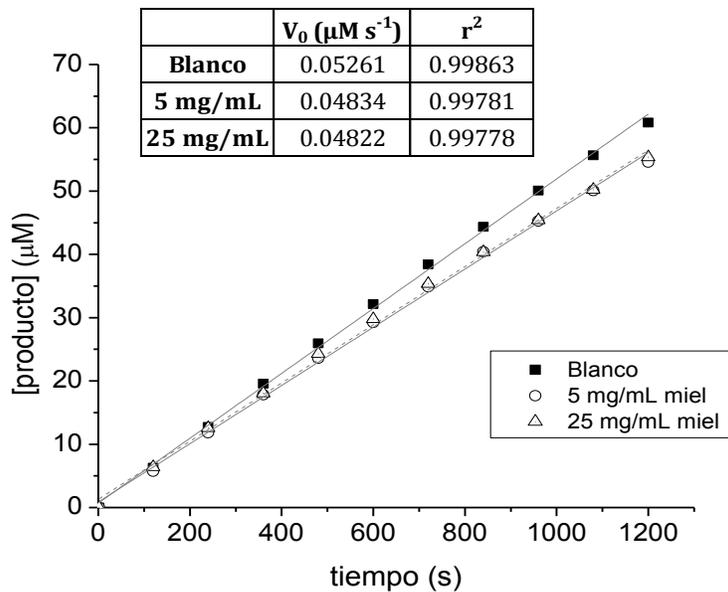


FIGURA 4-24 Efecto de la miel a granel sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

#### 4.3.2 *Pelargonium sidoides*

El ensayo partiendo del concentrado metanólico en la FIGURA 4-25 omite los resultados obtenidos por la reacción enzimática a 0.844 mg/mL debido a problemas de solubilidad que presentaban absorbancias altas y aleatorias, los cuales también aparecieron con el concentrado acuoso (FIGURA 4-26).

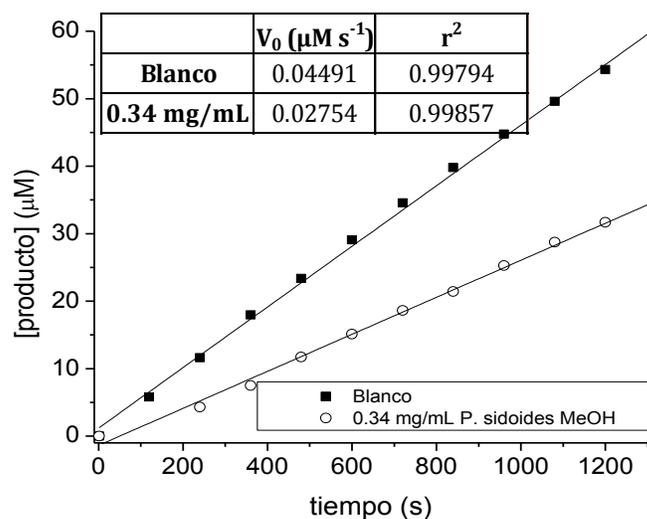


FIGURA 4-25 Efecto de la disolución metanólica de *Pelargonium sidoides* sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

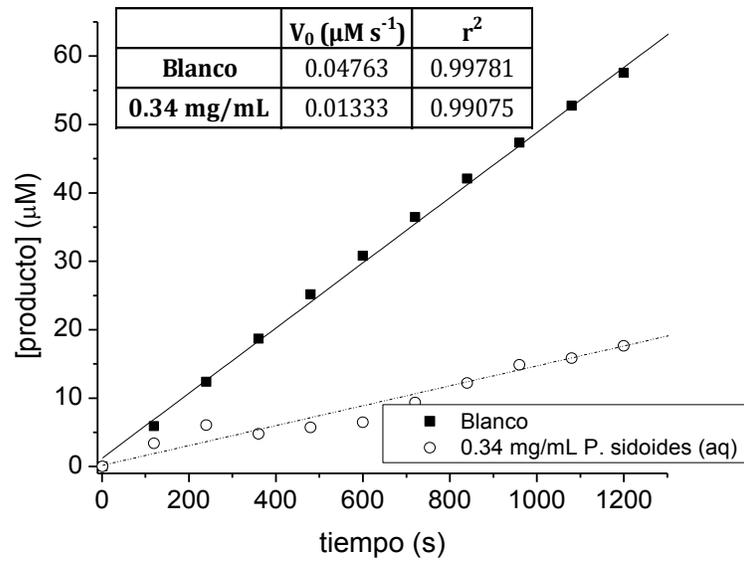


FIGURA 4-26 Efecto de la solución acuosa de *Pelargonium sidoides* [0.34 mg/mL] sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

Debido a los problemas de solubilidad en los ensayos con *Pelargonium sidoides* los triplicados, debido a su alta inhibición, se realizaron a concentraciones cercanas a 0.34 mg/mL en medio acuoso, donde se mostró mayor inhibición. La FIGURA 4-27 es el promedio de esos resultados, respaldando los datos de la FIGURA 4-26.

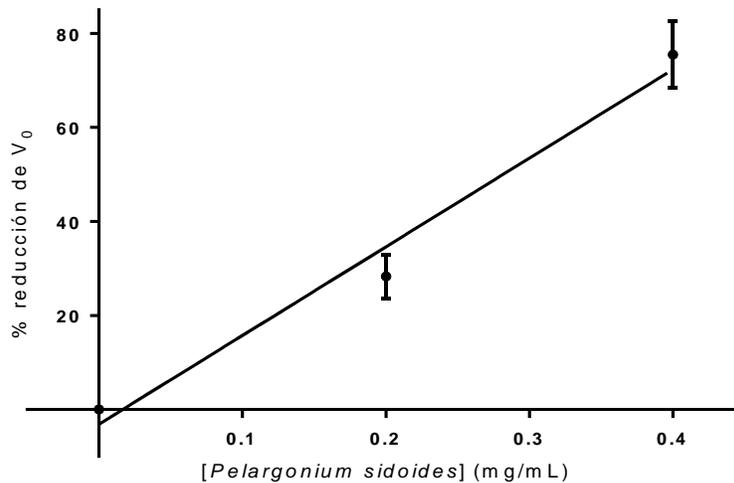


FIGURA 4-27 Efecto de la disolución acuosa de *Pelargonium sidoides* [0.2 mg/mL] y [0.4 mg/mL] sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

Ajustando los datos de la figura anterior a un modelo lineal se determinó que el comportamiento inhibitorio de *P. sidoides* está descrito por la ecuación:

$$Y = 188.686x - 3.147 \quad (r^2 = 0.959),$$

Y por lo tanto el valor de  $IC_{50}$  se encuentra dado por:

$$IC_{50} = \frac{50 + 3.147}{188.686} = 0.282 \text{ mg/mL}$$

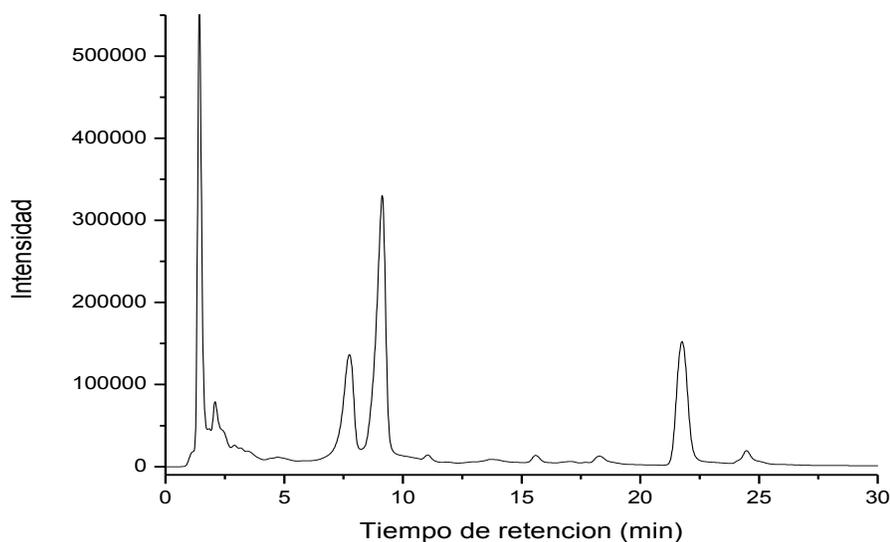


FIGURA 4-28 Cromatograma del extracto de *Pelargonium sidoides*. Agua-MeOH, 95:5 (0-4 min), 80:20 (8-11 min), 65:35 (16-19 min), 40:60 (21-25 min), 0:100 (27-28 min). Columna Premier Ultra II C18 (30 x 2.1 mm x 3  $\mu$ m) a  $\lambda=330$  nm.

### 4.3.3 XANTONAS

La cuantificación empleando como sustrato 4-MUNANA no fue posible debido a que la mezcla de xantonas absorbe en gran medida a longitudes de onda inferiores a 390 nm, por lo que se decidió emplear el ácido 2-O-(p.nitrofenil)- $\alpha$ -N acetilneuramínico como sustrato, el cual tiene un máximo de absorción a 400 nm cuando es hidrolizado a 4-nitrofenol.

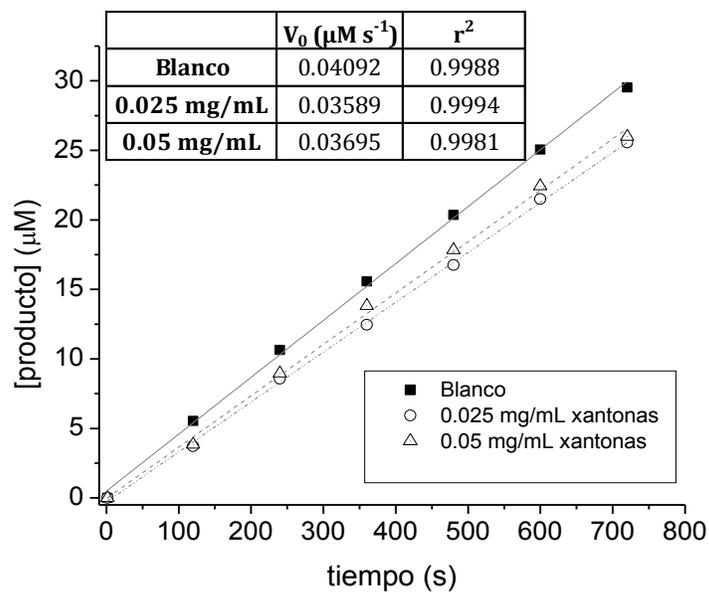


FIGURA 4-29 Efecto de las xantonas en metanol sobre la actividad de la neuraminidasa en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubacion de 15 mins. (4-nitrofenol),

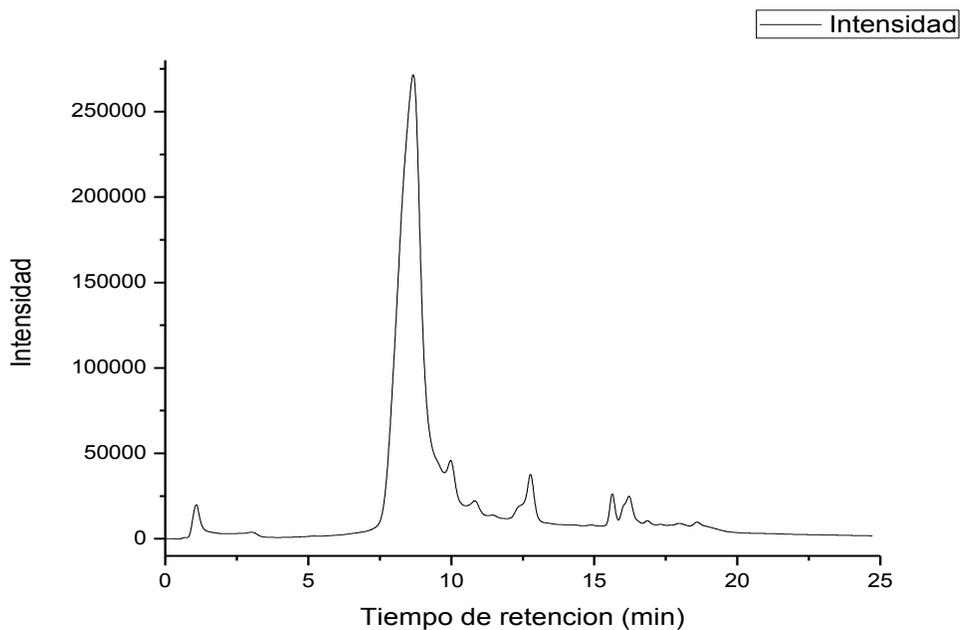


FIGURA 4-30 Cromatograma del extracto de xantonas. Agua-MeOH 50:50 (0-2 min), 25:75 (6-9 min), 5:95 (14-17 min), 50:50 (20-25 min). Columna Premier Ultra II C18 (30 x 2.1 mm x 3  $\mu\text{m}$ ) a  $\lambda=276$  nm.

#### 4.3.4 PROPÓLEO

La inhibición mostrada en la FIGURA 4-31 no fue posible de respaldar al realizar nuevos ensayos, ya que los resultados obtenidos eran aleatorios, incluso con problemas de solubilidad a la misma concentración aquí representada.

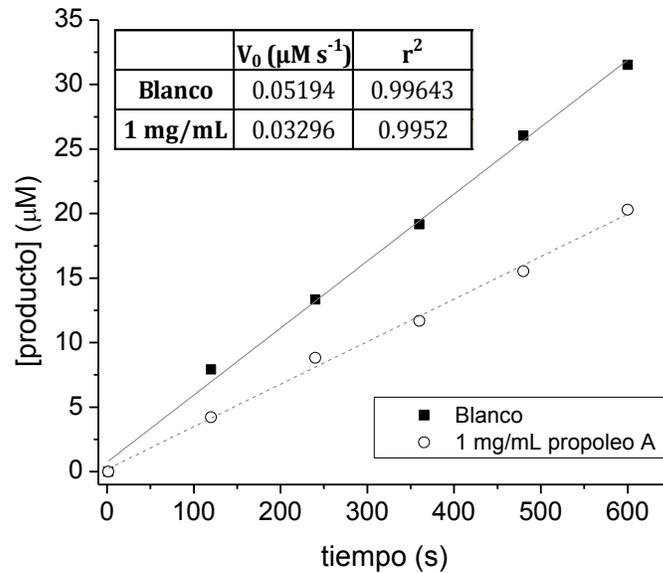


FIGURA 4-31 Efecto del propóleo A (Acuexcomatl) en metanol sobre la actividad de la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

Para el propóleo B, se repitió el ensayo como en la FIGURA 4-32, los resultados no se modificaron, la velocidad inicial de la reacción enzimática no mostraba diferencias.

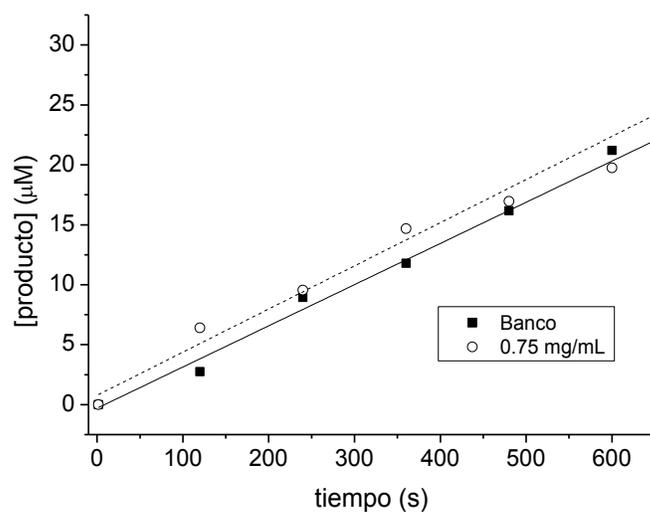


FIGURA 4-32 Efecto del propóleo B (1era colecta de Trojes) en metanol sobre la actividad de la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 min.

El efecto del extracto etanólico del propóleo C a 0.75 y 1.5 mg/mL daba como resultado una inhibición de la velocidad inicial aleatoria en los ensayos, ya que se contaba con suficiente cantidad de este propoleo, se decidió volverlo a extraer en agua, los resultados en la FIGURA 4-33 muestran que existe una inhibición, pero ésta no es proporcional a la concentración.

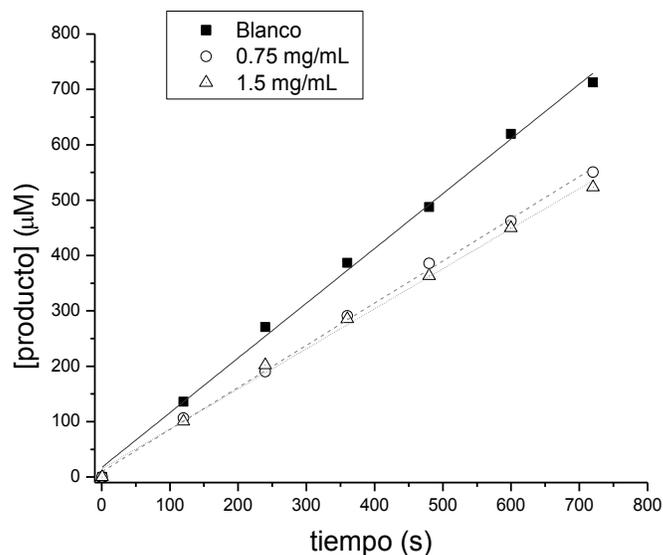


FIGURA 4-33 Efecto del extracto acuoso del propóleo C (2da. colecta de Trojes) sobre la actividad de la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

#### 4.3.5 TÉS

En este caso las FIGURAS 4-34, 4-35 y 4-36 hacen referencia a los datos de los ensayos con té de limón, té de Jamaica y té de hierbabuena, respectivamente.

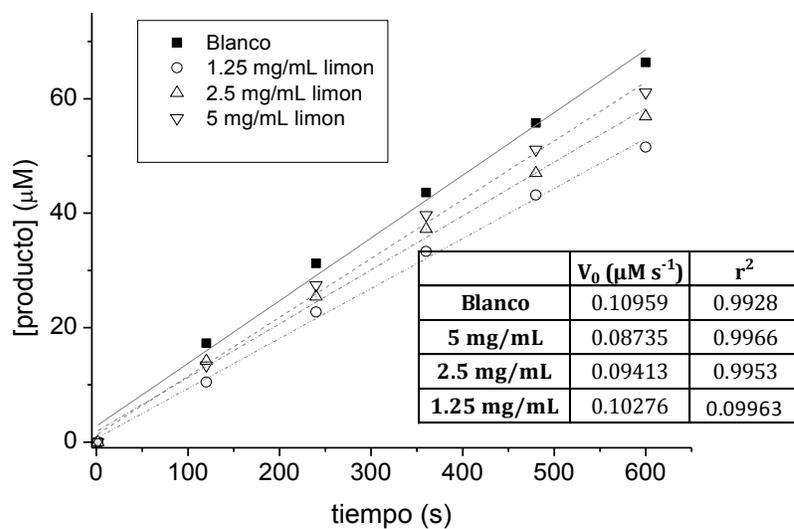


FIGURA 4-34 Efecto del extracto de té de limón sobre la actividad de la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

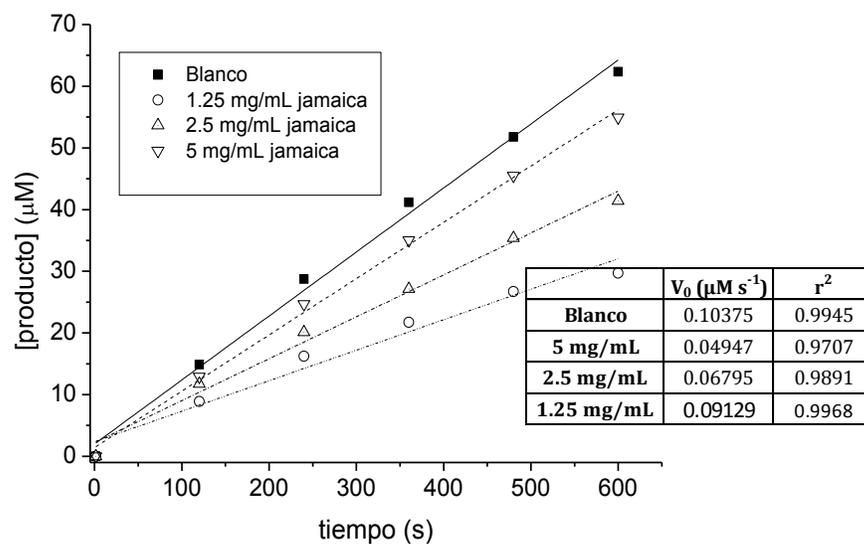


FIGURA 4-35 Efecto del extracto de té de jamaica sobre la actividad de la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

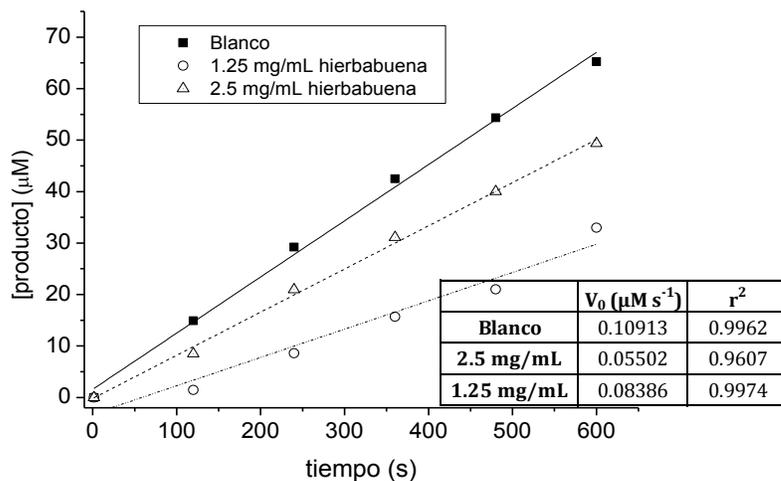


FIGURA 4-36 Efecto del extracto de té de hierbabuena sobre la actividad de la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

Para el té de limón se muestra la FIGURA 4-37, donde se presentan los porcentajes de inhibición de la velocidad inicial en función de la concentración de extracto. A partir de ésta, se ajustaron los datos a un modelo lineal con la finalidad de inferir un aproximado de la  $IC_{50}$ , considerando que a  $X=50\%$  reducción de  $V_0$  y:

$$Y = 3.6426x + 1.9848 \quad (r^2 = 0.933), \quad \therefore$$

$$IC_{50} = \frac{50 - 1.9848}{3.6426} = 13.18 \text{ mg/mL}$$

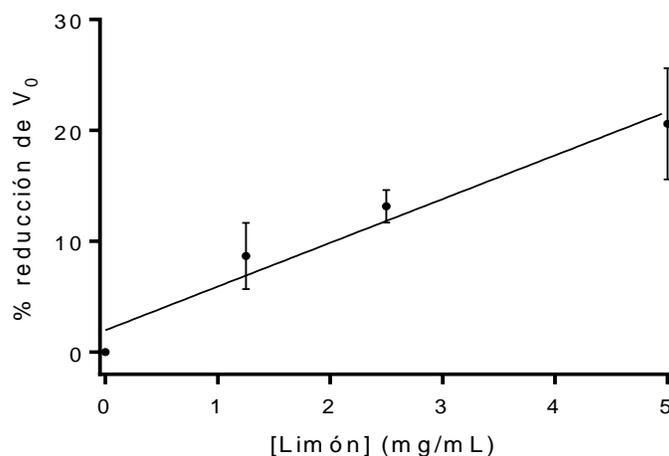


FIGURA 4-37 Efecto del extracto de té de limón sobre la actividad de la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

En el caso del té de Jamaica, FIGURA 4-38, se presentan los porcentajes de inhibición de la velocidad inicial en función de la concentración de extracto. A partir de ésta, se ajustaron los datos a un modelo lineal con la finalidad de inferir un aproximado de la  $IC_{50}$ , considerando que a  $X= 50\%$  reducción de  $V_0$  y:

$$Y = 11.108x + 2.318 \quad (r^2 = 0.982), \quad \therefore IC_{50} = \frac{50 - 2.318}{11.108} = 4.29 \text{ mg/mL}$$

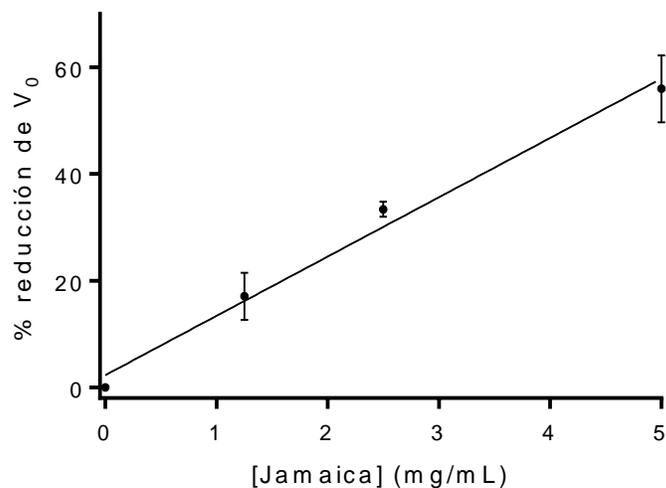


FIGURA 4-38 Efecto del extracto de té de jamaica sobre la actividad de la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

Por último, el té de hierbabuena se expone en la FIGURA 4-39, nuevamente se presentan los porcentajes de inhibición de la velocidad inicial en función de la concentración de extracto. A partir de ésta, se ajustaron los datos a un modelo lineal con la finalidad de inferir un aproximado de la IC<sub>50</sub>, considerando que a X=50 % reducción de V<sub>0</sub> y:

$$Y = 22.608x - 0.1423 \quad (r^2 = 0.999), \quad \therefore$$

$$IC_{50} = \frac{50 + 0.1423}{22.608} = 2.22 \text{ mg/mL}$$

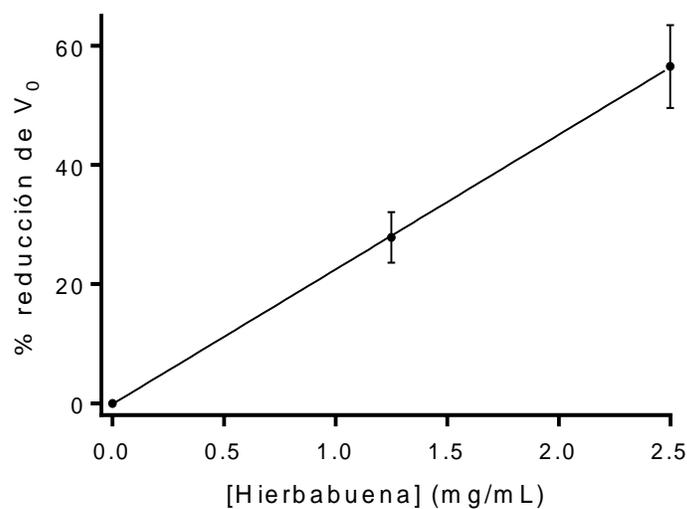


FIGURA 4-39 Efecto del extracto de té de hierbabuena sobre la actividad de la neuraminidasa de *C. perfringens* en amortiguador de fosfatos pH 7, a 25°C y 370 nm, incubación de 15 mins.

---

#### 4.3.6 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS EN LA ACTIVIDAD DE LA NEURAMINIDASA

---

En las FIGURA 4-40 y FIGURA 4-41, se compara la influencia de los extractos naturales en la velocidad inicial de la reacción, considerando:

$$\frac{V. inicial del blanco - V. inicial del extracto}{V. inicial del blanco} \times 100$$

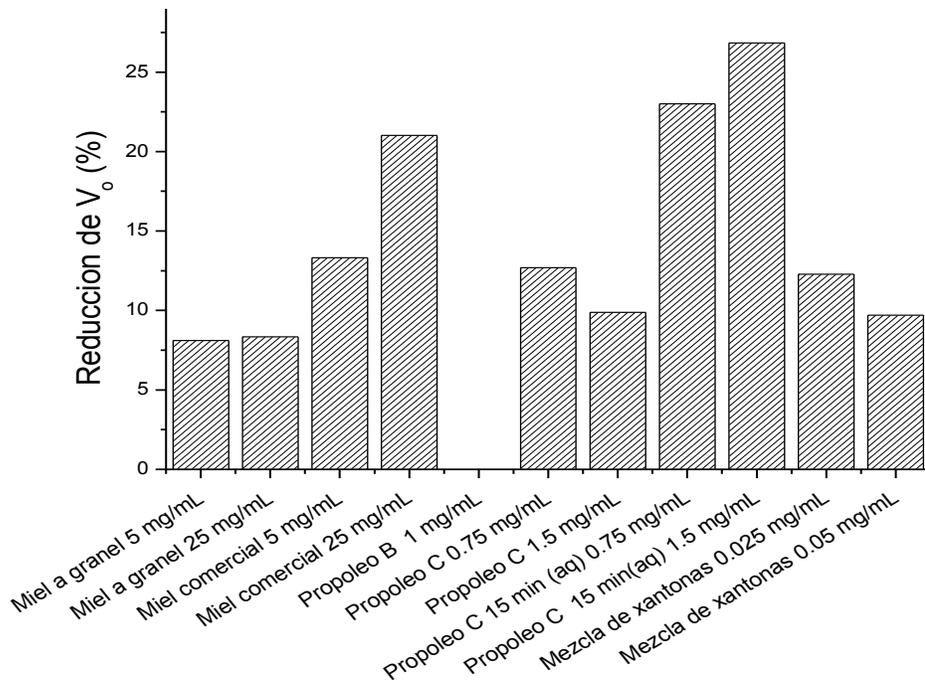


FIGURA 4-40 Efecto de distintos extractos naturales sobre la velocidad inicial. Resultados de baja inhibición.

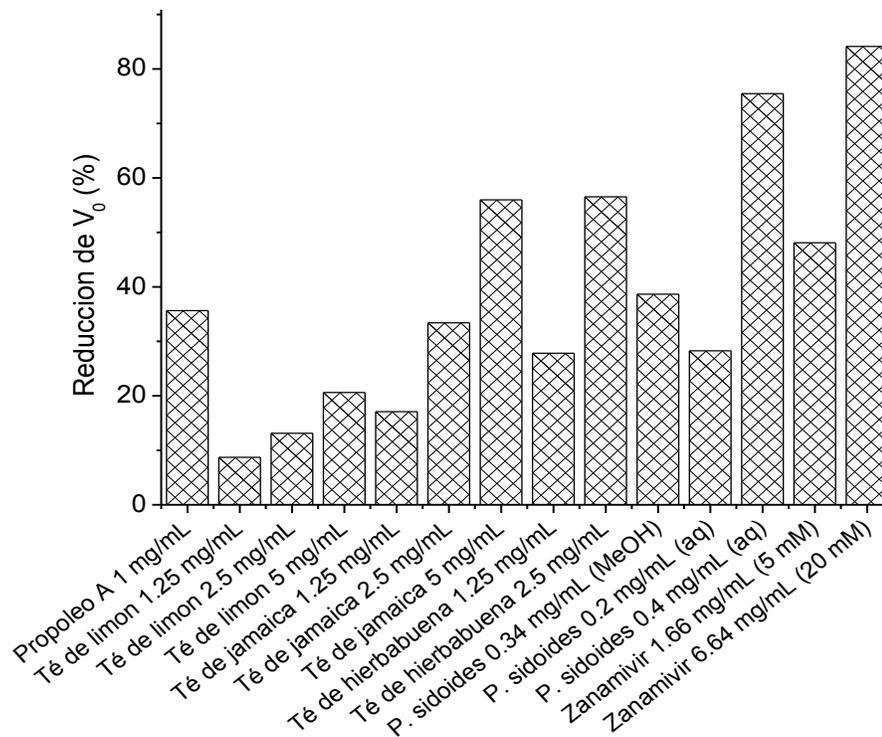


FIGURA 4-41 Efecto de distintos extractos naturales sobre la velocidad inicial. Resultados de alta inhibición.

Con base los datos de las FIGURAS 4-40 Y 4-41, se puede observar que todos los extractos naturales que se emplearon en los ensayos poseen como mínimo un 5% de reducción en la velocidad inicial de la actividad enzimática de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, sin embargo, esta inhibición no resulta ser consistente al ser elevada la concentración de extracto, como en el ejemplo del propóleo C, cuya inhibición fluctúa entre 5 y 12.5 % sin mostrar una tendencia clara (FIGURA 4-40). Por otro lado, el propóleo C, que presentaba estos datos sin tendencia, se extrajo de nuevo, pero esta vez la extracción fue acuosa, con el fin de evitar lo más posible la extracción de componentes oleosos y su precipitación en el medio acuoso de la reacción.

Este procedimiento logró un aumento de 45% en la inhibición enzimática por parte del propóleo C<sub>(aq)</sub> a 0.75 mg/mL, FIGURA 4-41, comparado con esa misma concentración en el extracto etanólico, FIGURA 4-40. Es posible que este aumento esté ligado a que el nuevo extracto fuese más soluble y la concentración final en la celda no se sobreestimara tanto como en el caso del extracto etanólico, donde la concentración era la misma, pero la gran parte estaba precipitada.

Por estas razones se considera que, bajo la metodología y concentraciones probadas, tanto las mieles, a granel y comercial, así como los extractos etanólicos B y C, no tienen un efecto considerable en la actividad de la enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (FIGURA 4-40). Cabe destacar que aunque el propóleo A muestre una inhibición mayor al 30%, este resultado no se vio respaldado cuando se trabajó a concentraciones menor (resultados aleatorios) y no fue posible trabajar a una concentración mayor.

De la misma manera, el problema que se presentaba en la mezcla de xantonas era su gran absorbancia que interfería con la cuantificación del 4-MU. La solución se obtuvo empleando el 4-nitrofenol, en cual se leía a 400-440 nm, pero aún en esas longitudes de onda, la interferencia no permitía concentraciones altas de la mezcla de xantonas. Se optó por medir la absorción con p-nitrofenol a 400 nm para permitir cuantificar la hidrólisis a 0.025 y 0.05 mg/mL, los resultados no

mostraban alguna tendencia, ya que incluso se tuvo más inhibición a 0.025 mg/mL que a 0.05 mg/mL.

De aquí en adelante se tienen los mejores inhibidores analizados: el extracto de *Pelargonium sidoides* y las infusiones de té de limón, Jamaica y hierbabuena.

En el primer extracto de *Pelargonium sidoides*, se partió de un producto comercial el cual se disolvió tanto en agua como en metanol. Los resultados demuestran que la solución acuosa tiene mayor efecto sobre la actividad enzimática. De nuevo, la explicación puede ser dada por la disminución de la solubilidad en un medio alcohólico, comparada con la que se presenta en agua destilada. En este punto cabe destacar que la solubilidad de *P. sidoides* en metanol impidió realizar triplicados con reproducibilidad aceptable para obtener su IC<sub>50</sub>, por lo que sólo son mostrados los datos en solución acuosa para este propósito.

La diferencia aquí es una inhibición 46.3% mayor en el caso de la solución acuosa (0.34 mg/mL), comparada con la misma concentración en la solución metanólica, aunque de cualquier forma ambas soluciones muestran un efecto muy marcado.

Como ya se dijo, la repetición en estos ensayos de la solución acuosa mostraron una inhibición igual de marcada: 28.3 % para 0.2 mg/mL y 75.5 % para 0.4 mg/mL, considerando que en estos caso también se efectuaba la incubación de 15 minutos. Bajo estas mismas condiciones el té de limón produjo una inhibición de 8.68 %, 13.15 % y 20.6 %, el té de jamaica presentó inhibición de 17.08, 33.4 y 55.98 % y el té de hierbabuena 27.83 y 56.52 % a concentraciones de 1.25, 2.5 y 5 mg/mL, respectivamente (salvo en el caso de la hierbabuena que no fue posible cuantificarla a la última concentración).

Por último se compararon las IC<sub>50</sub> calculadas para los extractos junto con la del zanamivir, el resultado es la FIGURA 4-42.

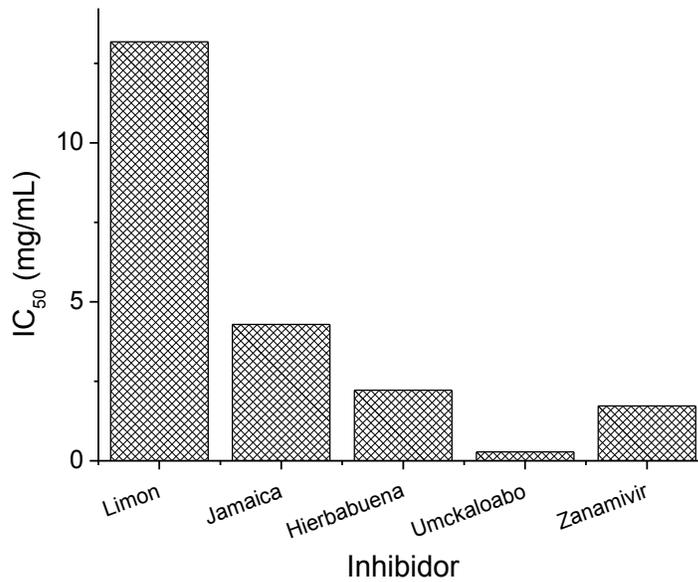


FIGURA 4-42 Comparación de las concentraciones inhibitorias 50 (IC<sub>50</sub>) de los extractos con alta inhibición y del control positivo: zanamivir.

Bajo las condiciones aquí descritas, se observa que la inhibición por la infusión de hierbabuena es muy similar (IC<sub>50</sub>=2.2 mg/mL) a la del zanamivir (IC<sub>50</sub>=1.72 mg/mL) y que el producto comercial Umckaloabo® posee un poder aún mayor (IC<sub>50</sub>=0.282 mg/mL).

Cabe mencionar que los extractos de los cuales se muestra su IC<sub>50</sub> tienen diferencias inherentes a su naturaleza, por lo que resulta necesario intentar el aislamiento de los compuestos específicos que poseen esa actividad inhibitoria, con el fin de realizar una comparación más cercana a la realidad al compararla con el zanamivir, un compuesto puro.

Además, es indispensable recordar que las concentraciones de las infusiones hacen referencia al método con el cual se prepararon, pero su concentración real difiere en gran medida por el hecho de que no se expresa aquí cuánto de lo que se pesó quedó realmente en solución con el agua. Para ello haría falta tomar el stock principal y evaporar su disolvente para así determinar la concentración verdadera.

#### 4.4 SÍNTESIS DE GLUCÓSIDO FLUOROGÉNICO

---

Para sintetizar el glucósido del ácido neuramínico con la fluoresceína se siguió el procedimiento mostrado en la FIGURA 4-43. La identificación de los productos se realizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y los espectros obtenidos se compararon con los espectros teóricos de los derivados del ácido neuramínico simulados en el software MestReNova, con el fin de identificar grupos funcionales clave. Estos espectros, así como los rendimientos de cada paso de la síntesis se muestran a continuación.

La FIGURA 4-43 refleja la facilidad de incorporar un grupo metilo en la molécula del ácido neuramínico, produciendo un rendimiento de 100 %. Esta facilidad de sustitución reduce su rendimiento al intentar unir un cloro y cuatro grupos acetilo a la molécula metilada. Aun así, se obtuvo un rendimiento alto de 79.5 %

Los principales problemas recaen precisamente en la adición de la fluoresceína sódica a la estructura del ácido neuramínico protegido. Al parecer se forman varios subproductos, ver 3.4.2.3. UNIÓN A LA FLUORESCEÍNA SÓDICA [34], cuya presencia sea debida a que una molécula de fluoresceína podría unir uno o dos ácidos neuramínicos quizás por la influencia del pH del medio de reacción, que no fue controlado, en las moléculas que se estaban uniendo, o tal vez en una protección incompleta o una cloración en posiciones distintas a las esperadas.

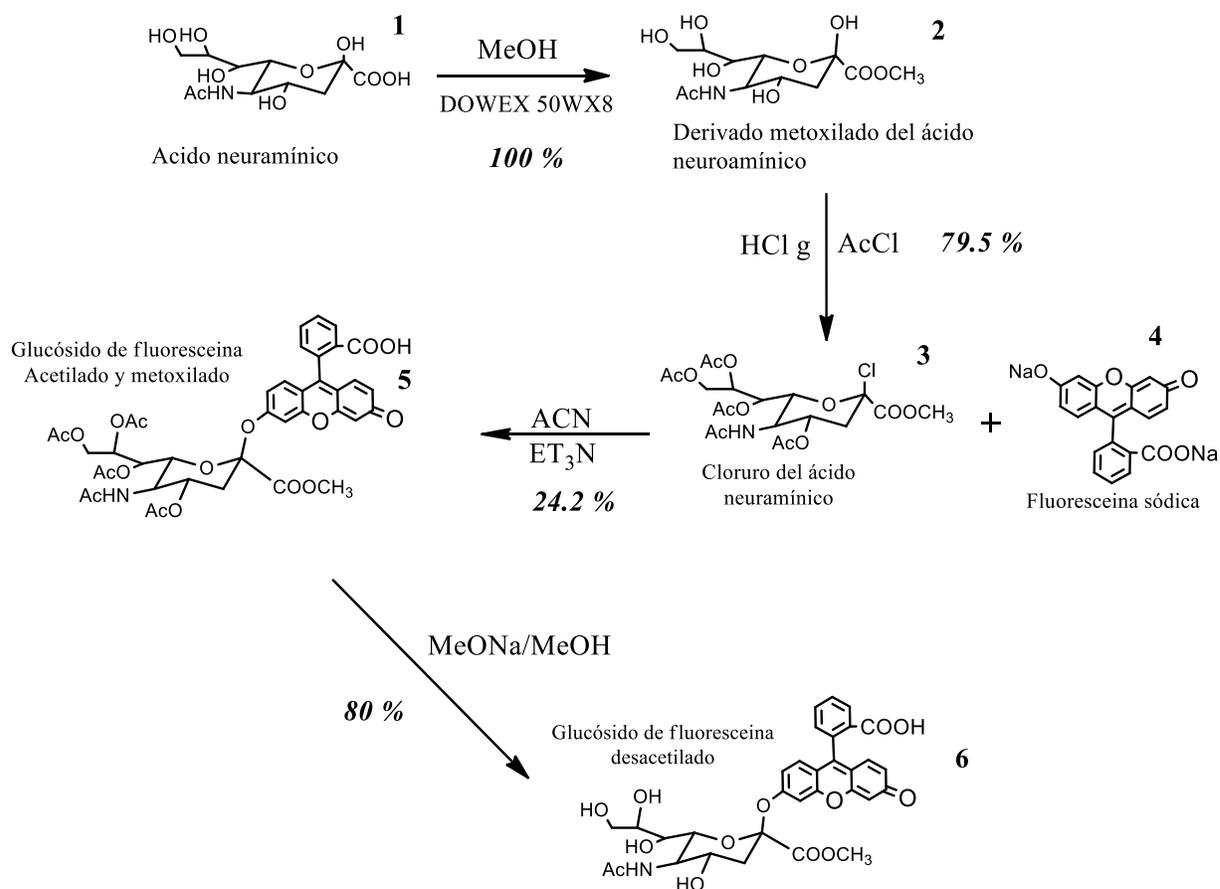


FIGURA 4-43 Rendimientos de cada paso en la síntesis del compuesto fluorogénico

En la FIGURA 4-44 se muestra el espectro en RMN de protón del ácido acetilneuramínico, donde es importante notar las principales señales, una notoriamente elevada cercana a 2 ppm perteneciente al grupo AcNH, dos tripletes a cada lado de esa señal, y un conjunto de protones detectados en la zona comprendida entre 3.5 y 4 ppm, que corresponden a los presentes en los carbonos 4-9.

Para la metilación la FIGURA 4-45 vuelve a mostrar el grupo AcNH y el par de tripletes que no muestran afectación. Para la zona comprendida entre 3.5 y 4 también se encuentran señales como en caso anterior, pero una nueva señal de considerable tamaño aparece, es la señal del grupo  $-\text{OCH}_3$  incorporado.

Este conjunto de señales reaparecen para la FIGURA 4-46, se hacen visibles además las cuatro sustituciones por parte de los grupos acetilos, en la zona cercana al grupo AcNH. Mismas que para la FIGURA 4-47 aparecen acompañadas de muchas señales ruido, causadas por la formación de diversos subproductos que no pudieron eliminarse del todo, y para la FIGURA 4-48 desaparecen. La fluoresceína se presenta como señales pequeñas en la zona de 6.5 a 8 ppm, mismas que se encuentran presentes después de la eliminación de los acetilos.

Considerándose los rendimientos aquí presentados se puede obtener un rendimiento total de la reacción hasta el glucósido de fluoresceína desacetilado:

$$R_{ndimiento\ total} = (1 \times 0.795 \times 0.245 \times 0.8) \times 100 = 15.3\%$$

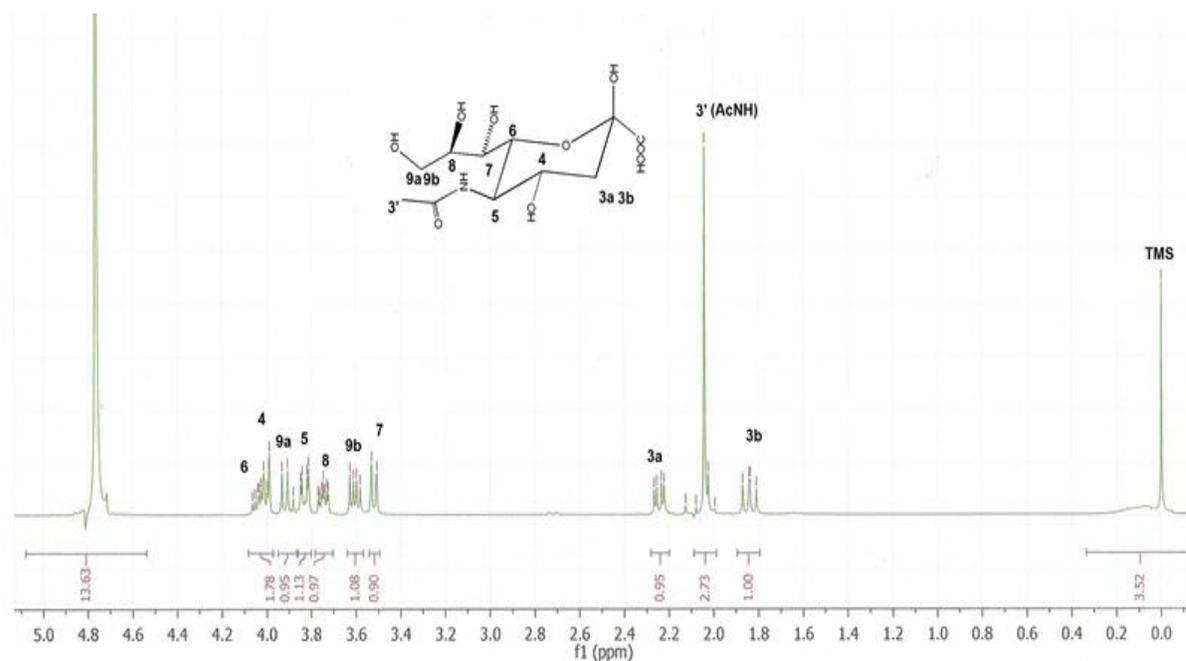


FIGURA 4-44 Resonancia protónica del ácido neuramínico (1).

#### 4.4.1 PROTECCIÓN DEL ÁCIDO NEURAMÍNICO

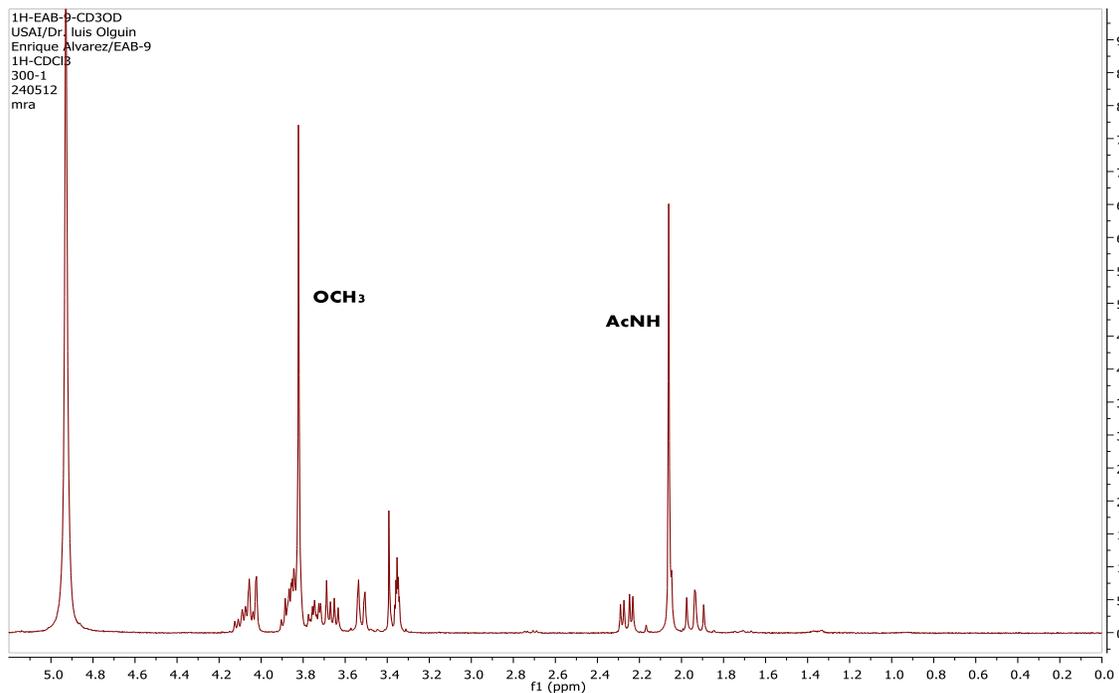


FIGURA 4-45 Resonancia protónica del ácido neuramínico metoxilado (2).

#### 4.4.2 CLORACIÓN/ACETILACIÓN

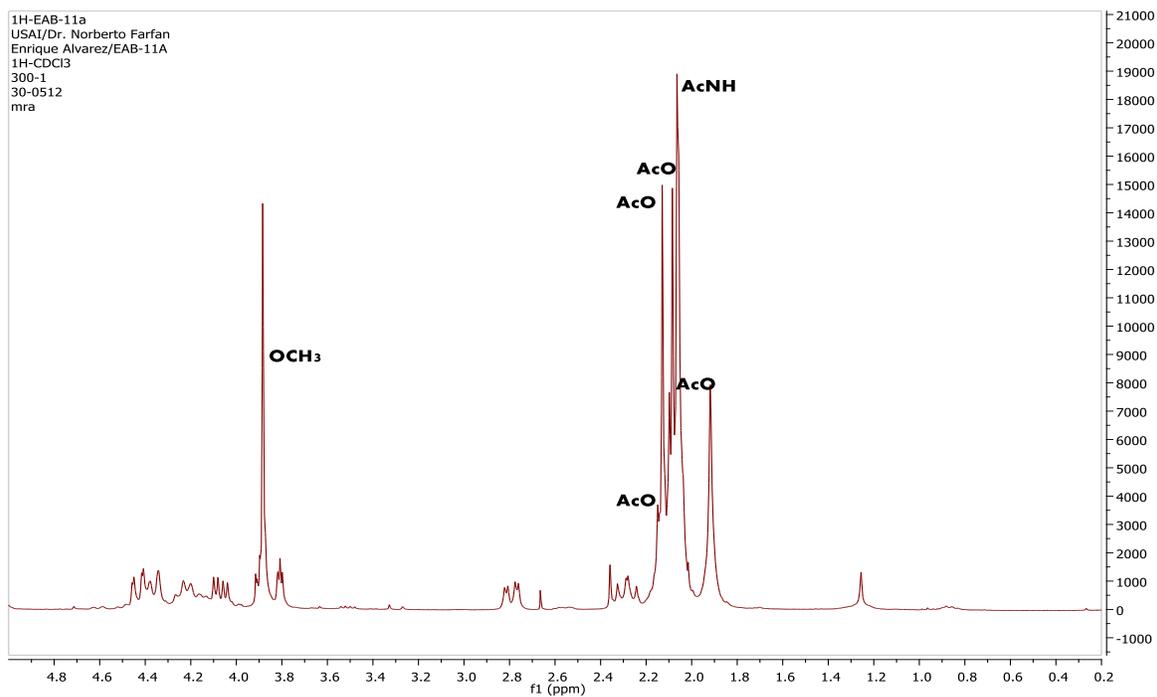


FIGURA 4-46 Resonancia protónica del ácido neuramínico metoxilado, acetilado y clorado (3).

#### 4.4.3 UNIÓN A LA FLUORESCÉINA SÓDICA

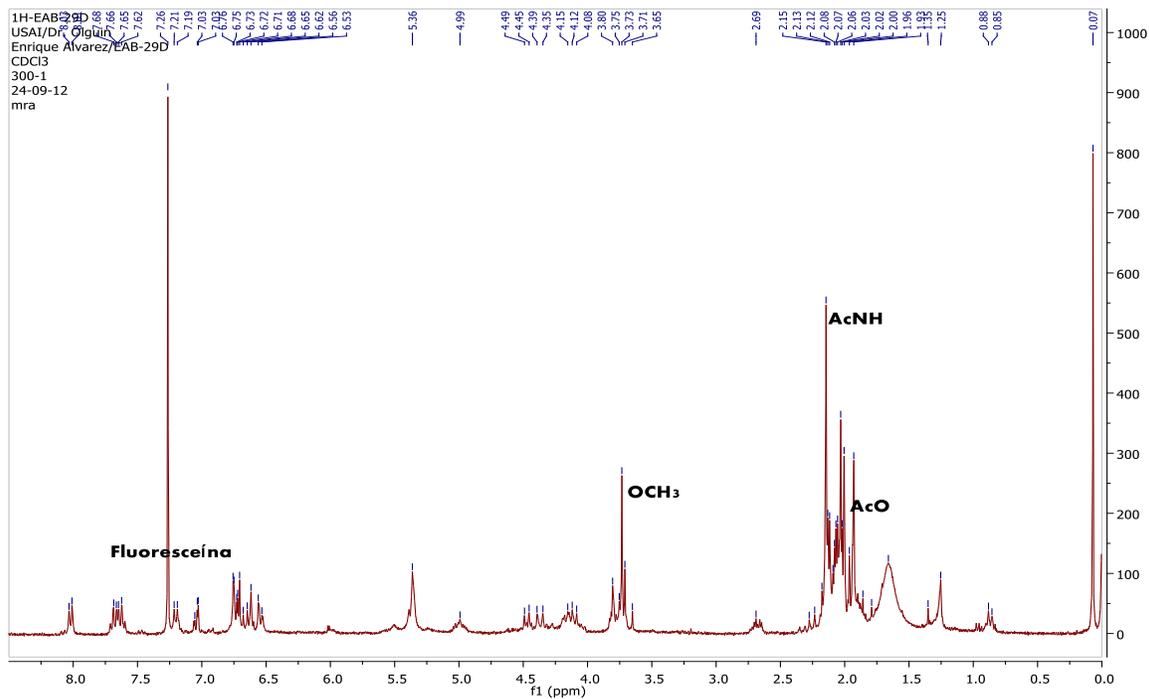


FIGURA 4-47 Resonancia protónica del glucósido fluorogénico protegido (5).

#### 4.4.4 DESPROTECCIÓN DE LA MOLÉCULA

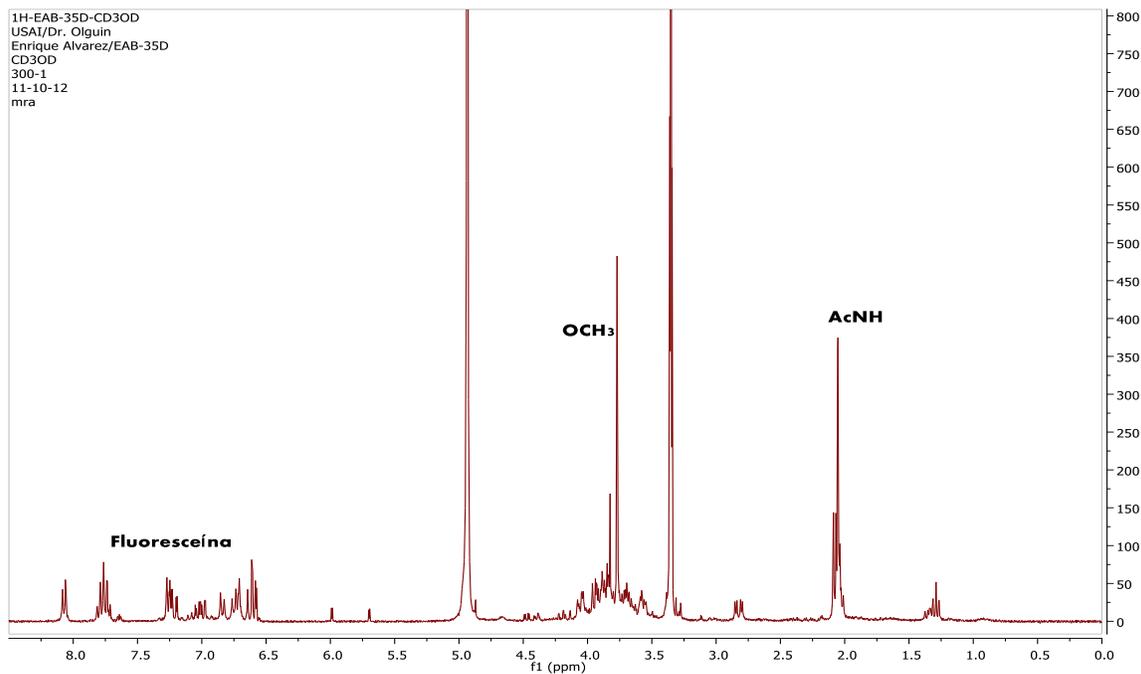


FIGURA 4-48 Resonancia protónica del glucósido fluorogénico metoxilado (6).

# 5 CONCLUSIONES

---

Para ensayos enzimáticos empleando 0.0275 U/mL de neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, 200  $\mu$ M de ácido 2-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-n acetilneuramínico en un amortiguador de fosfatos (50 mM), 150 mM de KCl y 0.2% de BSA a 370 nm, pH 7 y 25 °C:

- Los extractos de miel (comercial o a granel), propóleos (de las colectas en Acuexcómatl y Trojes) y la mezcla de xantonas, no presentaron, con reproducibilidad aceptable, inhibición mayor al 25%.
- Los extractos probados que presentaron mayor inhibición fueron, en orden descendente, los de *Pelargonium sidoides*, proveniente del producto comercial Umckaloabo®, y las infusiones de hierbabuena (Lagg's®), jamaica (La Pastora®) y limón (Lagg's®), todos libres de cafeína.

Extracto	IC <sub>50</sub>
Zanamivir (Relenza®)	1.72 mg/mL
<i>Pelargonium sidoides</i> (Umckaloabo®)	0.28 mg/mL
Infusión de hierbabuena	2.22 mg/mL
Infusión de jamaica	4.29 mg/mL
Infusión de limón	13.18 mg/mL

La síntesis del compuesto fluorogénico, sin desmetilación, produjo un rendimiento total de 15.3%, El compuesto fluorogénico metoxilado probado como sustrato de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, no presentó reacción.

# 6 BIBLIOGRAFÍA

---

1. Potter, C.W., *A history of influenza*. Journal of Applied Microbiology, 2001. **91**: p. 572-579.
2. Aeton C. Hurt, J.K.H., et. al., *Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation*. Journal of Virology, 2009. **83**(20): p. 10366-10373.
3. Taylor, G., *Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential*. Current Opinion in Structural Biology, 1996. **6**(6): p. 830-837.
4. Garman, E. and G. Laver, *The Structure, Function, and Inhibition of Influenza Virus Neuraminidase*, in *Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design*, W. Fischer, Editor. 2005, Springer US.
5. Investigation, A.S.f.C., *Science in Medicine: The JCI Textbok of Molecular Medicine*. 1 ed. 2008: Jones and Bartlett Publishers. 1157.
6. Worthington, K. and V. Eorthington, *Worthington Enzyme Manual*, 2011, Worthington Biochemical Corporation.
7. Seonghun Kim, D.-B., Hyun Ah Kang, *Features and applications of bacterial sialidases*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011. **1**: p. 1-15.
8. Romero, R.C., *Microbiología y Parasitología Humana*. 2007, México: Médica Panamericana.
9. Martina Chiarezza, D.L., et al, *The NanI and NanJ sialidases of Clostridium perfringens are not essential for virulence*. Infection and Immunity, 2009. **77**(10): p. 4421-4428.
10. Bae Ryu, Y., M.J. Curtis-Long, J. Won Lee , J. Hyo Kim, and K. Young Kang, *Characteristic of neuraminidase inhibitory xanthones from Cudrania tricuspidata*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009. **17**: p. 2744-2750.
11. Won Ryu, H., M.J. Curtis-Long, S. Jung, Y. Min Jin, J. Keun Cho, and Y. Bae Ryu, *Xanthones with neuraminidase inhibitory activity from the seedcases of Garcinia mangostana*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010. **18**: p. 6258-6264.
12. Li, X., Ohtsuki, S. Shindo, M. Sato, and T. Koyano, *Mangiferin Identified in a Screening Study Guided by Neuraminidase Inhibitory Activity*. Planta Medica, 2007. **73**: p. 1195-1196.
13. Life Technologies, R.P.H., *Detecting Glycosidases*, in *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, M.T.Z.S. Iain D. Johnson, Editor. 2010. p. 1076.
14. Hernández Raya, S., *Desarrollo de un ensayo espectrofotométrico para determinar la actividad enzimática de la neuraminidasa de Clostridium perfringens, usando 2-o-(p-nitrofenil)-alfa-d-n-ácido acetilneuramínico,*, in *Facultad de Química 2012*, UNAM: D. F.
15. Serkedjieva, J. and N. Manolova, *Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids)*. Journal of Natural Products, 1992. **55**(3): p. 594-597.
16. Shimizu, T., A. Hino, T. Atsuko, and e. al, *Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection mice*. Antiviral Chemistry Et Chemotherapy, 2008. **19**: p. 7-13.
17. Salomão, K., P.R. Pereira S., L. Campos, and C. Borba, *Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2007. **5**(3): p. 317-324.

18. Kolodziej, H., O. Kayser, and O. Radtke, *Pharmacological profile of extracts of Pelargonium sidoides and their constituents*. Phytomedicine, 2003. **10**: p. 18-24.
19. Theisen L., L. and C. Muller P., *EPs 7630 (Umckaloabo), an extract from Pelargonium sidoides roots, exerts anti-influenza virus activity in vitro and in vivo*. Antiviral Research, 2012. **94**: p. 147-156.
20. Tuan Dao, T., T. Trung Dang, P. Hung Nguyen, and E. Kim, *Xanthones from Polygala karensium inhibit neuraminidases from influenza A viruses*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012. **22**: p. 3688-3692.
21. Pleschka, S., M. Stein, R. Schoop, and J. Hudson, *Actividad de un extracto de equinácea purpúrea frente a los virus de la influenza H1N1, H5N1 y H7N7*. Revista de Fitoterapia, 2009. **9**(2): p. 115-124.
22. Tuan Dao, T., B. Thanh Tung, P. Hung Nguyen, P. Thien Thuong, and S. Sik Yoo, *C-Methylated Flavonoids from Cleistocalyx operculatus and Their Inhibitory Effects on Novel Influenza A (H1N1) Neuraminidase*. Journal of Natural Products, 2010. **73**: p. 1636-1642.
23. Aksenov, D.V., V.V. Kaplun, V.V. Tertov, I.A. Sobenin, and A.N. Orekhov, *Effect of plant extracts on trans-sialidase activity in human blood plasma*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2007. **143**(1): p. 46-50.
24. Hudson, J. and S. Vimalanathan, *Echinacea: A source of potent antivirals for respiratory virus infections*. Pharmaceuticals, 2011. **4**: p. 1019-1031.
25. Heatherley, A., *Healing Plants: A Medicinal Guide to Native North American Plants and Herbs*. 1998, E.U.: Globe Pequot. 288.
26. Lehninger, A., D. Nelson, and M. Cox, *Lehninger: Principios de Bioquímica*. 2009, España: Omega. 1296.
27. Segel, I., *Calculos de bioquímica*. 1982: Acribia. 562.
28. Voet, D., J. Voet, and C. Pratt, *Fundamentos de bioquímica*. Segunda ed. 2007, Madrid, España: Ed. Médica Panamericana. 1260.
29. Copeland, R., *Evaluation of enzyme Inhibitors in drug discovery*. Vol. 46. 2005, New Jersey, E.U.: Wiley- Interscience. 271.
30. Reyes Chilpa, R., M. Jimenez Estrada, and E. Estrada Muñiz, *Antifungal xanthones from Calophyllum brasiliensis heartwood*. Journal of Chemical Ecology, 1997. **23**(7): p. 1901-1911.
31. Martínez Chávez, D.A., *Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina en propóleos mexicanos.*, 2012, UNAM: México. p. 98.
32. Khun, R., P. Lutz, and D. MacDonald, *Synthese anomerer Sialinsäure-methylketoside*. Chemische Berichte, 1966. **99**(2): p. 611-617.
33. Ikeda, K., J. Fukuyo, K. Sato, and M. Sato, *Preparation of 4-pentenol acid ester of Neu5Ac and 4-pentenyl glycoside of Neu5Ac and their application to glycosylation*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2005. **53**(11): p. 1490-1493.
34. Kasai, K., R. Uchida, and N. Yamaji, *Glycosides having chromophores as substrates for sensitive enzyme analysis. IV. Synthesis of N-acetyl-β-D-glucosaminides of fluorescein derivatives and their application to the rate-assay of N-acetyl-β-D-glucosaminidase*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1993. **41**(2): p. 314-318.

# ANEXO 1 CURVAS DE CALIBRACIÓN

## 4-METILUMBELIFERONA

Fueron pesados 0.01444 g de 4-metilumbeliferona (Sigma-Aldrich) los cuales se disolvieron en 820  $\mu\text{L}$  de metanol para obtener un stock de concentración 100 mM.

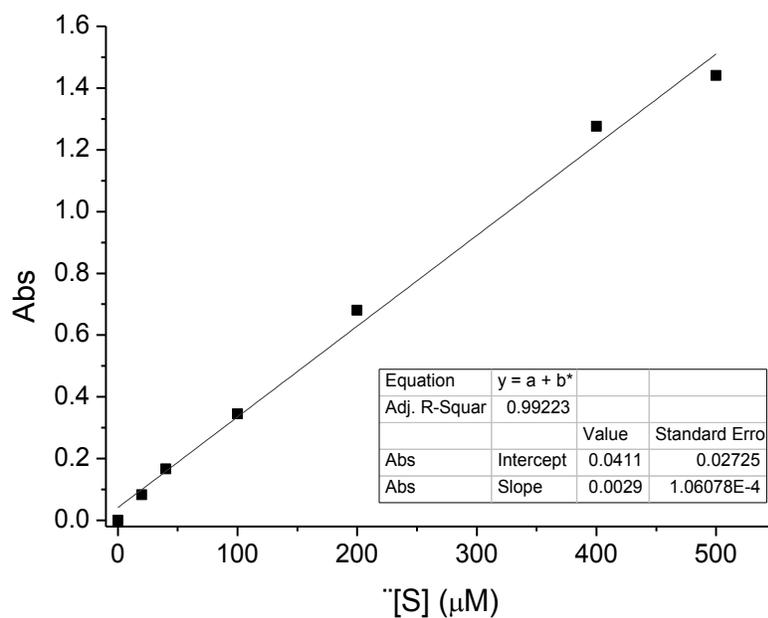
A partir de esta concentración se realizaron las siguientes diluciones:

Dilución	Concentración	Alícuota	Volumen final (en amortiguador de fosfatos pH 7)
1:10	10 mM	100 $\mu\text{L}$ (100 mM)	1000 $\mu\text{L}$
1:5	2 mM	200 $\mu\text{L}$ (20 mM)	1000 $\mu\text{L}$
1:10	0.2 mM	100 $\mu\text{L}$ (2 mM)	1000 $\mu\text{L}$

Las concentraciones a 2 mM y 0.2 mM fueron empleadas como las soluciones de trabajo. Considerando una  $K_m \approx 0.2$  mM se prepararon concentraciones de producto a  $0.1K_m$ ,  $0.2K_m$ ,  $0.5K_m$ ,  $1K_m$ ,  $2K_m$ ,  $2.5K_m$  y  $5K_m$ , las cuales se representan a continuación:

$K_m$	[4-metilumbeliferona]	Stock 0.2 mM	Stock 2 mM	Amortiguador de fosfatos pH 7
0.1	20 $\mu\text{M}$	12 $\mu\text{L}$	---	108 $\mu\text{L}$
0.2	40 $\mu\text{M}$	24 $\mu\text{L}$	---	96 $\mu\text{L}$
0.5	100 $\mu\text{M}$	60 $\mu\text{L}$	---	60 $\mu\text{L}$
1	200 $\mu\text{M}$	---	12 $\mu\text{L}$	108 $\mu\text{L}$
2	400 $\mu\text{M}$		24 $\mu\text{L}$	96 $\mu\text{L}$
2.5	500 $\mu\text{M}$		30 $\mu\text{L}$	90 $\mu\text{L}$
5	1000 $\mu\text{M}$		60 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$

Las absorbancias fueron graficadas en función de la concentración del 4-metilumbeliferona, obteniéndose una recta y su ecuación, de la cual se empleó su coeficiente de absortividad ( $0.002939 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  a pH 7) para determinar las concentraciones de 4-metilumbeliferona formadas en las reacciones enzimáticas que así lo requirieron.



Curva patrón para 4-metilumbeliferona en amortiguador de fosfatos [50 mM] a pH 7, KCl [150] y 0.2% de BSA.

En el caso de los pH's 6, 7 y 9, se emplearon sólo 2 concentraciones, 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$ , que fueron preparados a partir de un stock a 2 mM de metilumbeliferona en amortiguador de fosfatos a su pH respectivo.

Los valores del coeficiente de absorvidad se presentan en la siguiente tabla:

pH	$\epsilon$
6	0.000333 $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
8	0.008567 $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
9	0.01323 $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

#### 4-NITROFENOL

Se tomaron 0.01396 g de 4-nitrofenol (MARCA) los cuales se disolvieron en 1 mL de metanol para obtener un stock de concentración 100 mM.

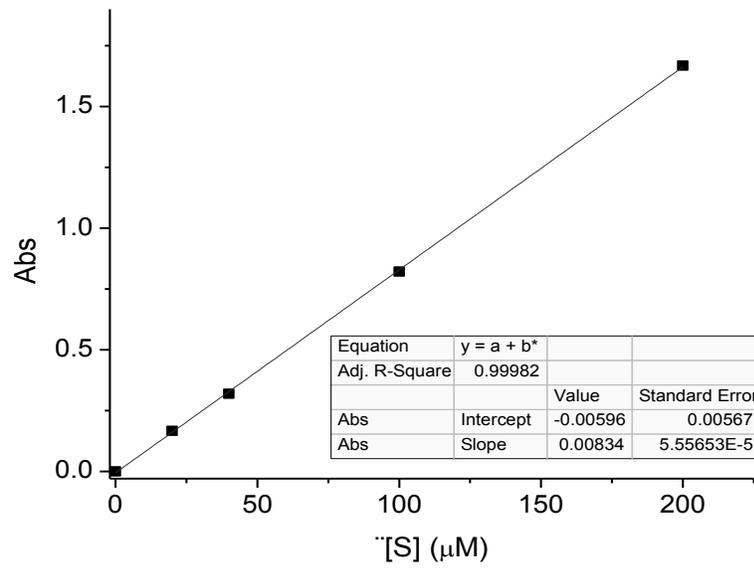
A partir de esta concentración se realizaron las siguientes diluciones:

Dilución	Concentración	Alícuota	Volumen final (en amortiguador de fosfatos pH 7)
1:5	20 mM	100 $\mu$ L (100 mM)	500 $\mu$ L
1:10	2 mM	100 $\mu$ L (20 mM)	1000 $\mu$ L
1:10	0.2 mM	100 $\mu$ L (2 mM)	1000 $\mu$ L

Tomando como stocks de trabajo las diluciones a 2 mM y 0.2 mM, y considerando una  $K_m \approx 0.2$  mM, se trabajaron concentraciones a  $0.1K_m$ ,  $0.2K_m$ ,  $0.5K_m$ ,  $K_m$ ,  $2K_m$ ,  $2.5K_m$  y  $5K_m$ , las cuales se prepararon de la siguiente manera:

$K_m$	[4-nitrofenol]	Stock 0.2 mM	Stock 2 mM	Amortiguador de fosfatos pH 7
0.1	0.02 mM	12 $\mu$ L	---	108 $\mu$ L
0.2	0.04 mM	24 $\mu$ L	---	96 $\mu$ L
0.5	0.1 mM	60 $\mu$ L	---	60 $\mu$ L
1	0.2 mM	---	12 $\mu$ L	108 $\mu$ L
2	0.4 mM		24 $\mu$ L	96 $\mu$ L
2.5	0.5 mM		30 $\mu$ L	90 $\mu$ L
5	1 mM		60 $\mu$ L	60 $\mu$ L

Las absorbancias fueron graficadas en función de la concentración del 4-nitrofenol, obteniéndose una recta y su ecuación, de la cual se empleó su pendiente como el coeficiente de absortividad ( $0.0006938 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  a pH 7) para determinar las concentraciones de 4-nitrofenol formadas en las reacciones enzimáticas que así lo requirieron.



Curva patrón para 4-nitrofenol en amortiguador de fosfatos [50 mM] a pH 7, KCl [150] y 0.2% de BSA.