



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

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE  
FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS SEPARADAS POR  
HPLC DE *Pelargonium sidoides* SOBRE LA ENZIMA  
NEURAMINIDASA DE *Clostridium perfringens***

**TESINA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO**

**PRESENTA:  
SALVADOR ISAAC JURADO QUIROZ**

**ASESOR:  
LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS**



**CIUDAD UIVERSITARIA, Cd. Mx.**

**2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Jurado asignado:**

Presidente: Profesora: Castillo Blum Silvia Elena

Vocal: Profesor: Rodriguez Sotres Rogelio

Secretario: Profesor: Olguín Contreras Luis Fernando

Suplente 1: Profesor: Diaz Flores Luis Alejandro

Suplente 2: Profesor: Morales Flores Félix

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio 326, Biofisiocoquímica, Facultad de Química, UNAM

**Sustentante: Salvador Isaac Jurado Quiroz** \_\_\_\_\_

**Asesor: Luís Fernando Olguín Contreras** \_\_\_\_\_

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del proyecto titulado: "Búsqueda masiva de compuestos antibacterianos producidos por microorganismos no cultivables utilizando una plataforma de microfluídica" (Clave: 284249), por medio del cual recibí una beca para la realización de este trabajo.

Al programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM (Clave: PAIP 5000-9023) para la compra de materiales.

Al doctor Luís Olguín, por su tiempo, los consejos y el tiempo que dedico para ayudarme a resolver los problemas que se presentaban y por todo el apoyo y dedicación para que lograra concluir este proyecto.

A mis padres y hermanos por el apoyo brindado y particularmente a mi madre por la confianza que depositó en mí, por no dejar que me rindiera y por darme el valor y fuerza necesarios para salir adelante en mis momentos más difíciles.

A mis amigos: Xavier, Fernando, Josué, Mariela y Mario, por todos estos años de amistad, experiencias compartidas, consejos y por estar presentes en estos tiempos tan difíciles que trajo la pandemia, por estar ahí para mi a pesar de sus propios problemas, muchas gracias.

## ÍNDICE

1. Introducción .....	8
2. Objetivo General .....	10
2.1. Objetivos Particulares.....	10
3. Hipótesis .....	11
4. Antecedentes .....	12
4.1. Enzimas.....	12
4.2. Influenza.....	12
4.3. Neuraminidasas.....	15
4.4. Neuraminidasa del virus de la influenza.....	16
4.5. Neuraminidasas bacterianas .....	17
4.6. Estructura de las neuraminidasas .....	18
4.7. Mecanismo catalítico de las neuraminidasas.....	20
4.8. Métodos para evaluar de forma cuantitativa la actividad catalítica de las neuraminidasas.....	21
4.9. Ensayos de inhibición de las neuraminidasas e inhibidores conocidos .....	23
4.10. Medicamentos empleados en el tratamiento contra la influenza .....	24
4.11. Compuestos de origen natural con actividad inhibidora de la neuraminidasa. ....	26
4.12. <i>Pelargonium sidoides</i> .....	28
4.13. Antecedentes directos en el grupo de investigación.....	29
5. Procedimiento experimental .....	32
5.1. Disolución del extracto de <i>Pelargonium sidoides</i> .....	32
5.2. Separación cromatográfica del extracto de <i>P. sidoides</i> .....	32
5.3. Preparación de disoluciones para ensayos enzimáticos monitoreados por espectrofotometría.....	33
5.4. Ajuste no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten .....	34
5.5. Ensayos de inhibición enzimática.....	35
6. Resultados .....	36
6.1. Ensayos por espectrofotometría.....	36
6.2. Ajuste no lineal para la determinación de $K_m$ y $V_{max}$ .....	40
6.3. Determinación del cambio en la $v_0$ en función de la temperatura.....	43
6.4. Ensayos enzimáticos empleando un inhibidor conocido de la enzima neuraminidasa.....	44
6.5. Separación cromatográfica del extracto crudo de <i>P. sidoides</i> .....	47

6.6. Pruebas de inhibición con fracciones separadas .....	49
7. Conclusiones.....	55
8. Perspectivas.....	56
9. Referencias bibliográficas. ....	57

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Tasas medias de mortalidad asociadas a la influenza en adultos mayores de 75 años por cada 100 000 habitantes. Tomado de (Iuliano et al., 2018). ....	13
<b>Figura 2.</b> Estructura del virus de la influenza en la cual se observan las proteínas de superficie. En rojo la neuraminidasa, en azul la hemaglutinina, en morado el conducto iónico M2 y en verde la ribonucleoproteína del virus. Tomado de <a href="https://espanol.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm">https://espanol.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm</a> .....	14
<b>Figura 3.</b> Esquema de las tres formas básicas en que se manifiestan los ácidos siálicos. Neu5Ac, ácido N-acetilneuramínico; Neu5Gc, ácido N-glucolilneuramínico; KDN, ácido deaminoneuramínico. Tomado de (Chokhawala et al., 2007) .....	16
<b>Figura 4.</b> Esquema del proceso de infección del virus de la influenza, mostrando la actividad de las enzimas hemaglutinina y neuraminidasa. Modificado de (SciencSourceimages, 2021). ....	17
<b>Figura 5.</b> Plegamiento de proteínas del tipo propulsor beta ( $\beta$ -propeller). Tomado de (McAuley et al., 2019). ....	18
<b>Figura 6.</b> Estructura de un monómero del virus de la influenza. Se pueden apreciar las seis aspas o palas (blade en inglés) que constituyen al monómero. Tomado de (Q. Li et al., 2012). ....	19
<b>Figura 7.</b> Esquema del mecanismo de acción de las sialidasas. Tomado de (Juge et al., 2016). ....	20
<b>Figura 8.</b> Estructuras de los medicamentos empleados contra la influenza. La estructura A corresponde al oseltamivir; B corresponde a peramivir; C corresponde a laninamivir y D corresponde al zanamivir. ....	25
<b>Figura 9.</b> Estructuras de compuestos que presentan actividad inhibitoria frente a la neuraminidasa. 1 oseltamivir; 2 kaempferol; 3 quercitrina; 4 isoquercitrina; 5 hiperósido; 6 rutin y 7 glucósido luteolin-7-flavona. Tomado de (Rakers et al., 2014). ....	27
<b>Figura 10.</b> Estructura de la umckalina. Tomado de Umckalin   Further Reference Substances for HPLC .....	28
<b>Figura 11.</b> Diseño del microchip empleado para formar gotas de agua dispersas en una fase continua de aceite. La purga del HPLC sirve para regular el flujo mayor proveniente del cromatógrafo. Tomado de (Ochoa, 2016). ....	30

<b>Figura 12.</b> Cromatograma del extracto de raíz de <i>P. sidoides</i> a 320 nm en una columna C-18. Fase móvil H <sub>2</sub> O/MeOH 85:15 con un flujo de 0.1 mL min <sup>-1</sup> . Tomado de (Ochoa et al., 2017). .....	31
<b>Figura 13.</b> Reacción de hidrólisis de la 4-MUNANA llevada a cabo por la enzima neuraminidasa, teniendo como producto la 4-MU, molécula sobre la cual se realizó el seguimiento de la reacción. ....	36
<b>Figura 14.</b> Espectros de absorción de la reacción enzimática. El primer barrido (línea roja) corresponde al inicio de la reacción, cuando prácticamente no se tiene producto, mientras que la línea negra corresponde al final del tiempo de análisis (5 minutos) y no al final de la reacción. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y T = 25°C. ....	37
<b>Figura 15.</b> Gráfico del aumento de la absorbancia en función del tiempo para la reacción de hidrólisis de la 4-MUNANA medida a una longitud de onda de 360 nm durante un tiempo de análisis de 90 minutos. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y T = 25°C. ....	38
<b>Figura 16.</b> Datos obtenidos durante los primeros 5 minutos de la reacción de hidrólisis de la 4-MUNANA los cuales representan un avance de aproximadamente el 10% de la reacción. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y T = 25°C. ....	39
<b>Figura 17.</b> Curva de calibración a pH 7.4 para la 4-MU medida a una longitud de onda de 360 nm. Cada punto representa la media de los valores experimentales mientras que las barras de error son sus respectivas desviaciones estándar. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y T = 25°C. ....	40
<b>Figura 18.</b> Ajuste no lineal siguiendo el modelo de Michaelis-Menten para la velocidad inicial $v_0$ de la reacción en función de la concentración de sustrato (4-MUNANA) a un pH de 7.4. Valores obtenidos de $V_{max} = 0.0129 \mu\text{M}/\text{min}$ y $K_M = 54 \mu\text{M}$ . Las concentraciones iniciales de sustrato fueron 16, 40, 80, 100, 160 y 400 $\mu\text{M}$ . Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y T = 25°C. ....	42
<b>Figura 19.</b> Ajuste no lineal de $V_0$ en función de la concentración de sustrato. Valor obtenido de $V_{max} = 0.00929 \mu\text{M}/\text{min}$ y $K_m = 137 \mu\text{M}$ . Las concentraciones iniciales de sustrato fueron 25, 50, 100, 200, 400, 500, 800 y 1000 $\mu\text{M}$ . Condiciones: [MES] = 32 mM, pH 6.5 y T = 25°C. ....	43
<b>Figura 20.</b> Aumento de la velocidad de la reacción enzimática en función de la temperatura. Temperaturas usadas = 15, 20, 25, 30 y 35 °C. Los puntos corresponden a la media de los valores obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar representadas con las barras de error. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y [4-MUNANA] <sub>0</sub> = 60 $\mu\text{M}$ . ....	44
<b>Figura 21.</b> Aumento de la concentración de producto (4-MU) de la reacción enzimática empleando diferentes concentraciones de Remazol para comparar la actividad inhibitoria sobre la enzima neuraminidasa. En orden descendiente: 0, 0.36, 0.1, 1.0, 3.6, 10, 36 $\mu\text{M}$ . Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y [4-MUNANA] <sub>0</sub> = 60 $\mu\text{M}$ . ....	45
<b>Figura 22.</b> Velocidad inicial en función del logaritmo de la concentración de Remazol para la determinación de la IC <sub>50</sub> de este inhibidor. Los puntos graficados corresponden a la media de los valores obtenidos, las barras de error corresponden a sus respectivas desviaciones estándar. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y [4-MUNANA] <sub>0</sub> = 60 $\mu\text{M}$ . ....	46

<b>Figura 23.</b> Diferencia en la fluorescencia entre la reacción enzimática con y sin inhibidor (Remazol). La Figura A representa la reacción sin inhibidor. La figura B corresponde a la reacción con Remazol a una concentración de 0.36 $\mu\text{M}$ , mientras que la Figura C es a una concentración de Remazol de 3.6 $\mu\text{M}$ . Condiciones: $[\text{HEPES}] = 30 \text{ mM}$ , $\text{pH } 7.4$ y $[\text{4-MUNANA}]_0 = 60 \mu\text{M}$ .....	47
<b>Figura 24.</b> Cromatograma de la separación de <i>P. sidoides</i> , usando como método de elución isocrático durante 10 minutos, en el cual, la relación fue de 10% metanol y 90% agua. ..	48
<b>Figura 25.</b> Cromatograma de la fracción 1 (línea negra) y cromatograma de la mezcla del extracto crudo (línea roja). Tiempo de análisis 20 minutos, método de elución; isocrático metanol-agua 1:9.....	49
<b>Figura 26.</b> Aumento de la concentración de 4-MU debido a la hidrólisis de 4-MUNANA catalizada por la enzima neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> , a un pH de 7.4 con solución amortiguadora de HEPES. Los marcadores cuadrados representan la velocidad de la reacción en ausencia de inhibidor, mientras que los marcadores circulares representan la velocidad en presencia de la fracción uno. ....	50
<b>Figura 27.</b> Aumento en la concentración de 4-MU debido a la hidrólisis de 4-MUNANA catalizada por la enzima neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> , a un pH de 7.4 con solución amortiguadora de HEPES. Los marcadores cuadrados representan la velocidad de la reacción en ausencia de inhibidor, mientras que los marcadores circulares representan la velocidad en presencia de la fracción dos.....	51
<b>Figura 28.</b> Aumento en la concentración de 4-MU debido a la hidrólisis de 4-MUNANA catalizada por la enzima neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> , a un pH de 7.4 con solución amortiguadora de HEPES. Los marcadores cuadrados representan la velocidad de la reacción en ausencia de inhibidor, mientras que los marcadores circulares representan la velocidad en presencia de Remazol 1.728 $\mu\text{M}$ .....	52
<b>Figura 29.</b> Comparación de las velocidades de la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA catalizada por la neuraminidasa de <i>C. perfringens</i> en ausencia de inhibidor, así como en presencia de la fracción 1 y 2, y Remazol a una concentración 4.8 $\mu\text{M}$ . Las condiciones de reacción fueron las mismas en los tres casos, siendo estas $[\text{HEPES}] = 30 \text{ mM}$ , $\text{pH } 7.4$ y $[\text{4-MUNANA}]_0 = 60 \mu\text{M}$ .....	53

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Métodos de detección de la actividad catalítica de la neuraminidasa.....	22
<b>Tabla 2.</b> Compuestos y valores de $\text{IC}_{50}$ reportados sobre distintos tipos de virus de influenza. ....	26
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones y volúmenes de las disoluciones empleadas para los ensayos enzimáticos.....	34

## 1.Introducción

El presente documento es resultado de la investigación realizada en el laboratorio de Biofísicoquímica de la Facultad de Química de la UNAM durante la segunda mitad de 2019 e inicios de 2020, hasta que las instalaciones fueron cerradas a causa de la pandemia de COVID-19, razón por la cual el trabajo experimental y los resultados obtenidos hasta ese momento se decidieron reportar a manera de tesis.

El tema central del trabajo es la búsqueda de inhibidores de las neuraminidasas, las cuales son enzimas esenciales en el ciclo de vida del virus de la influenza y de gran importancia en los procesos de infección causados por bacterias patógenas como *Clostridium perfringens* y *Streptococcus pneumoniae*. Los extractos naturales de plantas han sido históricamente una buena fuente de compuestos que presentan actividad biológica contra estas enzimas y en este trabajo se exploró la actividad inhibitoria de dos fracciones cromatográficas obtenidas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), de un extracto de la raíz de *Pelargonium sidoides* sobre la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*.

Para realizar las pruebas, primero se implementó un método espectrofotométrico UV-Vis para medir la velocidad de hidrólisis del ácido 2-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico (4-MUNANA) por parte de la enzima. Así mismo, se evaluó la actividad inhibitoria del compuesto Remazol brilliant blue, un inhibidor conocido de la neuraminidasa, para tener un control positivo.

El resultado más interesante fue que el segundo pico cromatográfico mostró una inhibición moderada y se propone seguir investigando sus propiedades y

componentes en un futuro para determinar que especie química en particular es responsable de su actividad inhibitoria frente a la enzima neuraminidasa.

## 2.Objetivo General

Evaluar la actividad inhibitoria sobre la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* de los picos cromatográficos separados por HPLC de un extracto de la raíz de la planta *Pelargonium sidoides* empleando la técnica de espectrofotometría UV-visible.

### 2.1.Objetivos Particulares

- Montar un ensayo espectrofotométrico UV-vis para evaluar los parámetros cinéticos  $v_0$ ,  $V_{max}$  y  $K_m$  de la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* a dos valores de pH utilizando como sustrato al ácido 2-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico (4-MUNANA).
- Determinar la  $IC_{50}$  del compuesto Remazol *brilliant blue* sobre la enzima neuraminidasa de *C. perfringens* como un control positivo de inhibición.
- Modificar el programa de elución del extracto crudo de la raíz de la planta *Pelargonium sidoides* en el HPLC para separar mejor sus picos cromatográficos.
- Realizar pruebas de inhibición enzimática a fracciones separadas por HPLC de un extracto crudo de la raíz de la planta *Pelargonium sidoides*.

### **3.Hipótesis**

Si se desarrolla un procedimiento estandarizado para medir la actividad de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, siguiendo la formación del producto de la reacción por medio de espectrofotometría UV-vis, entonces podremos obtener resultados con buena repetibilidad lo que nos permitirá identificar de manera confiable si un extracto natural crudo o alguno de sus componentes presenta actividad inhibitoria, así sea moderada, sobre esta reacción enzimática.

Si se modifica el programa de elución en el HPLC, será posible lograr una mejor separación de los picos cromatográficos del extracto crudo de la raíz de la planta *Pelargonium sidoides* y cada uno de estos picos podrá ser evaluado contra su posible actividad inhibitoria de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens*.

## **4. Antecedentes**

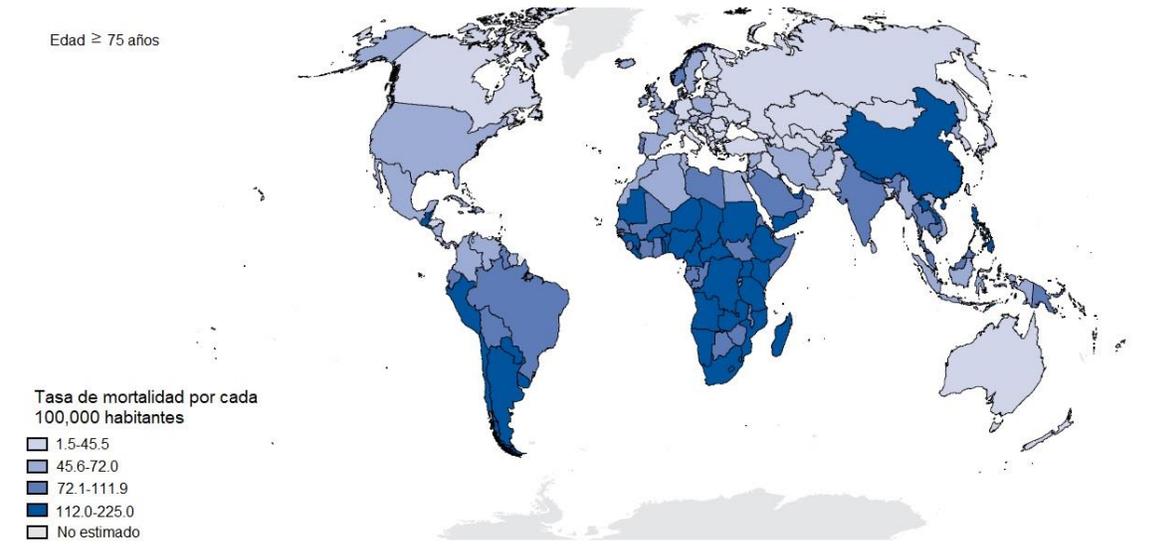
### **4.1. Enzimas**

Las enzimas son proteínas, es decir, son polímeros constituidos por aminoácidos, los cuales se encuentran unidos covalentemente entre sí. Las enzimas son capaces de catalizar una gran cantidad de reacciones químicas en los organismos, sin embargo, para realizar su función catalítica se requiere que se mantenga su estructura tridimensional. Dentro de esta estructura tridimensional se forman cavidades denominadas sitio activo, las cuales muestran afinidad por moléculas específicas llamadas sustratos, que posteriormente se convertirán en productos. Una vez que el sustrato es convertido en producto, éste se libera del sitio activo y la enzima regresa a su estado original, de este modo puede entrar en un nuevo ciclo de catálisis (Ramírez & Ayala, 2014).

### **4.2. Influenza**

La influenza es una infección viral aguda del tracto respiratorio, que afecta a millones de personas cada año (Quosdorf *et al.*, 2017). En grupos de alto riesgo, como lo son niños, ancianos, mujeres embarazadas y fumadores, es más probable que surjan complicaciones debido a la infección por el virus (van Kerkhove *et al.*, 2011). Por el contrario, en grupos de bajo riesgo, las infecciones causadas por la influenza no representan un problema importante, sin embargo, la infección puede causar complicaciones tales como el desarrollo de enfermedades como lo son bronquitis, encefalitis o incluso neumonía bacteriana secundaria, la cual, puede conducir a que los infectados requieran de hospitalización y, en algunos casos, puede llevar a la muerte (Fiore T, Uyeki T, Broder K, 2010).

Las epidemias anuales de influenza resultan en una mortalidad sustancial, especialmente entre adultos mayores de 65 años. Estimaciones previas de la Organización Mundial de la Salud indicaban que anualmente ocurrían entre 250,000 y 500,000 muertes asociadas a la influenza (Iuliano *et al.*, 2018). Sin embargo, nuevos estudios estiman que anualmente ocurren entre 290,000 y 645,000 muertes respiratorias asociadas a la influenza estacional. Las tasas de mortalidad más altas fueron estimadas en África Subsahariana, en el Sudeste Asiático, y entre personas mayores de 75 años (figura 1) (Iuliano *et al.*, 2018).

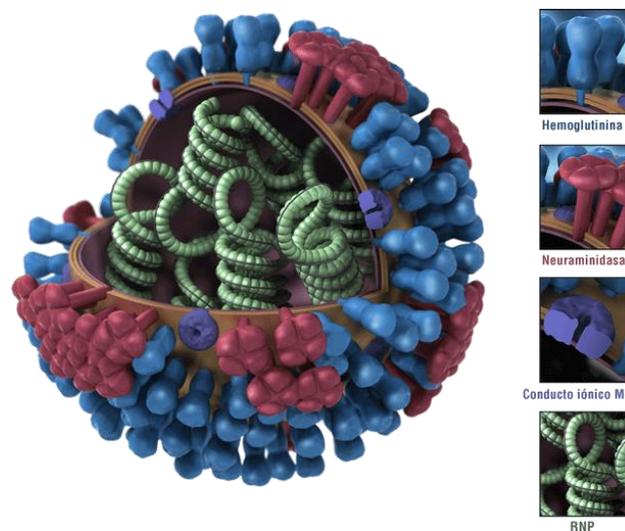


**Figura 1.** Tasas medias de mortalidad asociadas a la influenza en adultos mayores de 75 años por cada 100 000 habitantes. Tomado de (Iuliano *et al.*, 2018).

Existen cuatro tipos de virus de la influenza: A, B, C y D. Los virus A y B de la influenza humana causan una epidemia estacional de la enfermedad casi todos los inviernos. Los virus de influenza A en ocasiones son también responsables de provocar pandemias. A diferencia de los virus A y B, las infecciones causadas por el virus C no causan epidemias de influenza humana, además de que la enfermedad causada es leve. El virus de influenza D es responsable de causar enfermedades

principalmente en el ganado, por lo que se cree que no puede causar infecciones o enfermedades en los seres humanos (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [CDC], 2019).

Los virus de la influenza A se pueden clasificar en distintos tipos de acuerdo con las distintas propiedades antigénicas de las moléculas de hemaglutinina y neuraminidasa, glicoproteínas situadas en la superficie del virus (Russell *et al.*, 2006). Actualmente existen 18 subtipos de hemaglutinina (H1-H18) y 11 subtipos de neuraminidasa (N1-N11). A pesar de que se podrían encontrar 198 combinaciones del subtipo de influenza A, en la naturaleza solo se han detectado 131 subtipos, siendo A(H1N1) y A(H3N2) los subtipos que pueden encontrarse circulando actualmente entre la población (Centros para el control y la Prevención de Enfermedades [CDC], 2019). En la figura 2 se muestra un esquema general de la estructura del virus de la influenza en donde se puede observar la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N) presentes en su superficie.



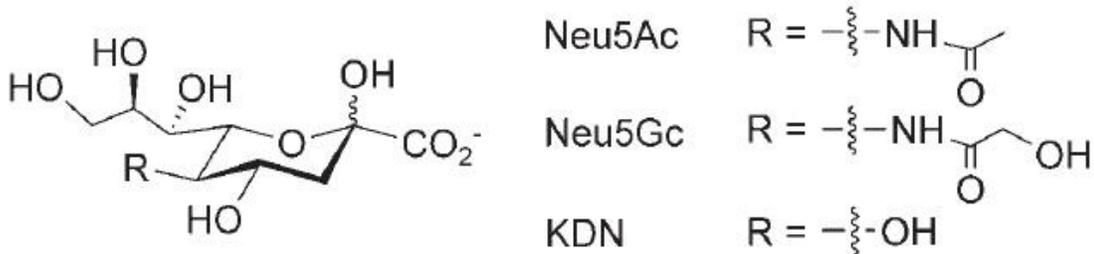
**Figura 2.** Estructura del virus de la influenza en la cual se observan las proteínas de superficie. En rojo la neuraminidasa, en azul la hemaglutinina, en morado el conducto iónico M2 y en verde la ribonucleoproteína del virus. Tomado de <https://espanol.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>

La vacunación es la principal estrategia para combatir la mortalidad causada por la influenza, sin embargo, en algunos casos ésta puede no estar disponible, como puede ser durante el inicio de una pandemia, por lo que los medicamentos antivirales pasan a ser la primera línea de defensa (van der Vries *et al.*, 2012). Sin embargo, la inminente amenaza de pandemias y epidemias en la población humana, aunada a la alarmante aparición de cepas del virus resistente a los medicamentos, hace surgir la necesidad de encontrar nuevos y efectivos medicamentos para combatir la influenza (Quosdorf *et al.*, 2017).

#### **4.3.Neuraminidasas**

Las neuraminidasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los residuos de ácido siálico (también llamado ácido neuramínico) de una variedad de glicoproteínas (Von Itzstein *et al.*, 1993). Los ácidos siálicos son residuos de monosacáridos de una familia de  $\alpha$ -cetoácidos con una cadena de nueve carbonos. Se ha encontrado que son predominantemente, los carbohidratos más externos en las células de los vertebrados o como componentes de la superficie celular en ciertos tipos de bacterias. Se han encontrado más de 50 estructuras de ácido siálico diferentes en la naturaleza, siendo las siguientes, las formas básicas de los ácidos siálicos (Figura 3), Neu5Ac (ácido *N*-acetil neuramínico), Neu5Gc (ácido *N*-glucolil neuramínico), KDN (ácido desamino neuramínico), además de sus derivados acetilados, metilados, lactilados, sulfatados y fosforilados (Chokhawala *et al.*, 2007). Las neuraminidasas en su gran mayoría son exo-sialidasas e hidrolizan específicamente el ácido *N*-acetil neuramínico más externo de las glicoproteínas situadas sobre la

superficie de la célula cuando el ácido siálico se une a una galactosa sobre los enlaces  $\alpha$ -2 $\rightarrow$ 3 ó  $\alpha$ -2 $\rightarrow$ 6 (Matrosovich *et al.*, 2004).



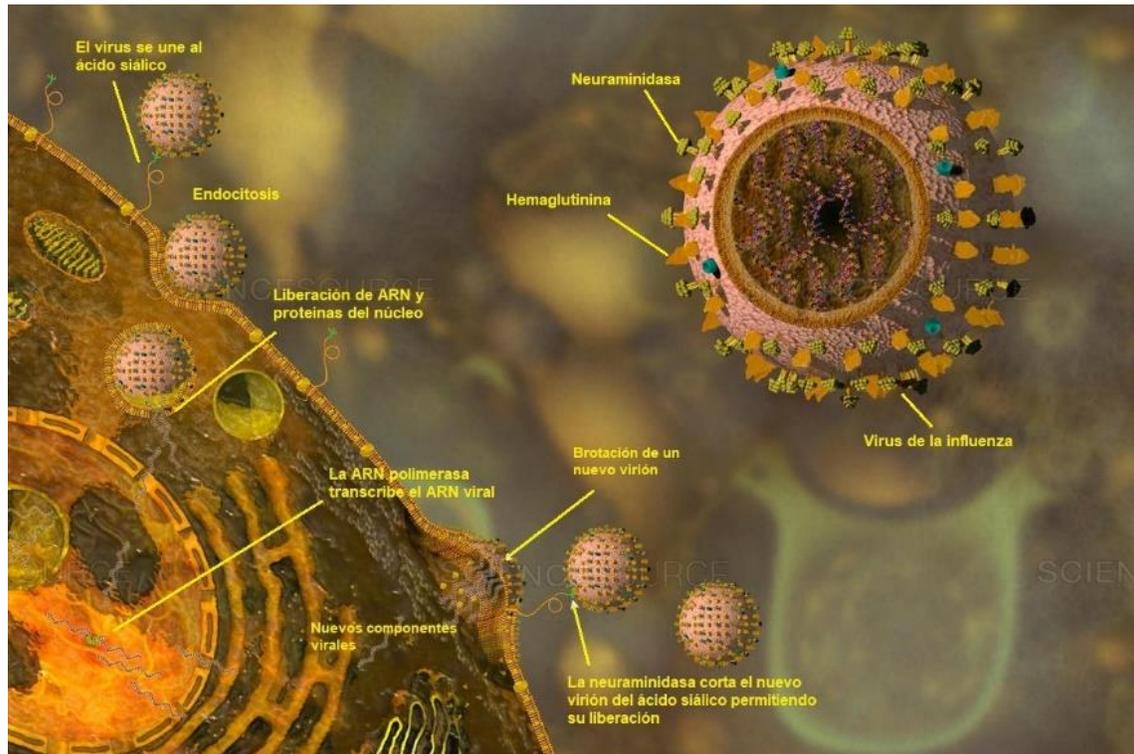
**Figura 3.** Esquema de las tres formas básicas en que se manifiestan los ácidos siálicos. Neu5Ac, ácido N-acetilneuramínico; Neu5Gc, ácido N-glucoilneuramínico; KDN, ácido deaminoneuramínico. Tomado de (Chokhawala *et al.*, 2007).

#### 4.4. Neuraminidasa del virus de la influenza

El virus de la influenza emplea dos enzimas situadas sobre su superficie, la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N). Estas enzimas cumplen un papel clave para iniciar la fusión viral y la posterior liberación de viriones desde la célula infectada (Matrosovich *et al.*, 2004).

Durante el ciclo de infección del virus de la influenza, la H se une a los receptores de ácido siálico de las células objetivo, de esta manera se facilita la entrada del virus en la célula huésped. Por otra parte, la N desempeña un papel clave liberando los viriones de las células infectadas, esto mediante la escisión de los residuos de ácido siálico terminales (figura 4), además, la N ayuda a prevenir la auto agregación de los virus liberados, de esta forma se tiene una replicación viral continua y eficiente (Quosdorf *et al.*, 2017). Recientemente se ha propuesto que la N también ayuda al virus a tener acceso a las células catalizando la ruptura de ácidos siálicos presentes

en las proteínas altamente glicosiladas de las membranas epiteliales (McAuley *et al.*, 2019).



**Figura 4.** Esquema del proceso de infección del virus de la influenza, mostrando la actividad de las enzimas hemaglutinina y neuraminidasa. Modificado de (ScienceSourceimages, 2021).

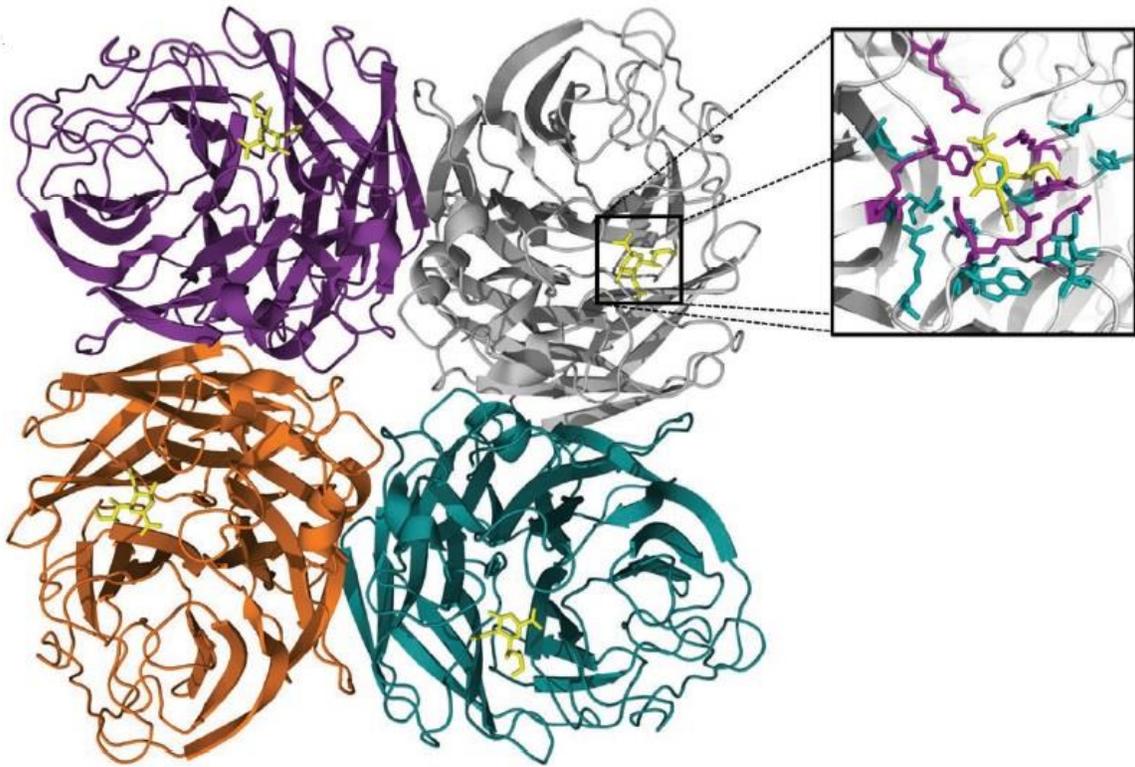
#### 4.5. Neuraminidasas bacterianas

Las neuraminidasas se expresan también en diferentes bacterias, algunos ejemplos de ellas son *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Clostridium perfringens* (Lee *et al.*, 2017). Las neuraminidasas bacterianas, a diferencia de las neuraminidasas virales, realizan su función durante las etapas iniciales de una infección pulmonar, estas enzimas participan también en la formación de biopelículas, las cuales desempeñan un papel importante para el crecimiento y

colonización bacteriana (Soong *et al.*, 2006). Si se toma en cuenta el sinergismo que existe entre el virus de la influenza y los patógenos bacterianos presentes en las enfermedades infecciosas pulmonares, las neuraminidasas bacterianas son también un blanco atractivo para ayudar a prevenir el proceso de la colonización microbiana (Müller *et al.*, 2003).

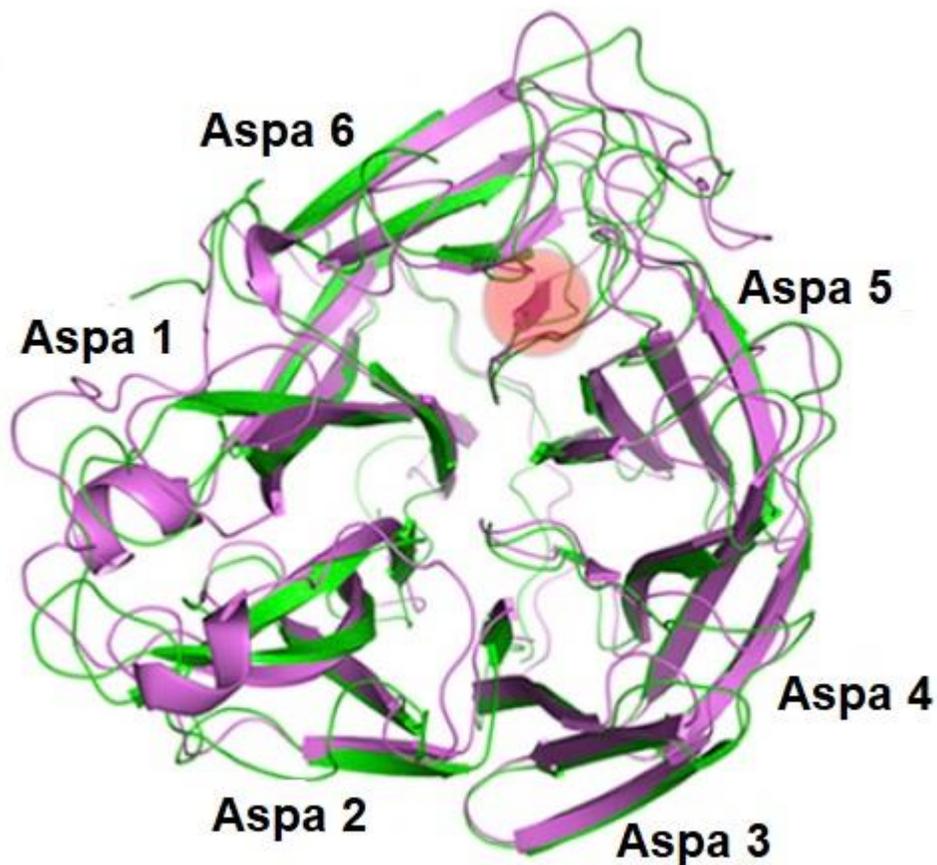
#### 4.6. Estructura de las neuraminidasas

La mayoría de las neuraminidasas que no pertenecen a un virus son proteínas monoméricas, mientras que las neuraminidasas virales son tetrámeros. A pesar de su baja similitud secuencial, todas las sialidasas comparten un plegamiento del tipo propulsor beta ( $\beta$ -propeller), tal como se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Plegamiento de proteínas del tipo propulsor beta ( $\beta$ -propeller). Tomado de (McAuley *et al.*, 2019).

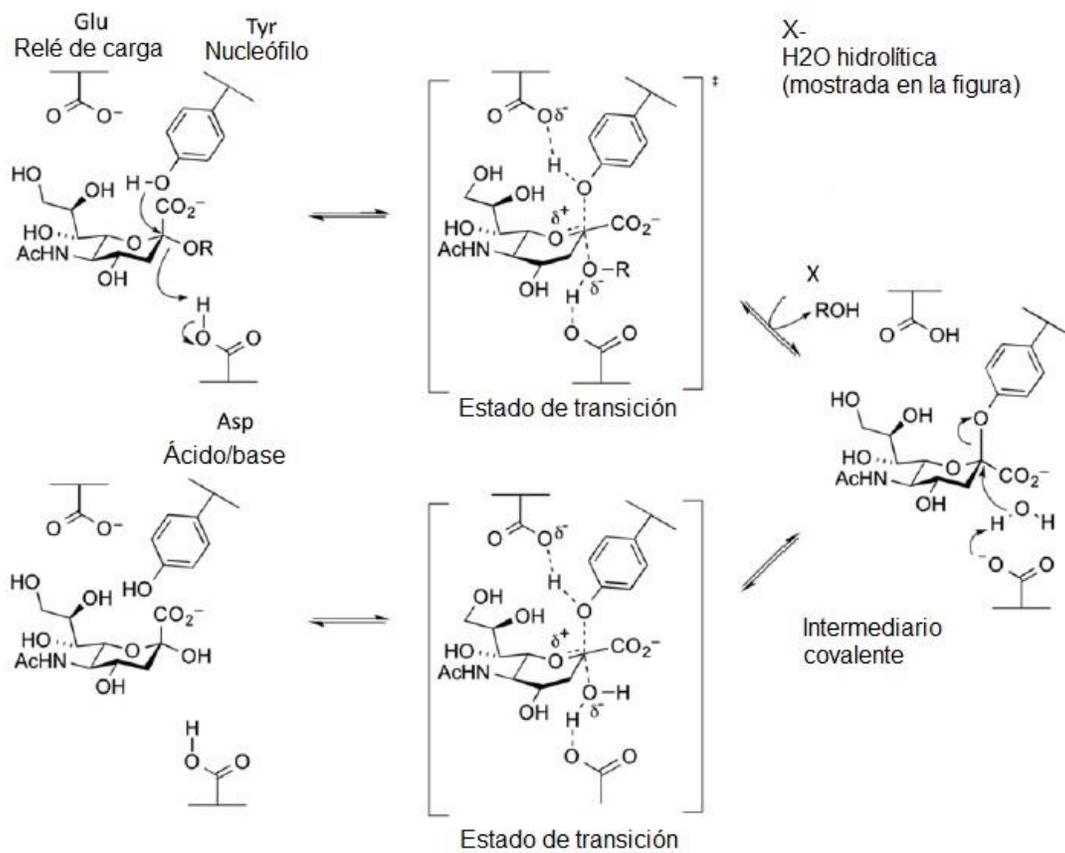
Cada monómero de la neuraminidasa tiene seis aspas o palas (figura 6), y en la superficie de cada uno de los monómeros se encuentra un sitio catalítico funcional, el cual se encuentra orientado hacia los lados, lo que permite la escisión de las glucoproteínas de membrana. En el caso del virus de la influenza, esta función evita que el virus quede anclado a la célula (Kim *et al.*, 2012; Q. Li *et al.*, 2012; McAuley *et al.*, 2019).



**Figura 6.** Estructura de un monómero del virus de la influenza. Se pueden apreciar las seis aspas o palas (blade en inglés) que constituyen al monómero. Tomado de (Q. Li *et al.*, 2012).

#### 4.7. Mecanismo catalítico de las neuraminidasas

Las exo-sialidasas comparten el mismo mecanismo de acción catalítica y tienen en común en su sitio activo los siguientes residuos: Una tirosina que actúa como el catalizador nucleofílico, un ácido glutámico que ayuda a desprotonar a la tirosina, y un ácido aspártico que actúa como catalizador ácido-base (figura 7). (Chan *et al.*, 2012).



**Figura 7.** Esquema del mecanismo de acción de las sialidasas. Tomado de (Juge *et al.*, 2016).

#### **4.8. Métodos para evaluar de forma cuantitativa la actividad catalítica de las neuraminidasas**

Los métodos más comunes para este tipo de ensayos se basan en sustratos no naturales en los que un ácido siálico es glicosilado con un cromóforo, fluoróforo o un compuesto quimioluminiscente que al ser hidrolizado por la enzima libera un compuesto que se puede medir por absorbancia, fluorescencia o luminiscencia (Hřasová *et al.*, 2019; Richter *et al.*, 2015) (ver tabla 1).

<b>Tabla 1. Métodos de detección de la actividad catalítica de la neuraminidasa.</b>			
Métodos directos			
Método/compuesto	Ventajas	Desventajas	Equipo
Absorbancia/pNP-NANA	Barato, ensayos continuos a pH>7	Riesgo de interferencia en la señal debido a inhibidores	Espectrofotómetro UV-vis
Fluorescencia/4-MUNANA	Ensayos continuos a pH>7	Corrección de la señal del sustrato	Fluorómetro
Quimioluminiscencia/NA-STAR	Límite de detección de producto ~10 pM	Costoso. Método discontinuo	Luminómetro
Métodos indirectos			
Modificación química de productos			
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Ensayo con ácido tiobarbitúrico (TBA).</li> </ul>	Accesible, sustratos naturales o glicoconjugados definidos	Métodos discontinuos. Reactivos tóxicos, procedimiento largo y complicado, interferentes en muestras biológicas o con especies reactivas al formaldehído	Espectrofotómetro
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Derivatización con dihidropiridina</li> </ul>			Fluorómetro
Modificación enzimática de productos			
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Ensayo de Alon</li> <li>■ Ensayo de Ziegler</li> </ul>	Accesible, ensayos continuos, sustratos naturales o glicoconjugados definidos	Riesgo de interferencia en la señal debido a inhibidores enzimáticos	Fluorómetro

Los métodos de detección de actividad indirectos se basan en la modificación química o enzimática de uno de los productos de la hidrólisis de la neuraminidasa (ver tabla 1). Por ejemplo, el método de modificación química con ácido tiobarbitúrico (TBA), se basa en la oxidación del ácido siálico con el ión peryodato, seguida de su acoplamiento con TBA para dar un compuesto colorido (Hřasová *et al.*, 2019). Por otro lado, los métodos de modificación enzimática utilizan substratos naturales que, al ser hidrolizados por la neuraminidasa, dejan libre un residuo de galactosa. Este azúcar es enzimáticamente modificado, por ejemplo, con una galactosa oxidasa para producir peróxido de hidrógeno que se puede detectar por fluorescencia con un ensayo acoplado a una peroxidasa (método de Aion, tabla 1)(Hřasová *et al.*, 2019).

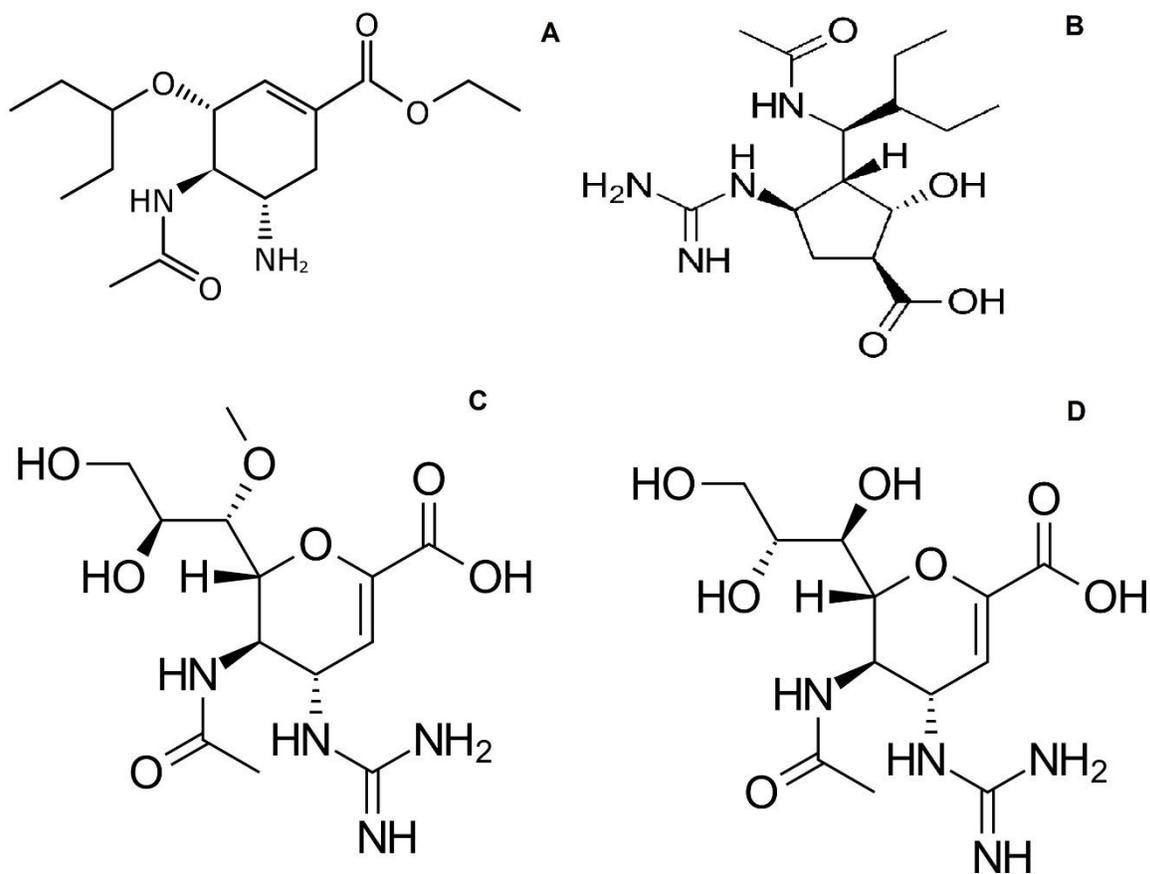
#### **4.9. Ensayos de inhibición de las neuraminidasas e inhibidores conocidos**

Las pruebas para buscar inhibidores de las neuraminidasas pueden funcionar de igual manera tanto en neuraminidasas virales como bacterianas, ya que estas enzimas, independientemente de su origen, suelen ser susceptibles a los inhibidores suministrados. Esto resulta de gran utilidad, ya que permite emplear ensayos basados en neuraminidasas bacterianas, los cuales tienen un costo menor y resultan ser más accesibles para los laboratorios. De esta manera se puede obtener información sobre la identificación de sustancias antivirales derivada de los datos de inhibición de enzimas bacterianas (Quosdorf *et al.*, 2017). Sin embargo, también hay evidencia experimental que demuestra que algunos inhibidores de neuraminidasas virales no muestran actividad contra las sialidasas bacterianas (Richter *et al.*, 2015), por lo que idealmente los ensayos para buscar nuevos

inhibidores deberían de realizarse directamente contra la enzima que se quiere bloquear.

#### **4.10. Medicamentos empleados en el tratamiento contra la influenza**

En la actualidad, los medicamentos para el tratamiento de la influenza se enfocan principalmente en la inhibición de la neuraminidasa, sin embargo, hasta la fecha la Agencia de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*; FDA) de los Estados Unidos ha aprobado pocos inhibidores de esta enzima. Dentro de estos medicamentos se encuentran el oseltamivir y el zanamivir (figura 8), los cuales, fueron aprobados para su distribución a nivel mundial desde 1999. Además, en Japón, China y Corea del Sur se incluyen también el laninamivir y el peramivir (figura 8), los cuales fueron aprobados desde el año 2010 (T. C. M. Li *et al.*, 2015). Estos medicamentos bloquean la replicación del virus en la célula huésped infectada inhibiendo la actividad de la enzima neuraminidasa, evitando la liberación de viriones desde la superficie celular, previniendo así la infección de nuevas células (Montané *et al.*, 2011).



**Figura 8.** Estructuras de los medicamentos empleados contra la influenza. La estructura A corresponde al oseltamivir; B corresponde a peramivir; C corresponde a laninamivir y D corresponde al zanamivir.

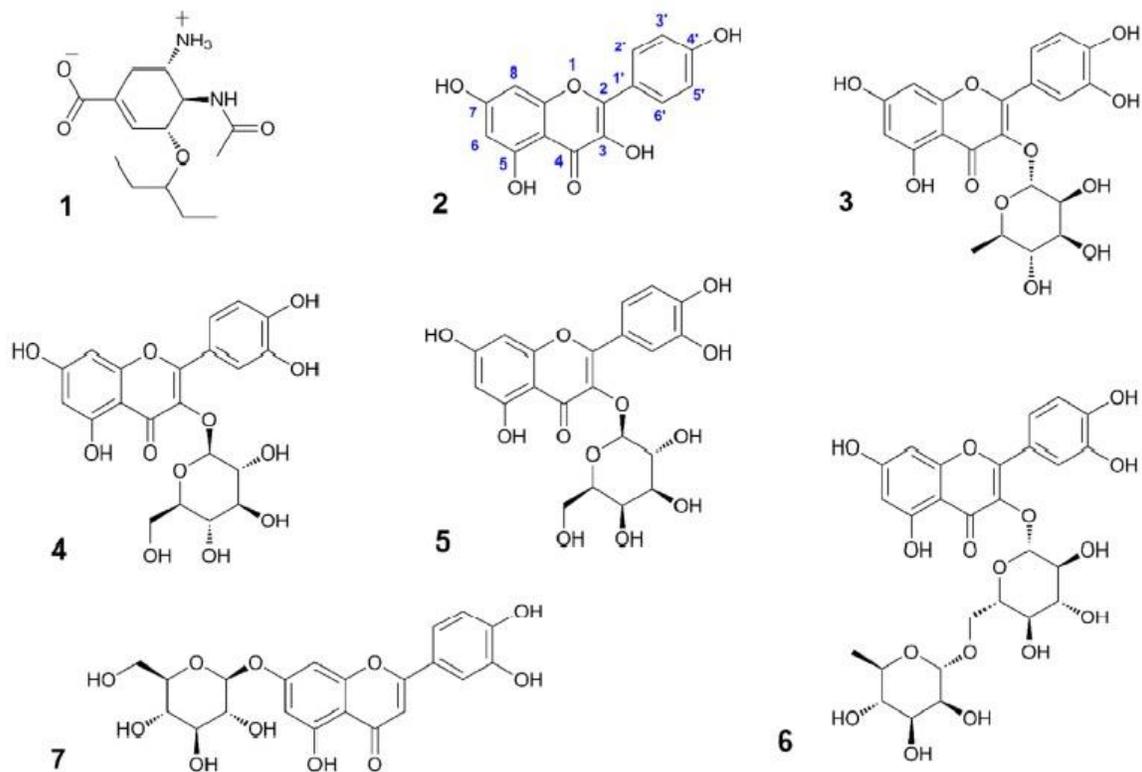
Los inhibidores de la neuraminidasa muestran una actividad de amplio espectro en contra de la influenza tipo A y B (Grienke *et al.*, 2012). La resistencia a este tipo de medicamentos se observaba de manera relativamente rara, esto debido a la función esencialmente catalítica de estas proteínas (Richter *et al.*, 2015), sin embargo, estudios recientes muestran la aparición de cepas del virus resistentes al oseltamivir (Quosdorf *et al.*, 2017).

#### 4.11. Compuestos de origen natural con actividad inhibidora de la neuraminidasa.

El reino vegetal ha sido reconocido como una fuente inestimable de metabolitos para el descubrimiento de fármacos. La naturaleza ofrece una gran cantidad de compuestos biosintetizados que comprenden andamios químicos de alta diversidad los cuales presentan un grupo infinito de entidades químicas para el descubrimiento de fármacos en contra de la influenza (Grienke *et al.*, 2012). Particularmente, varios polifenoles que tienen un amplio espectro de otras actividades biológicas han demostrado poseer actividad inhibidora sobre la neuraminidasa viral. Compuestos como el kaempferol, quercitrina, isoquercitrina, hiperósido, rutin y la glucósido luteolin-7-flavona (ver figura 9), se compararon junto al oseltamivir y demostraron tener una actividad inhibitoria moderada sobre neuraminidasas de diferente origen (A/California/07/09, A/Perth/16/09, B/Brisbane/60/08) (Grienke *et al.*, 2012; Rakers *et al.*, 2014) (Ver tabla 2).

<b>Tabla 2.</b> Compuestos y valores de IC <sub>50</sub> reportados sobre distintos tipos de virus de influenza.			
Compuesto	Virus		
	A/California/07/09	A/Perth/16/09	B/Brisbane/60/08
	Valor de IC <sub>50</sub> (μM)		
Hiperósido	62.5 (3.9)	85.5 (43.6)	88.1 (31.3)
Isoquercitrina	370.2 (22.4)	477.1 (98.5)	384.5 (69.4)
Kaempferol	85.2 (1.1)	42.2 (16.1)	90.8 (64.1)
Luteolin-7-flavona	66.6 (19.7)	51.2 (9.1)	57.2 (25.1)
Quercitrina	109.0 (12.9)	121.2 (53.0)	112.4 (68.2)
Rutin	96.8 (19.3)	95.9 (41.2)	104.9 (60.0)
Oseltamivir	2.57 (1.52) nM	1.39 (1.08) nM	45.39 (20.41) nM

Los resultados se expresan como la media con su desviación estándar en paréntesis.

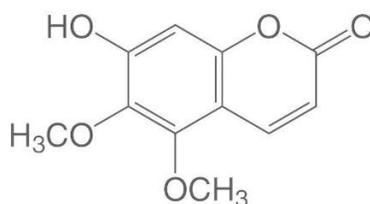


**Figura 9.** Estructuras de compuestos que presentan actividad inhibitoria frente a la neuramindasa. 1 oseltamivir; 2 kaempferol; 3 quercitrina; 4 isoquercitrina; 5 hiperósido; 6 rutin y 7 glucósido luteolin-7-flavona. Tomado de (Rakers et al., 2014).

Se ha sugerido que las hierbas medicinales podrían ser beneficiosas en la prevención o el tratamiento de la influenza estacional o pandémica (Bahramsoltani et al., 2016). Investigaciones previas han reportado las actividades inhibitoras de plantas medicinales sobre la replicación de varios virus, incluyendo el virus de la influenza.

#### 4.12. *Pelargonium sidoides*

El *P. sidoides* es una planta originaria del sur de África, la cual, ha sido empleada ampliamente como medicina tradicional en esta misma región. Tradicionalmente, esta planta era empleada para el tratamiento de algunos malestares gastrointestinales, sin embargo, su uso se ha extendido para aliviar algunas enfermedades del tracto respiratorio, tales como asma, bronquitis aguda y sinusitis, además de ser empleada también en el alivio de la fiebre (Moyo & Van Staden, 2014; Theisen & Muller, 2012). Los extractos se obtienen particularmente de las raíces de la planta y contienen una gran variedad de sustancias químicas, dentro de las que se encuentran benzopiranos altamente sustituidas, siendo la umckalina la de mayor importancia y más común en esta especie de planta (figura 10) (Hudaib *et al.*, 2010). El amplio uso de *P. sidoides* dentro de la medicina tradicional, aunado a la popularización que ha tenido en los sistemas médicos actuales en Europa, ha provocado un aumento en la investigación para identificar sus principios activos (Moyo & Van Staden, 2014).



**Figura 10.** Estructura de la umckalina. Tomado de [Umckalin | Further Reference Substances for HPLC](#)

En el año 2005 la agencia reguladora de medicamentos de Alemania otorgó la autorización para la comercialización de un extracto etanólico de la raíz del *P. sidoides*, para tratar principalmente bronquitis aguda y ha demostrado tener una

buena tolerabilidad en múltiples ensayos clínicos tanto en adultos como en niños (Theisen & Muller, 2012).

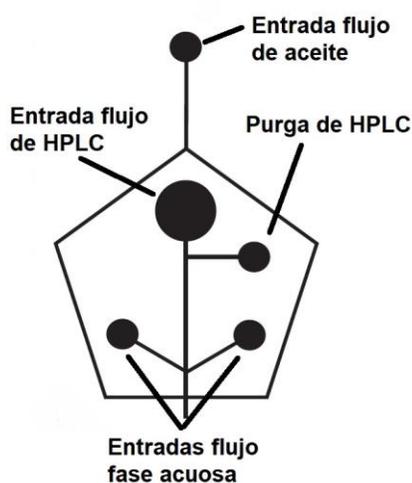
#### **4.13. Antecedentes directos en el grupo de investigación.**

En el laboratorio en que se desarrolló la presente investigación se han realizado distintos trabajos para evaluar la actividad biológica de extractos naturales contra la neuraminidasa de *C. perfringens*. Utilizando ensayos espectrofotométricos, se encontró que el extracto de *P. sidoides* e infusiones de hierbabuena, jamaica y limón, tienen valores de IC<sub>50</sub> de 0.28 mg/mL, 2.22 mg/mL, 4.29 mg/mL y 13.18 mg/mL respectivamente. Para comparar la acción inhibitoria de estos extractos, se realizó un control positivo con el fármaco zanamivir, un inhibidor conocido de la neuraminidasa, y con el que se tuvo un valor de IC<sub>50</sub> de 1.72 mg/mL (Álvarez, 2013). Adicionalmente se evaluaron extractos de miel comercial, propóleos y una mezcla de xantonas, sin embargo, estos compuestos solo presentaron una inhibición menor al 25% a concentraciones mayores (Álvarez, 2013).

Otra manera en la que se ha evaluado la actividad de extractos naturales en nuestro grupo de trabajo es mediante microfluídica basada en microgotas. En esta técnica cada una de las gotas formadas dentro de los dispositivos de microfluídica, funciona como un reactor en miniatura de aproximadamente 1 nL. Además, al tener un gran número de éstas (> 1,000), se puede tener un elevado número de ensayos (Ochoa, 2016).

Estos ensayos son montados en un chip de microfluídica, que tiene un diseño con un pentágono por el cual se introducen una fase acuosa y una fase orgánica. La

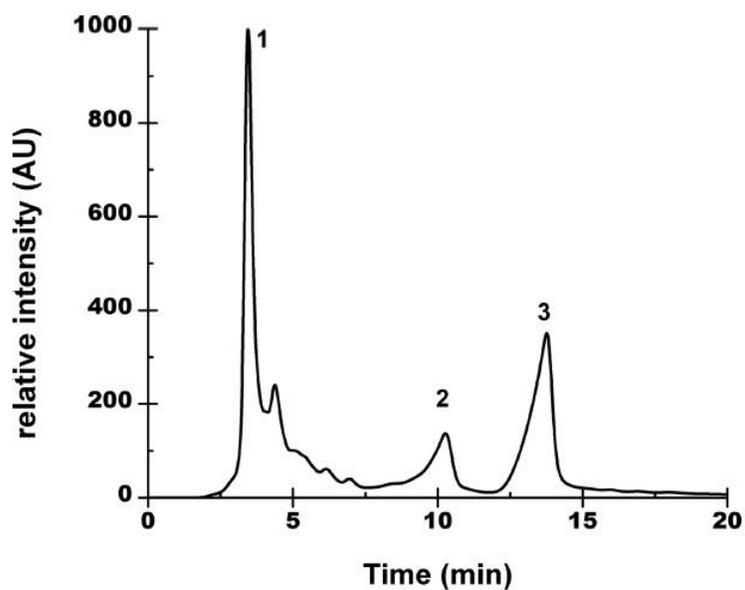
fase acuosa está compuesta por tres flujos, uno de enzima, uno de sustrato y uno proveniente de un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La fase orgánica está compuesta de aceite mineral con 2% m/m de Span 80. El chip está diseñado de forma que el flujo de fase orgánica intersece por dos flancos al flujo de fase acuosa, provocando la formación de microgotas de agua dispersas en una fase continua de aceite (figura 11) (Ochoa, 2016).



**Figura 11.** Diseño del microchip empleado para formar gotas de agua dispersas en una fase continua de aceite. La purga del HPLC sirve para regular el flujo mayor proveniente del cromatógrafo. Tomado de (Ochoa, 2016).

Este tipo de dispositivos al ser acoplado a un equipo de HPLC permite evaluar la actividad de los compuestos presentes en extractos naturales conforme a su separación cromatográfica directamente sobre la reacción enzimática, ya que en el chip los compuestos eluidos se mezclan con la enzima y un sustrato fluorogénico que permite seguir la reacción enzimática y de esta manera permite conocer que pico cromatográfico presenta una mayor actividad. Utilizando esta metodología y empleando una composición de fase móvil H<sub>2</sub>O/MeOH 85:15, el extracto de

*P. sidoides* se logró separar en tres picos cromatográficos predominantes (figura 12), determinando que el primero de ellos mostró una actividad inhibitoria en el ensayo en microgotas (Ochoa, 2016; Ochoa *et al.*, 2017).



**Figura 12.** Cromatograma del extracto de raíz de *P. sidoides* a 320 nm en una columna C-18. Fase móvil H<sub>2</sub>O/MeOH 85:15 con un flujo de 0.1 mL min<sup>-1</sup>. Tomado de (Ochoa *et al.*, 2017).

## **5.Procedimiento experimental**

La enzima neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, Remazol Brilliant blue, 4-metilumbeliferona (4-MU), ácido 2-etanosulfónico (MES) así como el ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-etanosulfónico (HEPES) se adquirieron de Sigma Aldrich. El sustrato utilizado fue el ácido 2-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico (4-MUNANA) fue adquirido de Cayman Chemical.

La disolución de *Pelargonium sidoides* se obtuvo a partir de un extracto comercializado como Umckaloabo® (Farmasa-Schwabe).

### **5.1.Disolución del extracto de *Pelargonium sidoides***

Para elaborar la disolución del extracto crudo de *P. sidoides* se utilizó un concentrado obtenido a partir de tabletas Umkaloabo® las cuales contienen un extracto etanólico de la raíz de dicha planta. Dicho concentrado se encontraba en forma de resina, la cual resultó ser muy soluble en agua. Se pesó una masa de 0.0230 g de extracto y se disolvieron en 2 mL de agua desionizada, la concentración de esta disolución fue de 0.0115 g/mL. Esta disolución fue filtrada con un filtro de tamaño de poro 0.20  $\mu$ m para eliminar cualquier sólido que pudiera quedar contenido en la disolución.

### **5.2.Separación cromatográfica del extracto de *P. sidoides***

De la disolución del punto anterior se inyectó un volumen de 20  $\mu$ L a un cromatógrafo Shimadzu CBM-20A equipado con una columna Raptor ARC-18 de 50 x 2.1 mm con tamaño de partícula de 2.7  $\mu$ m marca Restek, para realizar una separación de los distintos grupos de componentes que constituyen el extracto.

Para la separación se empleó un método de elución isocrático durante 10 minutos a un flujo de 0.15 mL/min en el que la composición de la fase móvil fue de 10% metanol, 90% agua. A partir del minuto 10 se aumentó la concentración de metanol hasta llegar al 100% de metanol en 1.0 min y se mantuvo así durante 15 minutos más para lavar la columna desplazando a las moléculas que son más afines a ella. Una vez concluido el tiempo establecido, se regresaba a la composición de fase móvil inicial.

El detector empleado fue de absorbancia, medida a 320 nm. Con este método de elución se lograron separar los primeros seis picos cromatográficos más polares de la mezcla.

### **5.3.Preparación de disoluciones para ensayos enzimáticos monitoreados por espectrofotometría**

Se preparó una disolución amortiguadora de ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-etanosulfónico (HEPES) 30 mM, pH 7.4, con la cual se prepararon las disoluciones de enzima (neuraminidasa de *Clostridium perfringens*) de concentración 0.4 U/mL y de sustrato el ácido 2-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuramínico (4-MUNANA) a una concentración de 720  $\mu$ M.

Para llevar a cabo los ensayos espectrofotométricos se adicionó, a una celda de cuarzo de volumen reducido, la disolución de amortiguador seguida de agua o inhibidor y la disolución de enzima, se dejó incubar durante 5 minutos dentro de un espectrofotómetro Varian Cary bio-50, a una temperatura de 30°C. Transcurrido ese tiempo se agregó la disolución de sustrato y se agitó ligeramente para

homogenizarla. Se colocó la celda dentro del espectrofotómetro nuevamente para monitorear el avance de la reacción, haciendo un barrido cada 0.3 minutos de 450 a 250 nm en incrementos de 5 nm. El tiempo de análisis fue de 10 minutos. Una vez concluido el tiempo de análisis se midió el aumento de absorbancia medido a una longitud de onda de 360 nm, y se determinó la rapidez a la cual aumenta la concentración del producto 4-metilumbeliferona (4-MU).

En la tabla 3 se muestran los volúmenes y concentraciones de las disoluciones empleadas en los ensayos enzimáticos.

<b>Tabla 3.</b> Concentraciones y volúmenes de las disoluciones empleadas para los ensayos enzimáticos.		
Disolución	Vol. Disolución (μL)	Conc. en mezcla
Neuraminidasa <i>C. perfringens</i> (0.4 U/mL)	10	0.033 U/mL
Sustrato 4-MUNANA (720 μM)	10	60 μM
Amortiguador Hepes (30 mM, pH 7.4)	75	
H <sub>2</sub> O desionizada o disolución de inhibidor	25	
Volumen total	120	

#### **5.4. Ajuste no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten**

Para determinar los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  de la enzima neuraminidasa, se midió la velocidad inicial de la reacción enzimática en función de la concentración inicial de sustrato. Posteriormente, se realizó un ajuste no lineal a los datos empleando el software Origin 8.0

### **5.5. Ensayos de inhibición enzimática**

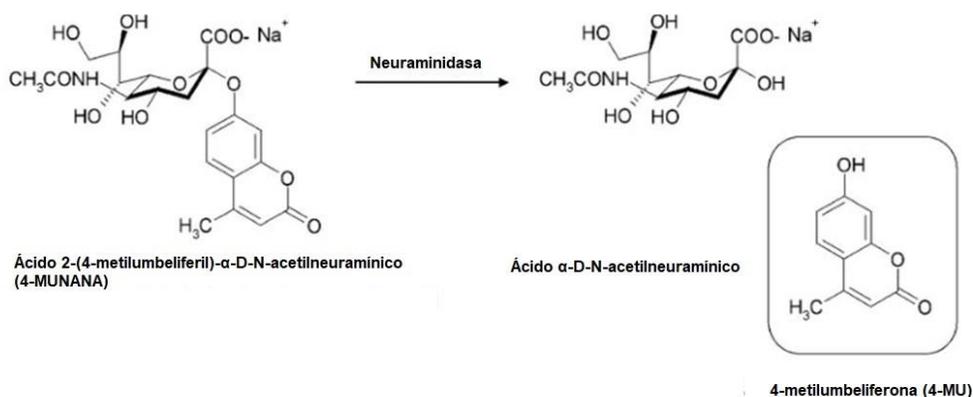
Para los ensayos de inhibición enzimática, la concentración inicial de sustrato se fijó en 60  $\mu\text{M}$ , el cual corresponde a un valor cercano a la  $K_m$  (54  $\mu\text{M}$ ), obtenido del ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten (1).

Los ensayos enzimáticos de inhibición se monitorearon por espectrofotometría, tal como se describió para los ensayos enzimáticos.

## 6.Resultados

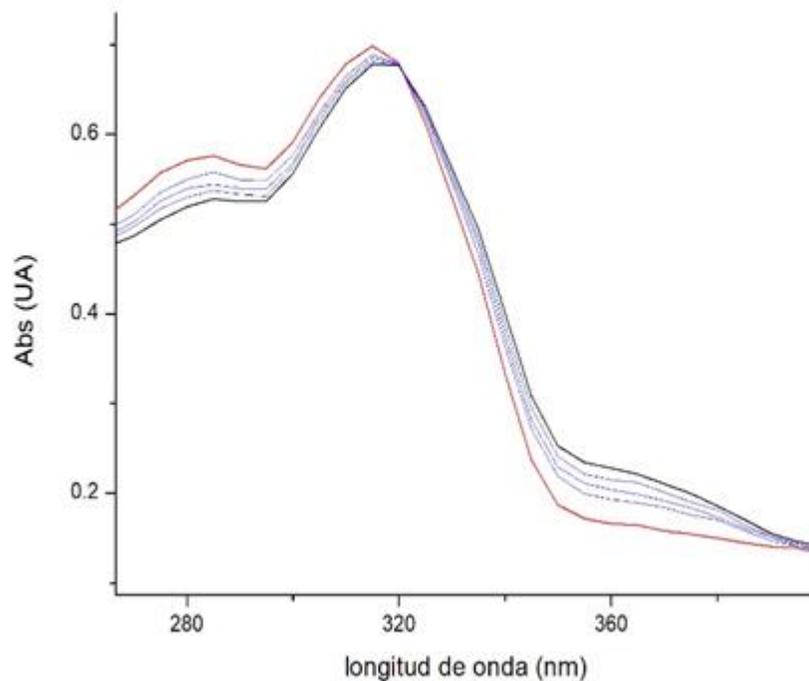
### 6.1.Ensayos por espectrofotetría

Haciendo uso de la espectrofotetría UV-visible se monitoreó la reacción enzimática de la hidrólisis del sustrato 4-MUNANA llevada a cabo por la enzima neuraminidasa de *C. perfringens*. En la figura 13 se muestra un esquema general de la reacción en la cual, el producto de la reacción es la 4-metilumbeliferona (4-MU).



**Figura 13.** Reacción de hidrólisis de la 4-MUNANA llevada a cabo por la enzima neuraminidasa, teniendo como producto la 4-MU, molécula sobre la cual se realizó el seguimiento de la reacción.

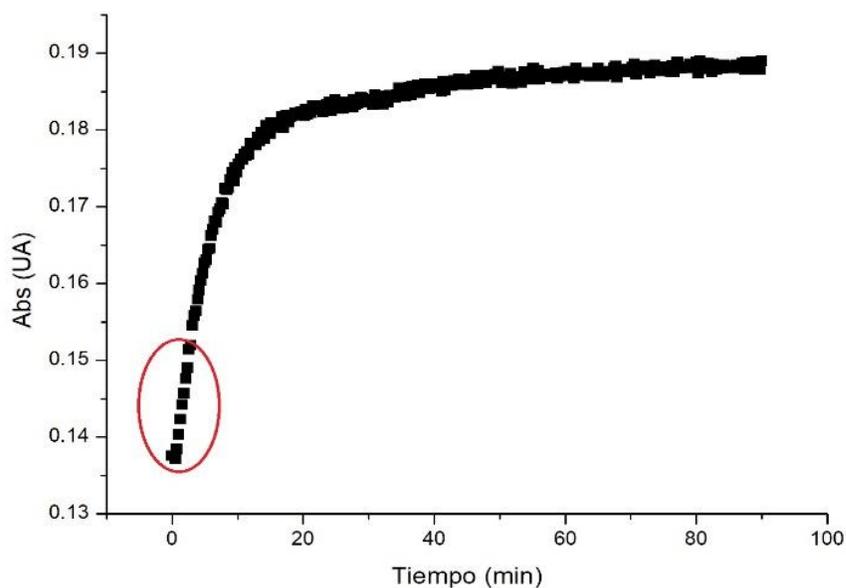
Esto se logró realizando barridos de absorbancia en función de la longitud de onda con aumentos de 5 nm en un intervalo de 450 a 250 nm realizados cada 20 segundos con un tiempo total de análisis de 5 minutos, de este modo se obtenían espectros como el que se muestra en la figura 14.



**Figura 14.** Espectros de absorción de la reacción enzimática. El primer barrido (línea roja) corresponde al inicio de la reacción, cuando prácticamente no se tiene producto, mientras que la línea negra corresponde al final del tiempo de análisis (5 minutos) y no al final de la reacción. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y  $T = 25^{\circ}\text{C}$ .

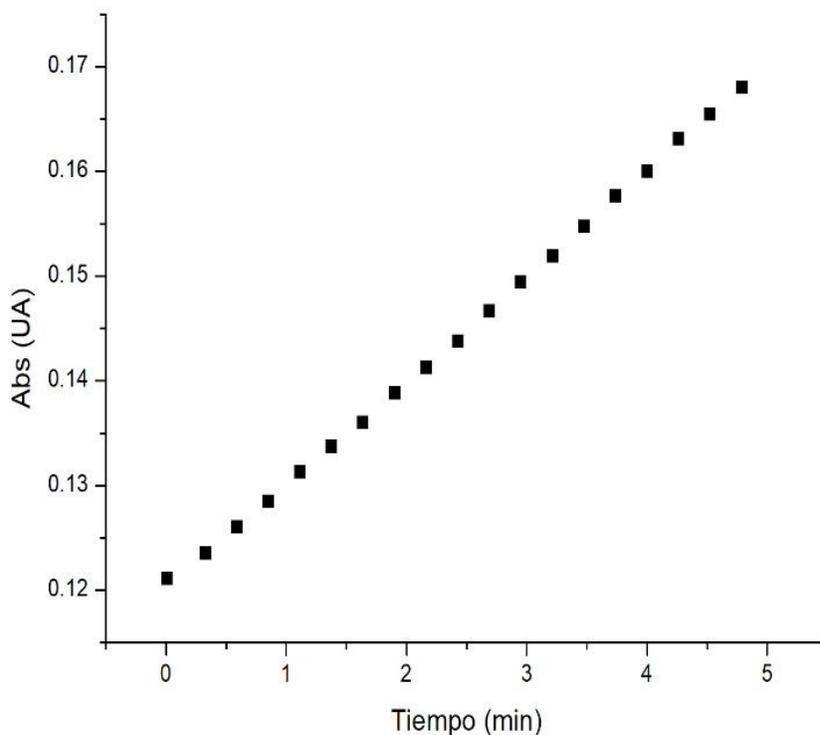
Al agrupar todos los barridos en una sola gráfica, se puede observar que, al aumentar la concentración del producto de la reacción (4-MU), en el intervalo de 550 a 324 nm hay un aumento en la absorbancia, mientras que, en el intervalo de 324 a 250 nm se tiene una disminución de la misma. Esta información nos revela la presencia de un punto isobéptico alrededor de los 324 nm. Este punto nos permite verificar que el aumento en la absorbancia es debido a una reacción química y no a un fenómeno físico como la evaporación de la mezcla, situación en la que se vería un aumento en todas las longitudes de onda y la ausencia del punto isobéptico. En todo el intervalo de longitudes de onda en que se realizó el análisis se encontró que el mayor cambio en la absorbancia se daba a 360 nm por lo que se eligió esa

longitud de onda para determinar la velocidad inicial de la reacción. Con los datos obtenidos a 360 nm se realizaron gráficos del aumento de la absorbancia en función del tiempo, tal como se muestra en la figura 15.



**Figura 15.** Gráfico del aumento de la absorbancia en función del tiempo para la reacción de hidrólisis de la 4-MUNANA medida a una longitud de onda de 360 nm durante un tiempo de análisis de 90 minutos. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y  $T = 25^{\circ}\text{C}$ .

Dado que para determinar la velocidad inicial de la reacción se requiere la información obtenida durante los primeros minutos de la reacción correspondientes a menos del 15% del avance de la reacción, no se emplearon todos los datos obtenidos, por lo que se usaron únicamente los datos marcados dentro del óvalo rojo. Debido a que estos datos presentan un comportamiento lineal (figura 16), se puede realizar un ajuste lineal por mínimos cuadrados para determinar la velocidad inicial de la reacción.

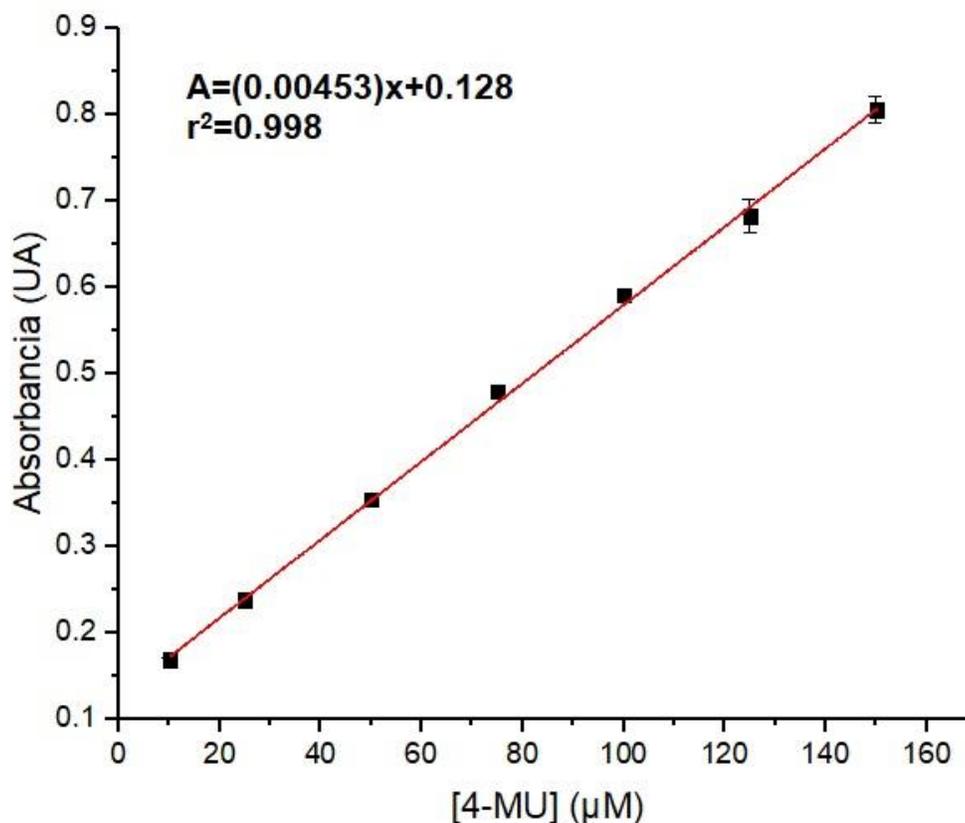


**Figura 16.** Datos obtenidos durante los primeros 5 minutos de la reacción de hidrólisis de la 4-MUNANA los cuales representan un avance de aproximadamente el 10% de la reacción. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y T = 25°C.

Para la determinación de la velocidad inicial es necesario conocer la concentración del producto formado, por lo que se realizó una curva de calibración de la 4-MU utilizando el mismo amortiguador a un pH de 7.4.

Los datos obtenidos de absorbancia se graficaron en función de la concentración de 4-MU, tal como se muestra en la figura 17. A estos datos se les realizó un ajuste lineal por mínimos cuadrados y, a partir de la ecuación de la recta obtenida se determinó que el coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) fue de  $0.00453 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Haciendo uso de la Ley de Lambert-Beer, la cual relaciona a la absorbancia con la

concentración, se determinó la cantidad de 4-MU formada en la reacción de hidrólisis para cada uno de los valores de absorbancia obtenidos.



**Figura 17.** Curva de calibración a pH 7.4 para la 4-MU medida a una longitud de onda de 360 nm. Cada punto representa la media de los valores experimentales mientras que las barras de error son sus respectivas desviaciones estándar. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y T = 25°C.

## 6.2. Ajuste no lineal para la determinación de $K_m$ y $V_{max}$

Para determinar la concentración a la cual se empleó la disolución de sustrato en los ensayos de inhibición, se realizó un ajuste no lineal, variando la concentración inicial de sustrato en cada ensayo. El resto de los volúmenes y concentraciones se mantienen de acuerdo con la tabla 3.

La velocidad inicial se determinó para cada reacción a un pH de 7.4 y estos valores se graficaron en función de la concentración de sustrato. A este conjunto de datos se les realizó un ajuste no lineal siguiendo el modelo de Michaelis-Menten (figura 18) para obtener los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ . Este modelo puede describirse mediante la siguiente ecuación:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

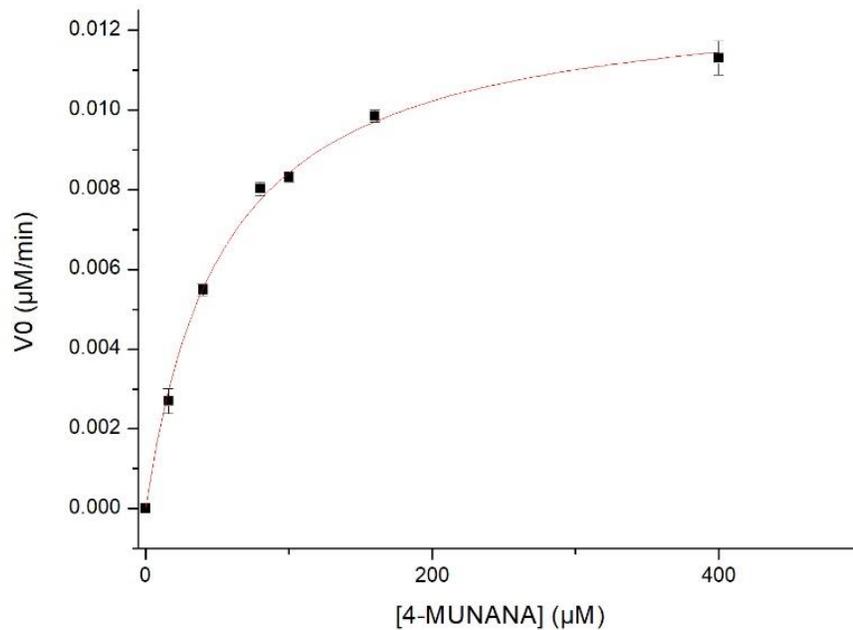
En donde:

$v_0 =$  *velocidad inicial*

$V_{max} =$  *velocidad máxima*

$[S] =$  *concentración de sustrato*

$K_m =$  *constante de Michaelis*



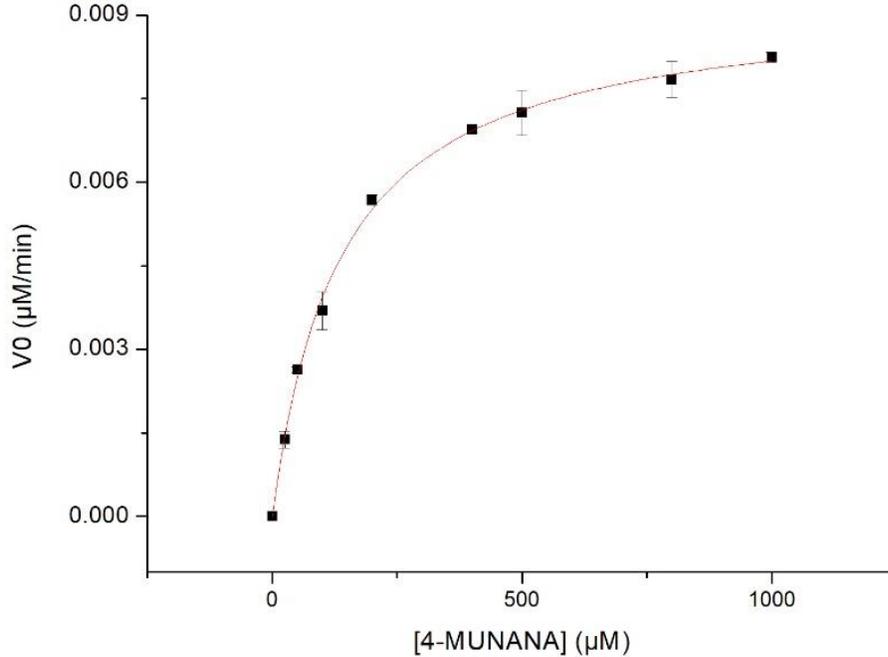
**Figura 18.** Ajuste no lineal siguiendo el modelo de Michaelis-Menten para la velocidad inicial  $v_0$  de la reacción en función de la concentración de sustrato (4-MUNANA) a un pH de 7.4. Valores obtenidos de  $V_{max} = 0.0129 \mu\text{M}/\text{min}$  y  $K_M = 54 \mu\text{M}$ . Las concentraciones iniciales de sustrato fueron 16, 40, 80, 100, 160 y 400  $\mu\text{M}$ . Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y  $T = 25^\circ\text{C}$ .

El procedimiento descrito en los pasos anteriores se llevó a cabo también a un pH de 6.5 para comparar las variaciones que se tienen en la  $V_{max}$  y la  $K_m$  cambiando el pH.

Para estimar la concentración de 4-MU formada, se determinó el coeficiente de absortividad molar a un pH de 6.5 haciendo uso de una curva de calibración.

Después de medir la velocidad inicial a pH 6.5 usando las concentraciones iniciales de sustrato indicadas en el pie de la figura 19, se realizó un ajuste no lineal para obtener los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$ .

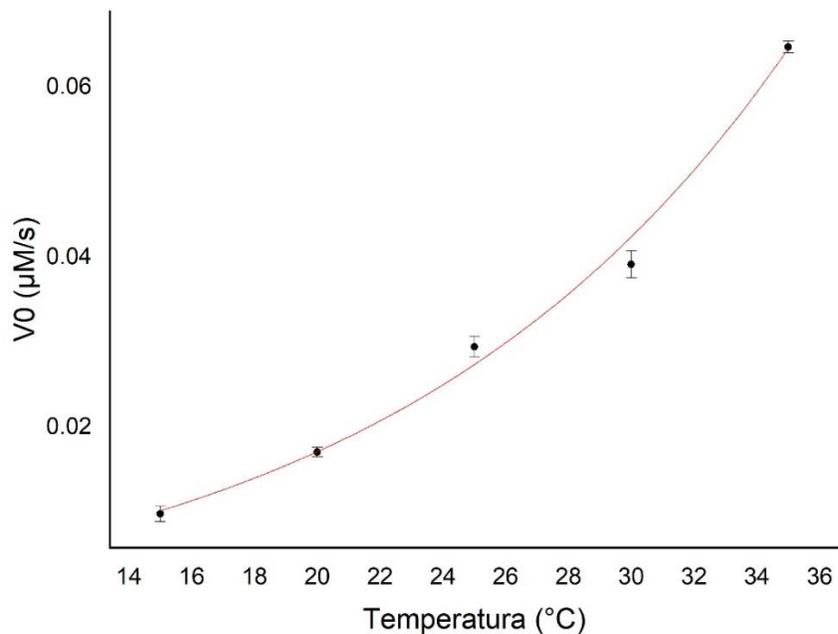
Siendo estos valores de 0.00929 ( $\mu\text{M}/\text{min}$ ) y 137 ( $\mu\text{M}$ ) respectivamente.



**Figura 19.** Ajuste no lineal de  $V_0$  en función de la concentración de sustrato. Valor obtenido de  $V_{max} = 0.00929 \mu\text{M}/\text{min}$  y  $K_m = 137 \mu\text{M}$ . Las concentraciones iniciales de sustrato fueron 25, 50, 100, 200, 400, 500, 800 y 1000  $\mu\text{M}$ . Condiciones:  $[\text{MES}] = 32 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 6.5$  y  $T = 25^\circ\text{C}$ .

### 6.3. Determinación del cambio en la $v_0$ en función de la temperatura

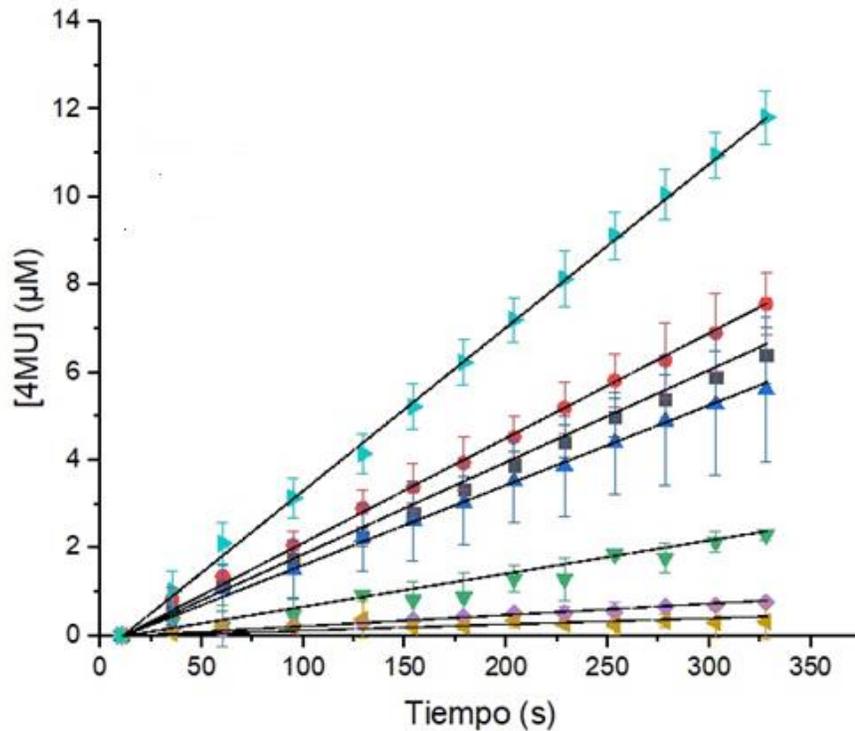
Se realizaron también ensayos enzimáticos a un pH de 7.4 variando la temperatura entre 15 y 35 °C como se muestra en la figura 20, en la que se nota el aumento no lineal de la  $v_0$  al incrementar la temperatura.



**Figura 20.** Aumento de la velocidad de la reacción enzimática en función de la temperatura. Temperaturas usadas = 15, 20, 25, 30 y 35 °C. Los puntos corresponden a la media de los valores obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar representadas con las barras de error. Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y [4-MUNANA]<sub>0</sub> = 60 µM.

#### 6.4. Ensayos enzimáticos empleando un inhibidor conocido de la enzima neuraminidasa

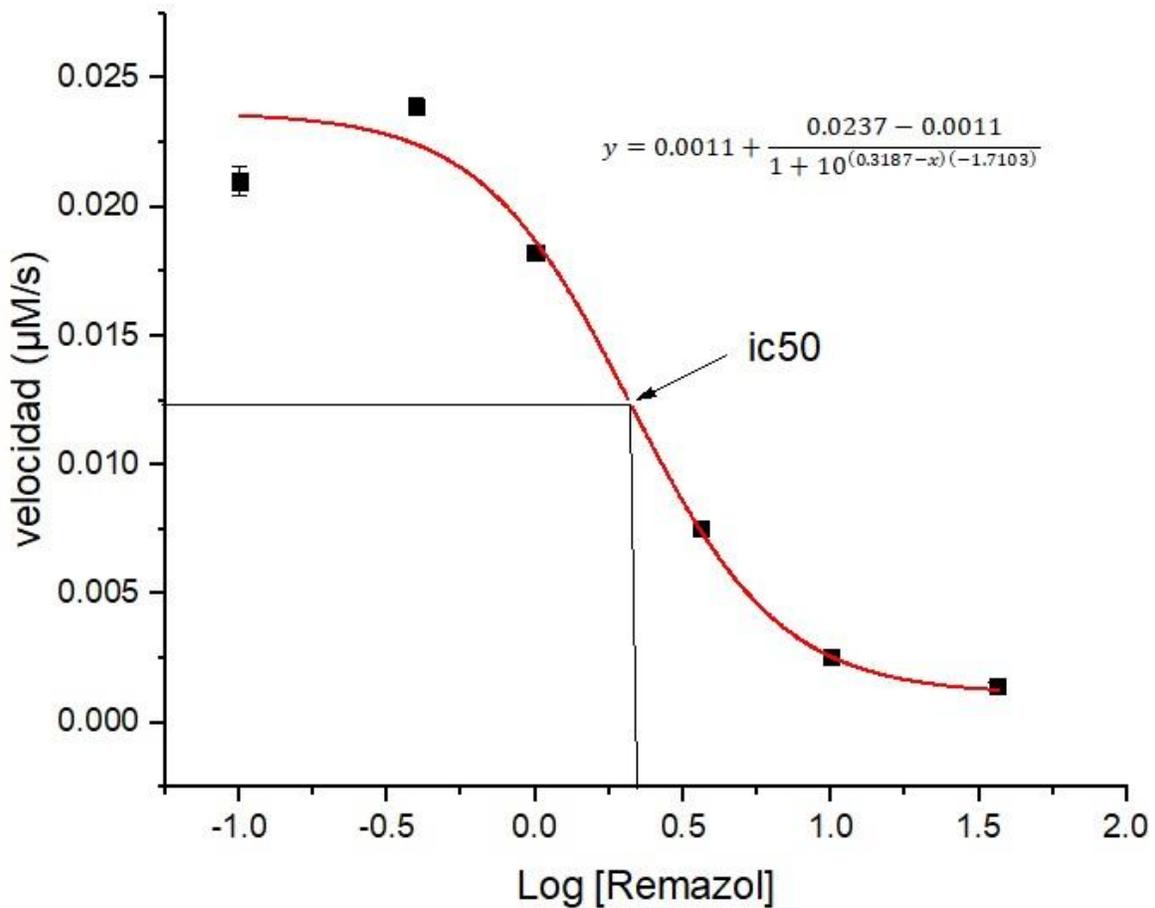
Se realizaron pruebas de inhibición sobre la actividad de la enzima neuraminidasa empleando el compuesto químico Remazol el cual, se ha reportado, tiene actividad inhibidora sobre esta enzima (Richter *et al.*, 2015). Para la realización de estos ensayos se emplearon distintas concentraciones de Remazol. Se graficó el aumento de la concentración de producto (4-MU) en función del tiempo (figura 21) para cada uno de los ensayos para poder ser comparados cuantitativamente.



**Figura 21.** Aumento de la concentración de producto (4-MU) de la reacción enzimática empleando diferentes concentraciones de Remazol para comparar la actividad inhibitoria sobre la enzima neuraminidasa. En orden descendiente: 0, 0.36, 0.1, 1.0, 3.6, 10, 36  $\mu\text{M}$ . Condiciones: [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y [4-MUNANA]<sub>0</sub> = 60  $\mu\text{M}$ .

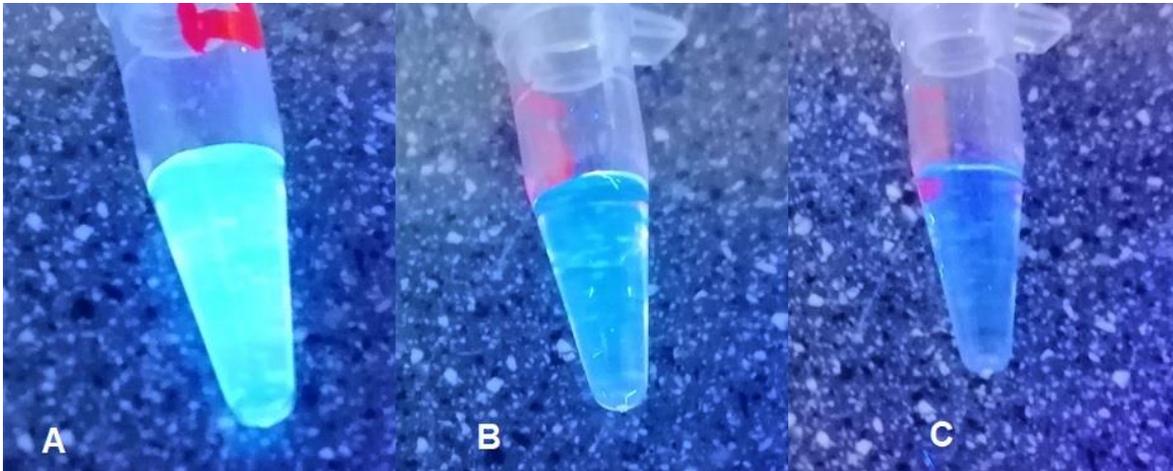
En la figura 21 se observa que, a medida que aumenta la concentración de Remazol, disminuye la concentración de 4-MU para un tiempo de reacción igual para todos los ensayos.

Al realizar un ajuste lineal a los datos obtenidos en la figura anterior, se tomó el valor de la pendiente asociada a la ecuación de la recta para cada reacción, la cual representa el valor de  $V_0$  de cada reacción expresada en  $\mu\text{M/s}$ . En la figura 22 se muestran estos valores de velocidad inicial graficados en función del logaritmo de la concentración de Remazol. Al realizar un ajuste no lineal se obtuvo el valor de la  $\text{IC}_{50}$  para el Remazol, la cual resultó ser de 2.08  $\mu\text{M}$ .



**Figura 22.** Velocidad inicial en función del logaritmo de la concentración de Remazol para la determinación de la  $\text{IC}_{50}$  de este inhibidor. Los puntos graficados corresponden a la media de los valores obtenidos, las barras de error corresponden a sus respectivas desviaciones estándar. Condiciones:  $[\text{HEPES}] = 30 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.4$  y  $[4\text{-MUNANA}]_0 = 60 \mu\text{M}$ .

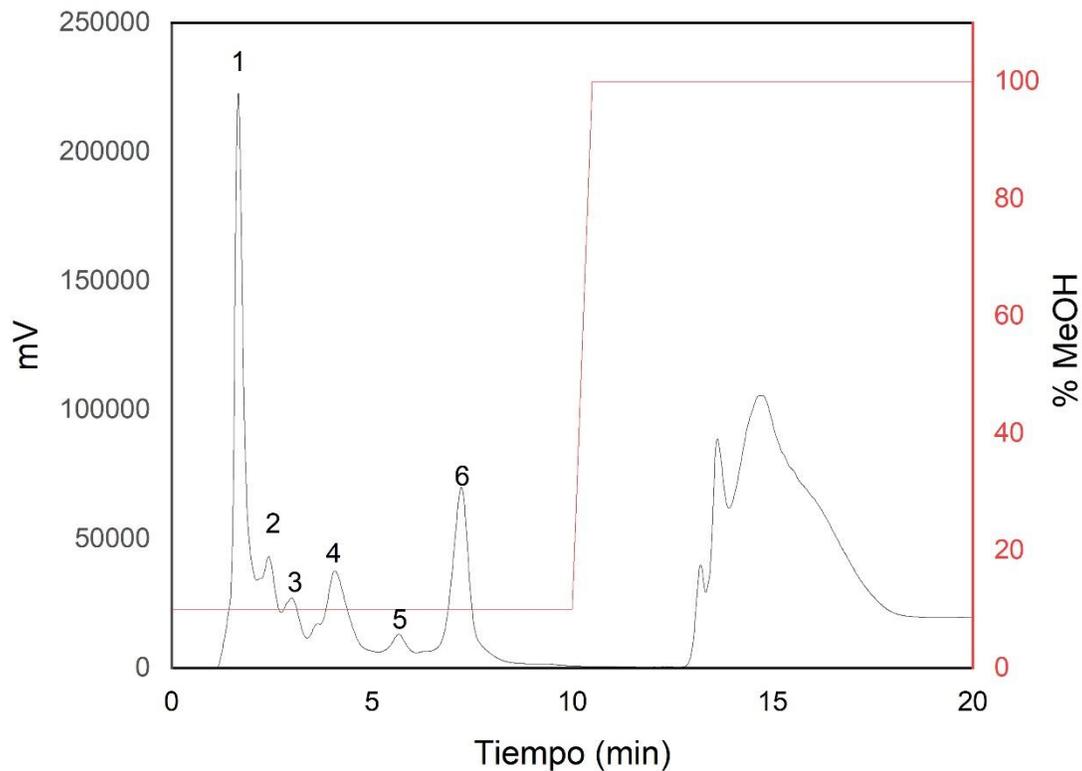
De manera cualitativa, también se observó una disminución sobre la actividad de la neuraminidasa en presencia de Remazol. Esto se hizo incidiendo luz ultravioleta al producto de la reacción después de 15 minutos de haber sido iniciada la reacción. En la figura 23 se muestra, de izquierda a derecha, una disminución en la fluorescencia, esto es debido a que la velocidad de la reacción se ve disminuida, por lo que a un mismo tiempo de reacción se tiene una menor cantidad del producto, el cual es fluorescente.



**Figura 23.** Diferencia en la fluorescencia entre la reacción enzimática con y sin inhibidor (Remazol). La Figura A representa la reacción sin inhibidor. La figura B corresponde a la reacción con Remazol a una concentración de  $0.36 \mu\text{M}$ , mientras que la Figura C es a una concentración de Remazol de  $3.6 \mu\text{M}$ . Condiciones:  $[\text{HEPES}] = 30 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.4$  y  $[\text{4-MUNANA}]_0 = 60 \mu\text{M}$ .

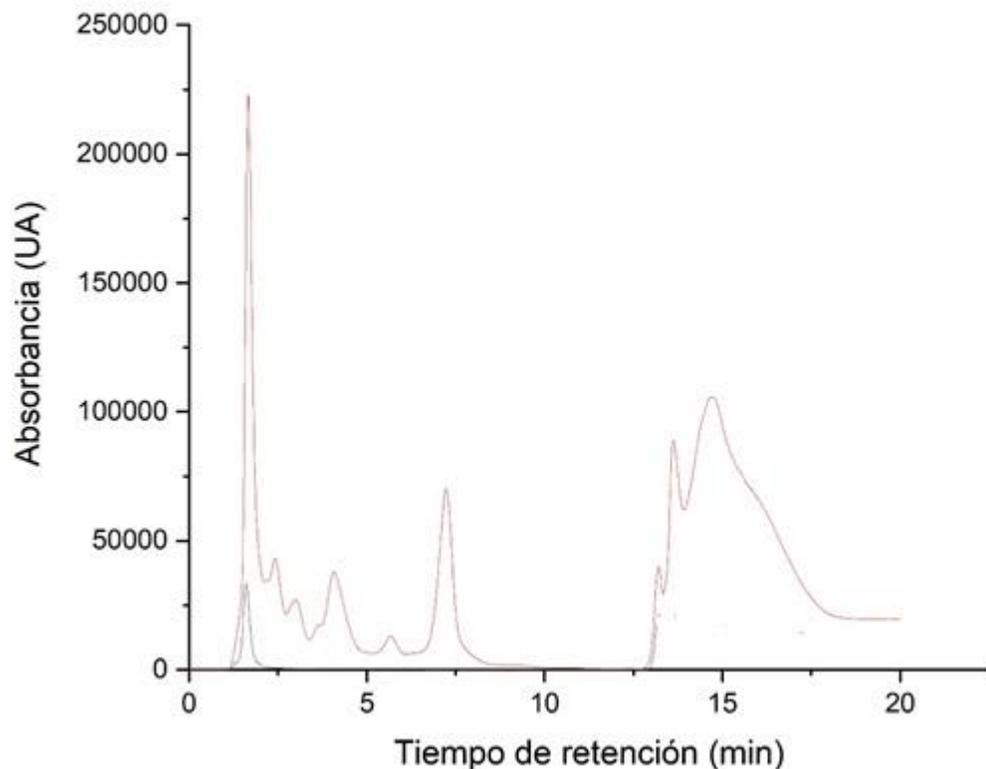
### 6.5. Separación cromatográfica del extracto crudo de *P. sidoides*

El programa de elución para el extracto de *P. sidoides* por HPLC se modificó ligeramente al que se había reportado en nuestro grupo, reduciendo el % de metanol de 15 a 10%. De esta manera se obtuvieron 6 fracciones distintas. En la figura 24 se muestra el cromatograma obtenido de la separación, señalando los picos obtenidos.



**Figura 24.** Cromatograma de la separación de *P. sidoides*, usando como método de elución isocrático durante 10 minutos, en el cual, la relación fue de 10% metanol y 90% agua.

Cada una de estas fracciones se colectó por separado para su posterior evaluación como inhibidores de neuraminidasa. La fracción 1 fue reinyectada en el cromatógrafo con la finalidad de verificar si la separación se había llevado a cabo de manera adecuada. En la figura 25 se presenta el cromatograma obtenido de la fracción 1, se observa que el tiempo de retención al cual se presenta el pico cromatográfico es muy similar al observado en la figura 24, además, no se presenta ningún otro pico de los que se presentan cuando se tiene un método de elución isocrático, por lo que se puede confirmar que la fracción no está mezclada con otra.

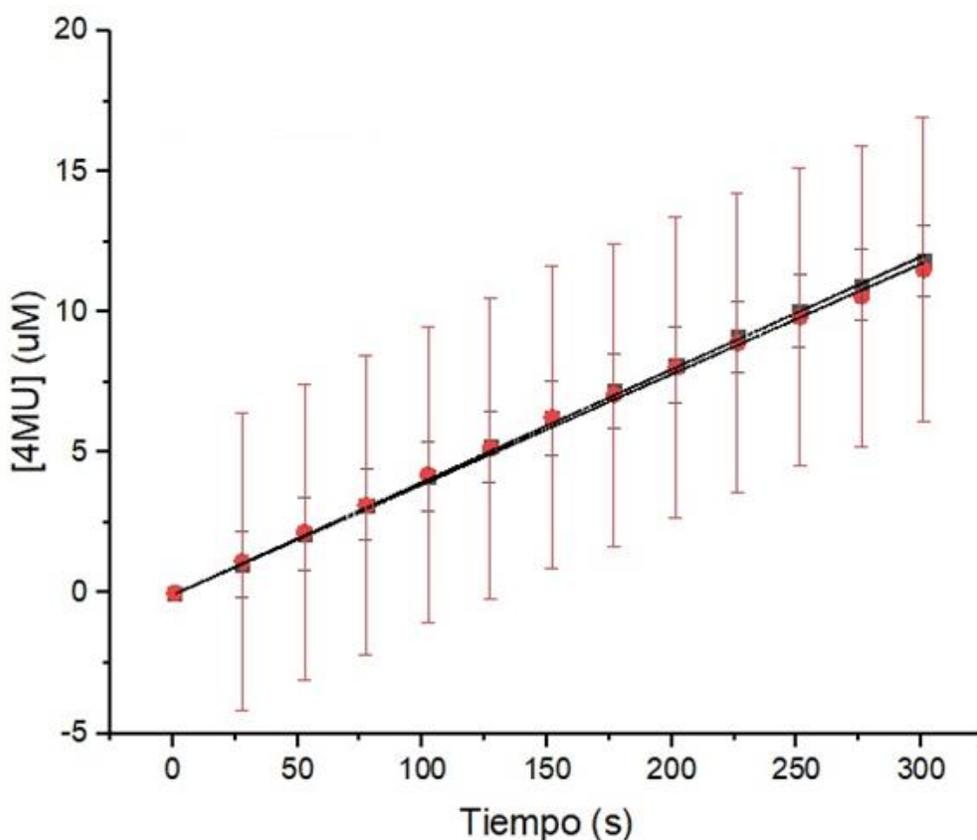


**Figura 25.** Cromatograma de la fracción 1 (línea negra) y cromatograma de la mezcla del extracto crudo (línea roja). Tiempo de análisis 20 minutos, método de elución; isocrático metanol-agua 1:9.

## 6.6. Pruebas de inhibición con fracciones separadas

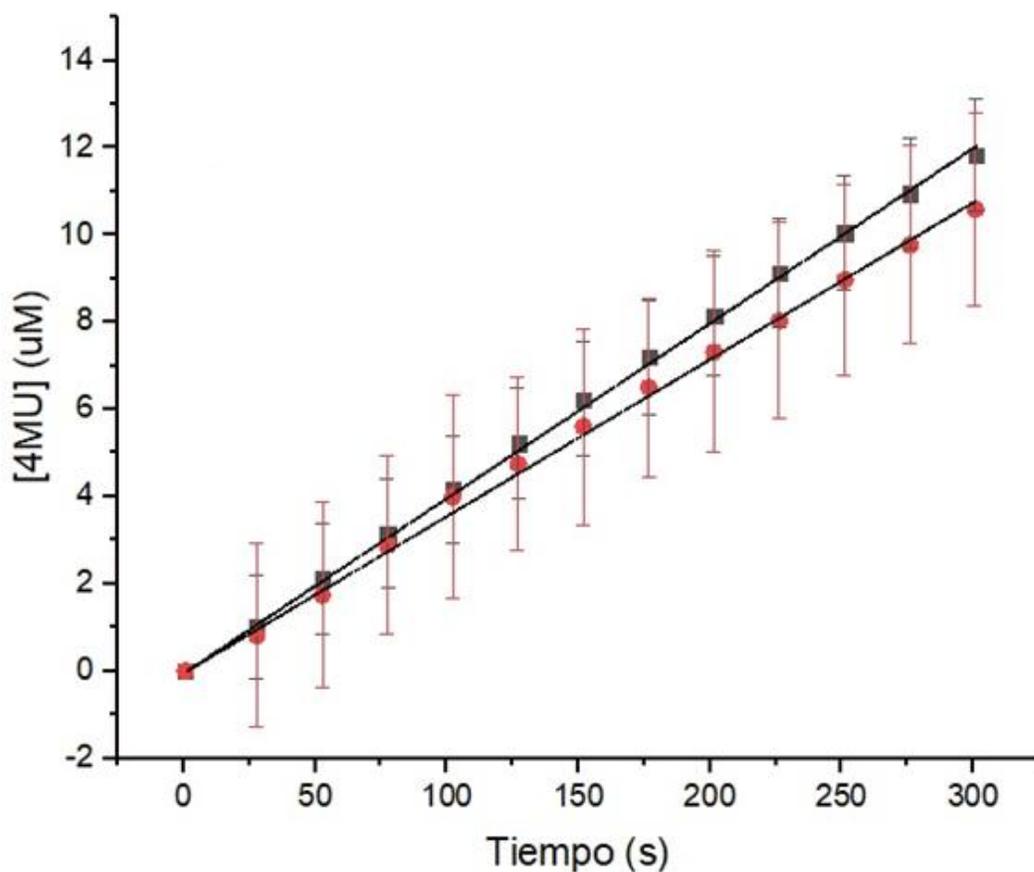
Las fracciones separadas fueron colectadas y empleadas para realizar pruebas de inhibición sobre la reacción enzimática en estudio. Para estos ensayos se emplearon las fracciones correspondientes a los dos primeros picos cromatográficos obtenidos. De igual manera que con el Remazol, se usaron 25  $\mu$ L de cada fracción como agente inhibidor. La reacción se monitoreó por espectrofotometría UV-vis. Para comparar la actividad con y sin inhibidor en la reacción, se graficó el aumento en la concentración de 4-MU en función del tiempo. Cada punto representa el promedio de concentración a ese tiempo obtenido de

diferentes ensayos, esto para conocer también la desviación estándar en cada punto. En la figura 26 se muestra la comparación entre la reacción sin inhibidor, identificada con los marcadores cuadrados, y la reacción en presencia de la fracción número uno del HPLC, representada con los marcadores circulares. A estos puntos se les realizó un ajuste lineal por mínimos cuadrados para obtener el valor de la velocidad de reacción, (pendiente del gráfico). Los valores de velocidad para la reacción sin inhibidor y con la fracción número uno son de  $0.040 \pm 0.0003$  y  $0.038 \pm 0.0004$  ( $\mu\text{M/s}$ ), respectivamente.



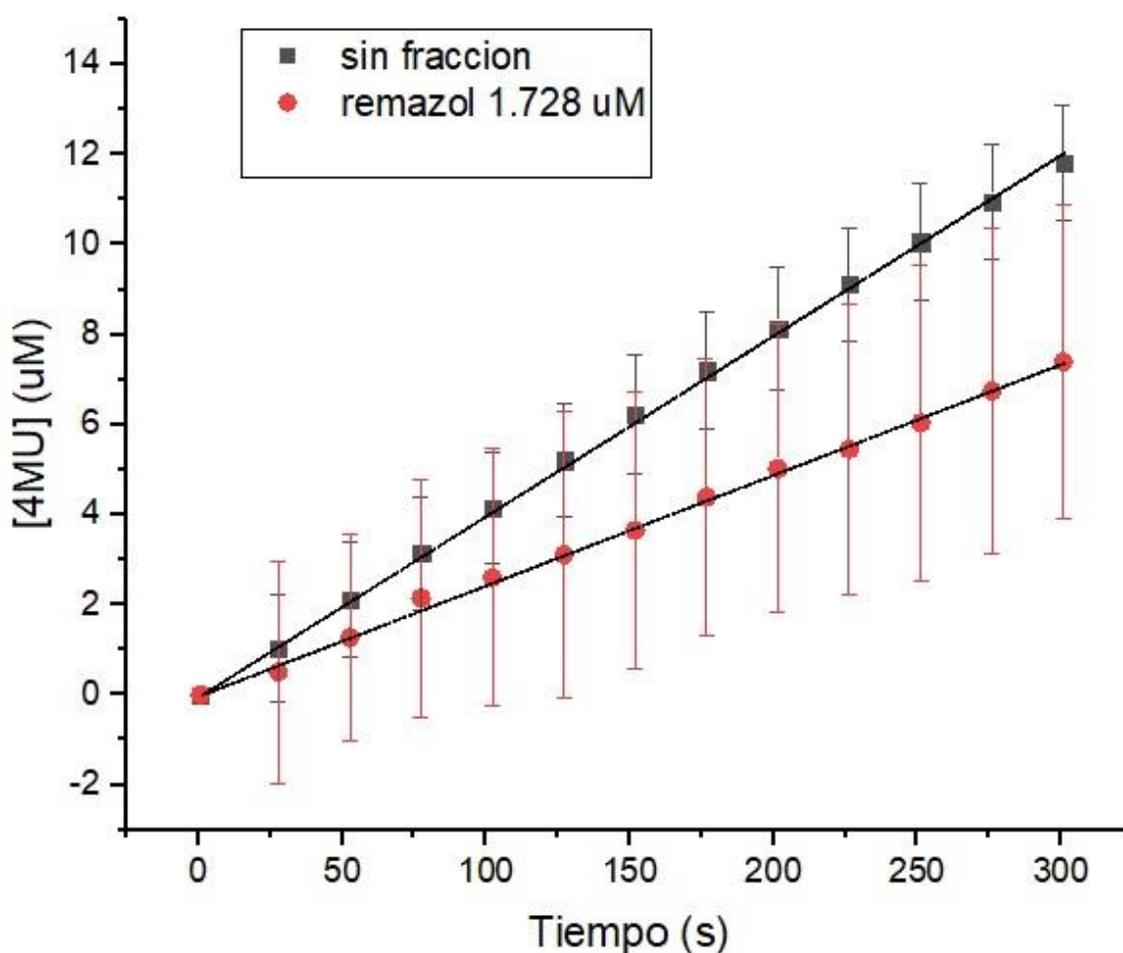
**Figura 26.** Aumento de la concentración de 4-MU debido a la hidrólisis de 4-MUNANA catalizada por la enzima neuraminidasa de *C. perfringens*, a un pH de 7.4 con solución amortiguadora de HEPES. Los marcadores cuadrados representan la velocidad de la reacción en ausencia de inhibidor, mientras que los marcadores circulares representan la velocidad en presencia de la fracción uno.

En la figura 27 se muestra la comparación entre la reacción sin inhibidor, identificada con los marcadores cuadrados, y la reacción en presencia de la fracción número dos, identificada con los marcadores circulares. En este caso, se obtuvo un valor de velocidad inicial de  $0.036 \pm 0.0005$  ( $\mu\text{M/s}$ ). A diferencia de la fracción número uno, la fracción número dos presentó una disminución mayor en la velocidad inicial de la reacción, por lo que resulta más evidente la actividad inhibitoria de dicha fracción.



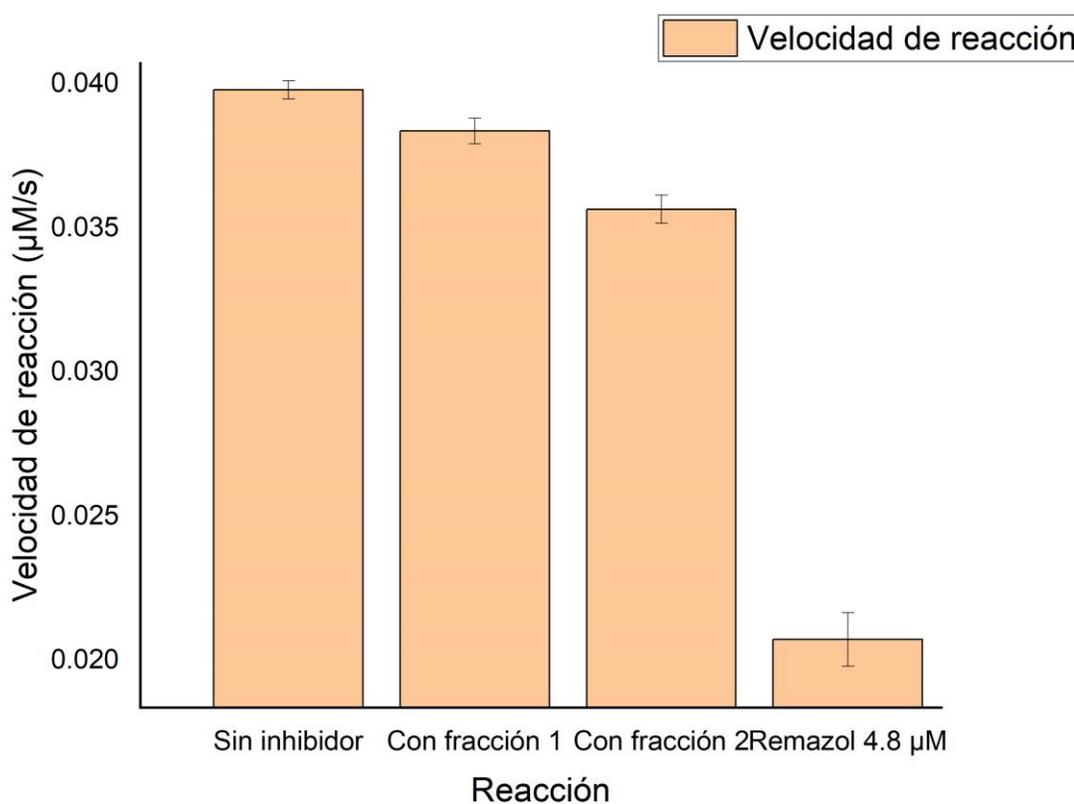
**Figura 27.** Aumento en la concentración de 4-MU debido a la hidrólisis de 4-MUNANA catalizada por la enzima neuraminidasa de *C. perfringens*, a un pH de 7.4 con solución amortiguadora de HEPES. Los marcadores cuadrados representan la velocidad de la reacción en ausencia de inhibidor, mientras que los marcadores circulares representan la velocidad en presencia de la fracción dos.

Esta comparación se aplicó también a los valores obtenidos en las pruebas realizadas con Remazol a una concentración 1.728  $\mu\text{M}$ . En la figura 28 se observa que la zona perteneciente a la reacción sin inhibidor y la zona del Remazol, tienen una diferencia más marcada sobre su pendiente y, de manera más cuantitativa, se tiene que el valor de velocidad para la reacción con Remazol es de  $0.021 \pm 0.0009$  ( $\mu\text{M/s}$ ).



**Figura 28.** Aumento en la concentración de 4-MU debido a la hidrólisis de 4-MUNANA catalizada por la enzima neuraminidasa de *C. perfringens*, a un pH de 7.4 con solución amortiguadora de HEPES. Los marcadores cuadrados representan la velocidad de la reacción en ausencia de inhibidor, mientras que los marcadores circulares representan la velocidad en presencia de Remazol 1.728  $\mu\text{M}$ .

Para tener una mejor comparación de los valores de velocidad obtenidos en las diferentes reacciones, se compararon en un gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar. Estas comparaciones se presentan en la figura 29. El inhibidor conocido de esta enzima, Remazol, es el que mayor inhibición presenta (47.90%). Por otra parte, se observa que la fracción número dos tiene una mayor reducción en la velocidad de la reacción (10.40% de inhibición) frente a la fracción uno que tiene un 3.56% de inhibición.



**Figura 29.** Comparación de las velocidades de la reacción de hidrólisis de 4-MUNANA catalizada por la neuraminidasa de *C. perfringens* en ausencia de inhibidor, así como en presencia de la fracción 1 y 2, y Remazol a una concentración 4.8 µM. Las condiciones de reacción fueron las mismas en los tres casos, siendo estas [HEPES] = 30 mM, pH 7.4 y [4-MUNANA]<sub>0</sub> = 60 µM.

El bajo porcentaje en la reducción de la velocidad puede deberse a la baja concentración de los compuestos presentes en las fracciones, esto debido a la dilución que se realiza a la muestra para su posterior inyección al cromatógrafo, además de la dilución debido a su paso por este equipo.

Una manera de solucionar este inconveniente es coleccionar una mayor cantidad de las fracciones y, posteriormente, evaporar el disolvente en que se encuentran contenidas y tener de este modo disoluciones con una concentración mayor. De este modo se podría observar una inhibición mayor sobre la enzima neuraminidasa.

## **7.Conclusiones.**

Se desarrolló un ensayo continuo por espectrofotometría UV-vis para determinar la actividad catalítica de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* utilizando el sustrato 4-MUNANA. El método es confiable ya que presentó muy buena reproducibilidad con un coeficiente de variación que ronda el 1%. Además, el ensayo es accesible para muchos laboratorios de investigación, ya que requiere un espectrofotómetro UV-vis en lugar de un fluorómetro, que es el equipo mas empleado cuando se usa 4-MUNANA como sustrato.

Con este ensayo se determinó el efecto inhibitorio que tienen dos fracciones cromatográficas de un extracto de la raíz de *Pelargonium sidoides*. Si bien el efecto inhibitorio fue muy modesto (entre 3.6 y 10%), permite: 1) confirmar la inhibición observada en dispositivos de microfluídica en trabajos previos de nuestro grupo y 2) sugiere la conveniencia de aislar en un futuro el o los compuestos de la fracción con mayor inhibición para su caracterización.

## **8.Perspectivas.**

En un futuro además de evaluar la actividad inhibitoria de cada una de las fracciones separadas empleando microfluídica basada en microgotas, se podría acoplar un equipo de espectrometría de masas al equipo de HPLC. Con esto, se podría identificar las especies químicas responsables de la actividad inhibitoria dentro del extracto crudo.

## 9.Referencias bibliográficas.

Álvarez Bohórquez, E. (2013) Evaluación de extractos naturales con posible efecto inhibitorio de la actividad enzimática de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* por medio de ensayos espectrofotométricos [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México].

Álvarez Bohórquez, E. (2013) Evaluación de Extractos naturales con posible efecto inhibitorio de la actividad enzimática de la neuraminidasa de *Clostridium perfringens* por medio de ensayos espectrofotométricos [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México].

Bahramsoltani, R., Sodagari, H. R., Farzaei, M. H., Abdolghaffari, A. H., Gooshe, M., & Rezaei, N. (2016). The preventive and therapeutic potential of natural polyphenols on influenza. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 14(1), 57–80. <https://doi.org/10.1586/14787210.2016.1120670>

Chan, J., Watson, J. N., Lu, A., Cerda, V. C., Borgford, T. J., & Bennet, A. J. (2012). Bacterial and viral sialidases: Contribution of the conserved active site glutamate to catalysis. *Biochemistry*, 51(1), 433–441. <https://doi.org/10.1021/bi201019n>

Chokhawala, H. A., Yu, H., & Chen, X. (2007). High-throughput substrate specificity studies of sialidases by using chemoenzymatically synthesized sialoside libraries. *ChemBioChem*, 8(2), 194–201. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600410>

Fiore T, Uyeki T, Broder K, *et al.* (2010). Morbidity and Mortality Weekly Report Prevention and Control of Influenza with Vaccines Recommendations of the Advisory Committee on. In *Mmwr* (Vol. 59, Issue (No.RR-8)).

Grienke, U., Schmidtke, M., Von Grafenstein, S., Kirchmair, J., Liedl, K. R., & Rollinger, J. M. (2012). Influenza neuraminidase: A druggable target for natural products. *Natural Product Reports*, 29(1), 11–36. <https://doi.org/10.1039/c1np00053e>

Hřasová, Z., Košík, I., Ondrejovič, M., Miertuš, S., & Katrlík, J. (2019). Methods and Current Trends in Determination of Neuraminidase Activity and Evaluation of Neuraminidase Inhibitors. *Critical*

*Reviews in Analytical Chemistry*, 49(4), 350–367.

<https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1531692>

- Hudaib, M., Aldahasi, W. B., Khdair, A., Salah, R., Alkhatib, H. S., Bustanji, Y., & Mohammad, M. K. (2010). A simple and rapid HPLC-UV method for the determination of umckalin, as an herbal marker, in the cough syrup of pelargonium extract. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 109–116.
- Iuliano, A. D., Roguski, K. M., Chang, H. H., Muscatello, D. J., Palekar, R., Tempia, S., Cohen, C., Gran, J. M., Schanzer, D., Cowling, B. J., Wu, P., Kyncl, J., Ang, L. W., Park, M., Redlberger-Fritz, M., Yu, H., Espenhain, L., Krishnan, A., Emukule, G., ... Mustaquim, D. (2018). Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*, 391(10127), 1285–1300. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2)
- Juge, N., Tailford, L., & Owen, C. D. (2016). Sialidases from gut bacteria: A mini-review. *Biochemical Society Transactions*, 44, 166–175. <https://doi.org/10.1042/BST20150226>
- Kim, J. Y., Jeong, H. J., Park, J. Y., Kim, Y. M., Park, S. J., Cho, J. K., Park, K. H., Ryu, Y. B., & Lee, W. S. (2012). Selective and slow-binding inhibition of shikonin derivatives isolated from *Lithospermum erythrorhizon* on glycosyl hydrolase 33 and 34 sialidases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(5), 1740–1748. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.01.011>
- Lee, Y., Youn, H. S., Lee, J. G., An, J. Y., Park, K. R., Kang, J. Y., Ryu, Y. B., Jin, M. S., Park, K. H., & Eom, S. H. (2017). Crystal structure of the catalytic domain of *Clostridium perfringens* neuraminidase in complex with a non-carbohydrate-based inhibitor, 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(2), 470–475. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.064>
- Li, Q., Sun, X., Li, Z., Liu, Y., Vavricka, C. J., Qi, J., & Gao, G. F. (2012). Structural and functional characterization of neuraminidase-like molecule N10 derived from bat influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46), 18897–18902. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211037109>

- Li, T. C. M., Chan, M. C. W., & Lee, N. (2015). Clinical implications of antiviral resistance in influenza. *Viruses*, 7(9), 4929–4944. <https://doi.org/10.3390/v7092850>
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., & Klenk, H. D. (2004). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4620–4624. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308001101>
- McAuley, J. L., Gilbertson, B. P., Trifkovic, S., Brown, L. E., & McKimm-Breschkin, J. L. (2019). Influenza virus neuraminidase structure and functions. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00039>
- Montané, E., Lecumberri, J., & Pedro-Botet, M. L. (2011). Gripe A, embarazo y antivíricos inhibidores de la neuraminidasa. *Medicina Clinica*, 136(15), 688–693. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.02.006>
- Moyo, M., & Van Staden, J. (2014). Medicinal properties and conservation of *Pelargonium sidoides* DC. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(2), 243–255. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.009>
- Müller, H. E., McCullers, J. A., & Bartmess, K. C. (2003). Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* [1] (multiple letters). *Journal of Infectious Diseases*, 187(10), 1674–1675. <https://doi.org/10.1086/374974>
- Ochoa, A., Álvarez-Bohórquez, E., Castellero, E., & Olguin, L. F. (2017). Detection of Enzyme Inhibitors in Crude Natural Extracts Using Droplet-Based Microfluidics Coupled to HPLC. *Analytical Chemistry*, 89(9), 4889–4896. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04988>
- Quosdorf, S., Schuetz, A., & Kolodziej, H. (2017). Different inhibitory potencies of oseltamivir carboxylate, zanamivir, and several tannins on bacterial and viral neuraminidases as Assessed in a Cell-Free Fluorescence-Based Enzyme Inhibition Assay. *Molecules*, 22(11), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules22111989>

- Rakers, C., Schwerdtfeger, S. M., Mortier, J., Duwe, S., Wolff, T., Wolber, G., & Melzig, M. F. (2014). Inhibitory potency of flavonoid derivatives on influenza virus neuraminidase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *24*(17), 4312–4317. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.07.010>
- Ramírez, J., & Ayala, M. (2014). Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria*, *15*(12), 1–13. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>
- Richter, M., Schumann, L., Walther, E., Hoffmann, A., Braun, H., Grienke, U., Rollinger, J. M., Von Grafenstein, S., Liedl, K. R., Kirchmair, J., Wutzler, P., Sauerbrei, A., & Schmidtke, M. (2015). Complementary assays helping to overcome challenges for identifying neuraminidase inhibitors. *Future Virology*, *10*(2), 77–88. <https://doi.org/10.2217/fvl.14.97>
- Russell, R. J., Haire, L. F., Stevens, D. J., Collins, P. J., Lin, Y. P., Blackburn, G. M., Hay, A. J., Gamblin, S. J., & Skehel, J. J. (2006). The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature*, *443*(7107), 45–49. <https://doi.org/10.1038/nature05114>
- Soong, G., Muir, A., Gomez, M. I., Waks, J., Reddy, B., Planet, P., Singh, P. K., Kanetko, Y., Wolfgang, M. C., Hsiao, Y. S., Tong, L., & Prince, A. (2006). Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(8), 2297–2305. <https://doi.org/10.1172/JCI27920>
- Theisen, L. L., & Muller, C. P. (2012). EPs® 7630 (Umckaloabo®), an extract from *Pelargonium sidoides* roots, exerts anti-influenza virus activity in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, *94*(2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.03.006>
- van der Vries, E., Collins, P. J., Vachieri, S. G., Xiong, X., Liu, J., Walker, P. A., Haire, L. F., Hay, A. J., Schutten, M., Osterhaus, A. D. M. E., Martin, S. R., Boucher, C. A. B., Skehel, J. J., & Gamblin, S. J. (2012). H1N1 2009 Pandemic Influenza Virus: Resistance of the I223R Neuraminidase Mutant Explained by Kinetic and Structural Analysis. *PLoS Pathogens*, *8*(9), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002914>
- van Kerkhove, M. D., Vandemaele, K. A. H., Shinde, V., Jaramillo-

Gutierrez, G., Koukounari, A., Donnelly, C. A., Carlino, L. O., Owen, R., Paterson, B., Pelletier, L., Vachon, J., Gonzalez, C., Hongjie, Y., Zijian, F., Chuang, S. K., Au, A., Buda, S., Krause, G., Haas, W., ... Mounts, A. W. (2011). Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza a (H1N1) infection: A global pooled analysis. *PLoS Medicine*, 8(7).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001053>

Von Itzstein, M., Wu, W. Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., Jin, B., Phan, T. Van, Smythe, M. L., White, H. F., Oliver, S. W., Colman, P. M., Varghese, J. N., Ryan, D. M., Woods, J. M., Bethell, R. C., Hotham, V. J., Cameron, J. M., & Penn, C. R. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*, 363(6428), 418–423.  
<https://doi.org/10.1038/363418a0>