

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS

**ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE POLIFENOLES DERIVADOS DE
SUBPRODUCTOS NATURALES SOLOS O EN COMBINACIÓN CON
RIBAVIRINA CONTRA EL VIRUS DE SARAMPIÓN CEPA EDMOSTON**

POR

Q.B.P. KAREN JAZMIN LEDEZMA GONZALEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

FEBRERO, 2018

**ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE POLIFENOLES DERIVADOS DE
SUBPRODUCTOS NATURALES SOLOS O EN COMBINACIÓN CON
RIBAVIRINA CONTRA EL VIRUS DE SARAMPIÓN CEPA EDMOSTON**

Comité de tesis

Dra. Laura María Trejo Ávila
PRESIDENTE

Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña
SECRETARIO

Dr. Pablo Zapata Benavides
VOCAL 1

Dr. José Santos García Alvarado
VOCAL 2

Dra. Norma Laura Heredia Rojas
VOCAL 3

**ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE POLIFENOLES DERIVADOS DE
SUBPRODUCTOS NATURALES SOLOS O EN COMBINACIÓN CON
RIBAVIRINA CONTRA EL VIRUS DE SARAMPIÓN CEPA EDMOSTON**

Dirección de Tesis

**Dra. Laura María Trejo Ávila
DIRECTOR**

**Dra. Karla Selene Morán Santibáñez
DIRECTOR EXTERNO**

Realmente jamás creí tener la capacidad de hacerlo. Pero como pasa comúnmente, hoy veo atrás y digo para mí: “No era tan difícil...”. A mí se me cerró una puerta, pero estoy consciente de que la Doctora Laura me abrió una ventana, por lo cual hoy me encuentro aquí y le estoy muy agradecida. Corrí, busqué, estudié, entré y aun después de eso me seguí esforzando. Admito que aprendí aún más que lo pude haber hecho durante toda mi carrera. Puse algunas de mis noches y fines de semana para lograr mi objetivo y gracias a eso hoy puedo presentarles en tiempo y forma lo que con muchas ansias deseaba terminar.

Master

Yo quisiera ya! Ser un ~~rey~~!

Nadie que me diga, lo que debo hacer

Nadie que me diga, como debo ser

Libre de correr seré, todo lo que quiera haré!

- El rey león

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haberme apoyado en mi decisión y creer en mí.

A la Dra. Laura Trejo por su apoyo para lograr entrar a este posgrado y la formación que de ella recibí.

A la Dra. Karla Morán, por todo su apoyo, su tutoría, su paciencia, su tiempo pero sobre todo su valiosa amistad.

A la M.C. Mayra Meléndez por sus consejos, compañerismo y por supuesto también por la gran amistad que formamos trabajando juntas.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por permitirme hacer uso de las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por todo el apoyo brindado al número de proyecto PDCPN2013-215075 y por la beca brindada durante mi tiempo como estudiante de maestría.

Al Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña por resolver tantas de mis dudas.

Al Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A todo el LIV que entre científicos somos capaces de apoyarnos.

A todo el L7 que en su momento se encontró conmigo, que más que compañeros siempre seremos amigos.

DEDICATORIAS

A mi padre, siguiendo su vivo ejemplo del esfuerzo, el trabajo, la perseverancia pero sobre todo del emprendimiento.

A mi madre, porque ella sabía que: “yo quería ya! ser... master!” ☺ te amo, tus palabras han estado conmigo en cada uno de mis pasos.

A mis hermanos porque esto no me hace mejor ni peor que ustedes, espero logren verme como una meta a superar.

A Rodrigo, por escuchar, por entender, por soportar, por estar ahí, porque tú eras quien más propenso estuvo a mi tensión. Gracias por compartir mi felicidad.

A mis valiosísimos compañeros pero más que nada amigos, Amaro porque de ti siempre tome la buena vibra y tranquilidad. Mayra, porque sabes que tus consejos fueron claves para que todo me saliera bien, yo se lo mucho que tu batallaste y no hubo quien te guiara, gracias por guiarme a mí. Mario, porque ¿Quién sabe técnicas moleculares mejor que un LBG? Gracias Mario. Y por supuesto Karla, por tomarte el tiempo de enseñarme, de explicarme una y otra vez, por aconsejarme, por ser la mamá de nosotros tus pollitos.

A la Dra. Laura Trejo, porque sin ella no habría tenido esta oportunidad, por dejarme colaborar en su laboratorio, donde aprendí tanto y donde conocí a tan grandes personas.

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Descripción	Página
Tabla 1	Agentes antivirales principales en el uso clínico actualmente	3
Tabla 2	Actividad antiviral de polifenoles	10
Tabla 3	Comparación del contenido de fenoles totales, ácidos fenólicos y actividad antioxidante total en cáscara de diferentes frutos del género <i>Citrus</i> y el fruto sin cáscara	16
Tabla 4	Indicadores de vigilancia del sarampión y rubéola para el periodo entre las semanas 1-42 del año 2017	27
Tabla 5	Valores de IS obtenidos para los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de la cáscara de <i>C. limon</i> y <i>C. medica</i> y del orujo húmedo de <i>V. vinífera</i>	47
Tabla 6	Conformación de las combinaciones del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de <i>C. limon</i> y la Ribavirina	52
Tabla 7	Efecto combinado del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de <i>C. limon</i> y el antiviral comercial Ribavirina	55
Tabla 8	Efecto combinado de las CE ₅₀ y CE ₂₅ de Ribavirina y la CE ₁₅ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cascara de <i>C. limon</i>	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Figura 1	Línea del tiempo que muestra la aprobación de fármacos por la FDA contra 9 enfermedades humanas infecciosas (HIV, HBV, HCV, VHS, HCMV, HPV, RSV, VZV, y virus de la influenza).	2
Figura 2	Porcentaje de producción de frutas y vegetales descartados en diferentes fases de la cadena de producción en industrias de alimentos en diferentes regiones a nivel mundial	6
Figura 3	Ejemplos de polifenoles presentes en subproductos naturales	7
Figura 4	Estructura básica de un flavonoide	8
Figura 5	Ejemplos de flavonoides según su clasificación	9
Figura 6	A) Representación esquemática del virion de sarampión. B) Organización del genoma del virus de sarampión	21
Figura 7	Representación esquemática del ciclo viral de sarampión	25
Figura 8	Mapa mundi representando el número de casos de personas infectadas con el virus de sarampión reportados a nivel mundial hasta el mes de Octubre del 2017	26
Figura 9	Representación esquemática del diseño experimental	32
Figura 10	Selección de extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales con actividad anti-sarampión	44
Figura 11	Efecto citotóxico de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos seleccionados sobre la viabilidad celular	45
Figura 12	Inhibición de UFP producidas por el virus de sarampión cepa Edmoston con los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales	46
Figura 13	Curva de amplificación del cDNA del gen N del virus de sarampión a las concentraciones 1 y 10 µg/ml del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de <i>Citrus limón</i> obtenida mediante qPCR	48
Figura 14	Evaluación de la actividad antiviral del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de <i>Citrus limon</i> mediante las técnicas de unidades formadoras de placas (UFP) y qPCR	49

Figura 15	Efecto del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de <i>Citrus limon</i> a diferentes horas de la infección sobre la formación de UFP	50
Figura 16	Efecto virucida del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de <i>C. limon</i> a diferentes horas sobre la formación de UFP	51
Figura 17	Efecto del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de <i>C. limon</i> sobre los virones de sarampión (efecto virucida)	52
Figura 18	Actividad antiviral del efecto combinado del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivados cáscara de <i>C. limon</i> y Ribavirina	53
Figura 19	Gráfico del efecto medio de las combinaciones CE ₅₀ y CE ₂₅ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de <i>C. limon</i> (círculos azules) y el antiviral comercial Ribavirina (cuadros rojos)	54
Figura 20	Isoblograma normalizado de las combinaciones de las CE ₅₀ y CE ₂₅ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de <i>C. limon</i> y el antiviral comercial Ribavirina a radios no constantes	55
Figura 21	Actividad antiviral del efecto combinado del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de <i>C. limon</i> y Ribavirina	56
Figura 22	Gráfico del efecto medio de las combinaciones de CE ₅₀ y CE ₂₅ del antiviral comercial Ribavirina (círculos azules) y CE ₁₅ del extracto hidroalcohólico rico en polifenles derivado de cáscara de <i>C. limon</i> (cuadros rojos)	57
Figura 23	Isoblograma normalizado de las combinaciones CE ₁₅ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de <i>C. limon</i> y CE ₅₀ y CE ₂₅ del antiviral comercial Ribavirina a radios no constantes	57

LISTA DE SIMBOLOS Y FIGURAS

WHO	Organización Mundial de la Salud
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HBV	Virus de hepatitis B
HSV	Virus de herpes simple
VZV	Virus de varicela zoster
HCMV	Citomegalovirus humano
HCV	Virus de hepatitis C
RSV	Virus respiratorio sincitial
DENV	Virus del dengue
RT	Transcriptasa reversa
UV	Ultravioleta
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
g	Gramos
mg	Miligramos
kg	Kilogramos
µg	Microgramos

ml	Mililitros
μ l	Microlitros
\geq	Mayor o igual
\leq	Menor o igual
nm	Nanometros

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE SIMBOLOS Y FIGURAS.....	X
ÍNDICE	XII
RESUMEN.....	XVI
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Agentes antivirales	2
2.2 Mecanismo de acción de drogas antivirales	3
2.3 Uso de productos de origen natural para el tratamiento de enfermedades	4
2.4 Producción de subproductos naturales en la industria alimenticia.....	5
2.5 Fitoquímicos presentes en subproductos naturales y su clasificación.....	6
2.6 Actividades biológicas de extractos polifenólicos de subproductos naturales ...	9
2.7 Actividad antiviral de polifenoles	10
2.8 Actividad antiviral de polifenoles derivados de productos naturales.....	11
2.9 Actividad antiviral de polifenoles derivados de subproductos naturales	13
2.10 Generalidades de productos y subproductos del genero <i>Citrus</i>	14
2.10.1. Polifenoles derivados del genero <i>Citrus</i>	15
2.10.2. Actividades biológicas de polifenoles derivadas del género <i>Citrus</i>	17
2.10.3. Actividad antiviral de polifenoles derivados de productos y subproductos del género <i>Citrus</i>	17
2.11 Generalidades de productos y subproductos de <i>Vitis vinífera</i>	18
2.11.1. Polifenoles derivados de productos y subproductos de <i>Vitis vinífera</i>	19

2.11.2. Actividades biológicas de polifenoles derivados de <i>Vitis vinífera</i>	19
2.11.3. Actividad antiviral de <i>Vitis vinífera</i>	20
2.12 Efecto de combinaciones de polifenoles y fármacos antivirales comerciales	20
2.13 Generalidades del virus de sarampión	20
2.14 Ciclo viral del virus de sarampión.....	22
2.15 Situación actual de casos reportados por el virus de sarampión a nivel mundial	25
2.16 Situación actual de casos reportados por el virus de sarampión en México ..	27
2.17 Plan estratégico para la erradicación del virus de rubeola y sarampión.....	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPOTESIS	30
5. OBJETIVO GENERAL.....	31
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	31
6. MATERIAL Y METODOS.....	32
6.1 Diseño experimental.....	32
6.2 Material Biológico.....	32
6.3 Extracción hidroalcohólica para la obtención de polifenoles y determinación de fenoles, flavonoides y taninos totales de los subproductos derivados de subproductos naturales.	33
6.4 Selección de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales con actividad anti-sarampión.....	34
6.4.1. Cultivo de células Vero.....	34
6.4.2. Propagación del virus de sarampión	34
6.4.3. Titulación del virus de sarampión cepa Edmoston mediante Dosis Infectiva en Cultivo de Tejidos al 50% (DICT ₅₀)	34
6.4.4. Actividad antiviral mediante inhibición de sincicios.....	35
6.5 Determinación del efecto citotóxico de el/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivados del/los subproducto(s) seleccionado(s) sobre la línea celular Vero	36

6.6 Evaluación del efecto antiviral de/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivados del/los subproducto(s) seleccionado(s)	37
6.6.1. Titulación del virus de sarampión cepa Edmoston por Unidades Formadoras de Placa (UFP)	37
6.6.2. Ensayo de actividad antiviral del/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivado del/los subproducto(s) seleccionado(s) por medio de UFP	37
6.7 Confirmación de la actividad antiviral del/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivado del/los subproducto(s) seleccionado(s) por RT-qPCR	38
6.8 Evaluación del nivel de acción de los extractos	39
6.8.1. Ensayos de inhibición viral del/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivados del/los subproducto(s) seleccionado(s) a diferentes tiempos de infección mediante UFP	39
6.8.2. Ensayo de efecto virucida del/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivado(s) del/los subproducto(s) seleccionado(s) mediante UFP	40
6.9 Evaluación del efecto en combinación (aditivo, sinérgico o antagonista) de el/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivado(s) del/los subproducto(s) seleccionado(s)	41
6.10 Análisis estadístico	42
7. RESULTADOS	43
7.1 Selección de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales con actividad antiviral	43
7.1.1. Obtención del título del virus de sarampión cepa Edmoston por Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos al 50% (DICT ₅₀).....	43
7.1.2. Actividad antiviral de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales mediante inhibición de sincicios.....	43
7.2 Efecto citotóxico de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos naturales seleccionados sobre las células Vero.....	44

7.3 Evaluación del efecto antiviral de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos seleccionados.....	45
7.3.1. Obtención del título del virus de sarampión cepa Edmoston por unidades formadoras de placas (UFP)	45
7.3.2. Efecto antiviral de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos seleccionados mediante UFP	46
7.3.3. Evaluación del efecto del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivad de la cáscara de <i>Citrus limon</i> sobre la carga viral del virus de sarampión por RT-qPCR	47
7.4 Evaluación del nivel de acción del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de <i>C. limon</i>	49
7.4.1. Efecto del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de <i>C. limon</i> en la infección por el virus de sarampión cepa Edmoston a diferentes tiempos de adición	49
7.4.2. Evaluación del efecto virucida contra el virus de sarampión del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivados la cáscara de <i>Citrus limon</i>	50
7.5 Evaluación del efecto combinado del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de <i>C. limon</i>	52
7.5.1. Evaluación del efecto combinado del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de <i>C. limon</i> y el antiviral comercial Ribavirina sobre la formación de unidades formadoras de placas (UFP) producidos por el virus de sarampión cepa Edmoston	52
7.5.2. Evaluación del efecto de combinaciones (antagonismo, aditividad o sinergismo) del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de <i>C. limon</i> y el antiviral comercial Ribavirina	53
8. DISCUSIÓN	59
9. CONCLUSIONES	66
10. PERSPECTIVAS	67
11. BIBLIOGRAFIA	68

RESUMEN

El virus de sarampión es un virus envuelto, pertenece a la familia Paramixoviridae, con genoma de RNA con polaridad negativa. Actualmente la infección por el virus continúa siendo una de las principales causas de muerte en niños pequeños en países menos desarrollados a pesar de la existencia de una vacuna preventiva efectiva. Se sabe que algunos de los fitoquímicos, como los polifenoles, derivados de subproductos naturales que comúnmente las industrias de alimentos consideran desecho, poseen actividad antiviral contra virus de RNA y DNA actuando a diferentes niveles de acción durante el ciclo viral. En esta tesis se evaluó la actividad antiviral de extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de corteza de palo de Brasil (*Haematoxylum brasiletto*), cáscara de limón (*Citrus limon*), cáscara de cidra (*Citrus medica*) y orujo húmedo y seco de uva (*Vitis vinifera*), sobre el virus sarampión. Todos los extractos inhibieron la infección del virus en células Vero, sin embargo, el extracto derivado de la corteza de *H. brasiletto* mostró un efecto altamente tóxico a 10 µg/ml, siendo descartado para ensayos posteriores. Posteriormente se determinó para cada uno de los extractos, la concentración citotóxica al 50% (CC₅₀) mediante reducción de resazurina y la concentración efectiva al 50% (CE₅₀), mediante unidades formadoras de placas (UFP): el extracto de cáscara de *C. limon* presentó la citotoxicidad más baja con una CC₅₀= 214.429 µg/ml en comparación con los extractos de cáscara de *C. medica* y orujo húmedo y seco de *V. vinifera* (CC₅₀=108.77 µg/ml, CC₅₀=86.351 µg/ml y CC₅₀=75.250 µg/ml respectivamente). Los extractos derivados de cáscara de *C. limon*, *C. medica* y orujo húmedo de *V. vinifera* mostraron una actividad antiviral similar (CE₅₀=8.68 µg/ml, CE₅₀=8.94 µg/ml y CE₅₀= 8.10 µg/ml respectivamente), la CE₅₀ del extracto de orujo seco de *V. vinifera* se encontraba a concentraciones mayores a las evaluadas (10µg/ml). El extracto de cáscara de *C. limon* mostró el mejor índice de selectividad (o índice terapéutico) IS=24.70. Mediante qPCR se determinó el efecto de este extracto sobre la replicación del virus, mostrando una disminución del 64% en el número de copias virales con 10µg/ml del compuesto, concordando con los resultados obtenidos mediante UFP. Para conocer el nivel de acción sobre el virus sarampión del extracto de *C. limon*, se realizaron ensayos de tiempos de adición, mostrando una reducción significativa en los primeros 30 minutos post-infección con una fuerte reducción a los 15 minutos post-infección, y mediante los ensayos de efecto virucida se encontró una inhibición directa sobre la partícula viral reduciendo la infección del cultivo celular. Con el objetivo de conocer si el extracto podía ejercer un efecto sinérgico con drogas comerciales, se combinaron diferentes concentraciones del extracto de *C. limon* y ribavirina, encontrando un efecto sinérgico de CE₂₅ de ribavirina con CE₁₅ del extracto hidroalcohólico de *C. limon*. El extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* o la combinación de este con ribavirina, podría ser usado como posible agente antiviral contra el virus de sarampión, que actuó en conjunto con la vacuna existente para el control de sarampión. De esta manera subproductos como la cáscara de *C. limon* podrían ser aprovechados en lugar de ser considerados como desecho.

ABSTRACT

Measles virus (MeV) is an enveloped virus with negative stranded RNA linear genome. It belongs to Paramyxoviridae family and now days it continue being one of the most important causes of death in children at developing countries despite the existence of a prophylactic vaccine. There are currently reports about antiviral activity against RNA and DNA virus acting at different levels at the viral cycle of some phytochemicals like polyphenols derived from by-products which most of food industries consider as waste. The objective of this work was to evaluate the antiviral activity of hydroalcoholic extracts rich in polyphenols derived from *Citrus limon* and *Citrus medica* peel, *Vitis vinifera* wet and dry pomace and *Haematoxylum brasiletto* steam bark over MeV. All the extracts showed to inhibit the virus. However the hydroalcoholic extract rich in polyphenols derived from *H. brasiletto* steam bark was highly cytotoxic at 10µg/ml therefore it was discarded for following experiments. Then we determined the concentration of the selected extracts that reduced Vero cell viability by 50% (CC₅₀) by resazurin reduction and the concentration of a test compound that reduced the number of MeV plaques in Vero cells by 50% (CE₅₀). The extract of *C. limon* peel showed the lowest cytotoxicity with a CC₅₀= 214.429 µg/ml compared with *C. medica* peel and *V. vinifera* wet and dry pomace extracts (CC₅₀=108.77 µg/ml, CC₅₀= 86.351 µg/ml and CC₅₀=75.250 respectively). The extracts of *C. limon* and *C. medica* peel and *V. vinifera* wet pomace presented similar (CE₅₀=8.68 µg/ml, CE₅₀=8.94 and CE₅₀=8.10 respectively). The CE₅₀ of *V. vinifera* dry pomace extract could not be determined because this value was superior to the evaluated concentrations at these experiments (10µg/ml). The extract of *C. limon* peel displayed the highest IS (IS= 24.70). By qPCR we determinate the effect of this extract on MeV replication showing a reduction of 64% on the number of viral copies with 10µg/ml of the compound. These results are similar to those obtained by UFP. In order to determinate the possible action level of *C. limon* peel extract on MeV replication we perform time of addition assays revealing a significative reduction at the first 30 minutes post-infection with a higher reduction at 15 minutes after infection occurs. Virucidal effect assays revealed the direct inhibition over the viral particle reducing the viral infection on the cell culture. To know if the extract could exert a synergic effect with commercial drugs we combined different concentrations of *C. limon* peel extract and Ribavirin finding a synergic effect by the CE₂₅ of Ribavirin and the CE₁₅ of *C. limon* peel extract. The *C. limon* peel hydroalcoholic extract rich in polyphenols or the combination of this one with Ribavirin could be used as a possible antiviral agent against MeV acting together with the prophylactic vaccine for the control of measles. This way by-products like *C. limon* peel could be useful instead of being considered like waste.

1. INTRODUCCIÓN

El virus de sarampión continúa siendo una de las principales causas de muerte en niños a nivel mundial en países subdesarrollados a pesar de la existencia de una vacuna profiláctica efectiva para su prevención. Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (WHO) ha puesto en marcha un plan estratégico para su erradicación para el año 2020 en el cual uno de los objetivos busca desarrollar investigaciones que puedan aportar herramientas útiles para contribuir a la erradicación del virus a nivel mundial.

A pesar de que actualmente la FDA ha aprobado alrededor de 90 fármacos antivirales capaces de inhibir la infección por diferentes virus, la mayoría de estos va dirigido contra un grupo limitado de agentes virales y son altamente tóxicos. Por lo que en años recientes los metabolitos secundarios derivados de plantas se han vuelto de gran interés para la comunidad científica dado a sus importantes propiedades biológicas. Particularmente los subproductos naturales obtenidos del procesamiento de diferentes frutos, vegetales y hierbas han demostrado ser capaces de inhibir la infección de virus tanto de DNA como de RNA mediante diversos mecanismos. Un grupo de fitoquímicos presentes en subproductos encargados de dicha actividad son los polifenoles. Estos compuestos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unido y generalmente se clasifican en clases y subclases basadas en su estructura química. Se ha observado que uno de los factores que influye en la cantidad y concentración de estos compuestos bioactivos es su posición en los diferentes tejidos del mismo fruto e incluso se ha llegado a observar que en algunos casos pueden encontrarse en mayor concentración en aquellos considerados como subproductos que en el producto de consumo.

La búsqueda de agentes antivirales a partir de subproductos naturales puede ser un recurso de bajo costo para nuestra población ya que se encuentran en abundancia en la industria de alimentos y pueden ser aprovechados en lugar de ser considerados como desechos.

El desarrollo de un antiviral a partir de los compuestos polifenólicos obtenidos de estos subproductos podría ser un valioso elemento que trabaje en conjunto con la vacuna que existe actualmente. De tal modo, que aquellas poblaciones no inmunizadas y que sean infectadas con el virus tengan una alternativa como tratamiento y que de igual forma, este deje de esparcirse entre la población, ayudando a su erradicación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Agentes antivirales

Los agentes antivirales son compuestos capaces de detener el desarrollo y propagación de un virus sin causar un daño relevante en la célula huésped. Sin embargo, el número de antivirales disponibles es aun pequeño y efectivo solo contra un grupo limitado de patógenos (Menéndez-Arias y Gago, 2013).

En 1959 la Idoxuridina, un análogo de la timidina capaz de inhibir la replicación del virus del herpes, comienza con la historia de la terapia antiviral. Posteriormente en 1963 la FDA lo aprueba y desde esa fecha hasta abril del 2016 se han aprobado ya 90 fármacos antivirales para el tratamiento de 9 enfermedades infecciosas humanas. Sin embargo, la mayoría de los medicamentos aprobados que se han introducido en los últimos 25 años se utilizan en el tratamiento del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (**Figura 1**) (Clercq 2016).

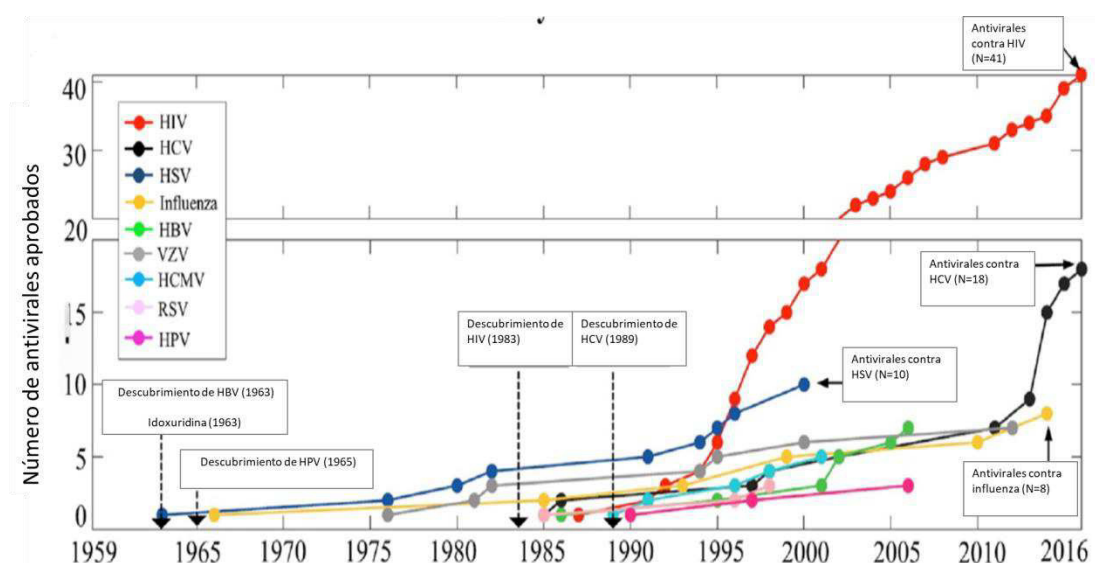


Figura 1. Línea del tiempo que muestra la aprobación de fármacos por la FDA contra 9 enfermedades humanas infecciosas (HIV, HBV, HCV, VHS, HCMV, HPV, RSV, VZV, y virus de la influenza). El eje “x” indica el período comprendido entre enero de 1959 a abril de 2016. El eje “y” muestra el número total de medicamentos aprobados. Para cada virus se muestra el número total de medicamentos aprobados. Se observan también los años en que se descubrieron los virus, HBV (1963), HPV (1965), HIV (1983), y el HCV (1989) (Clercq 2016).

2.2 Mecanismo de acción de drogas antivirales

Los agentes antivirales pueden clasificarse en diferentes mecanismos dependiendo si actúan directamente afectando los componentes derivados del virus incluyendo proteínas y genomas virales (DAAs) o si lo hacen sobre la célula huésped (HAAs) modificando factores o maneras en que el virus afecta su ciclo de vida, así como interviniendo en los componentes de la respuesta inmune, incluyendo anticuerpos, interferones o vacunas (Martínez-Luscher et al., 2014) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Agentes antivirales principales en el uso clínico actualmente (Lou et al. 2014).

Mecanismo	Pasos del ciclo viral o función celular modulada	Virus	Tipo de fármaco y nombre
Viral	Entrada	HIV	Inhibidores de la fusión: Enfuvirtide
	Desensamble	Influenza	Unión con la proteína M2: Amantadina y Rimantadina
	Replicación del genoma	HIV	Inhibidores de nucleótidos y nucleósidos: Zidovudine (AZT), didanosina (ddI), zalcitabine (ddC), stavudine (d4T), lamivudine (3TC), abacavir (ABC), emtricitabine (FTC) y tenofovir. Inhibidores no nucleosídicos: Nevirapine, delavirdine, efavirenz, etravirine y rilpivirine
		HBV	Análogos de nucleósidos/nucleótidos: Lamivudine, emtricitabine, entecavir, telbivudine, adefovir y tenofovir.
		HSV y VZV	Análogos de nucleósidos/nucleótidos: Aciclovir, penciclovir, idoxuridine, trifluridine y brivudine
		HCMV	Ganciclovir y cidofovir
	Integración en el genoma del huésped	HIV	Inhibidores de la integrasa: Raltegravir y elvitegravir
	Síntesis de mRNAs virales	HCMV	Oligonucleótido antisentido: Fomivirsen
	Corte de las proteínas virales	HIV	Inhibidores de la proteasa: Saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir and su pro-droga

			fosamprenavir, lopinavir, atazanavir, tipranavir y darunavir.
	Ensamblaje	Influenza	Inhibidores de la neuroaminidasa: Oseltamivir y zanamivir
Celular	Entrada viral	HIV	Inhibidores de correceptores virales: Maraviroc
	Inmunidad innata	HCV y HVB	Interferones: Pegilados α -2a y α -2b, e interferones α -2a y α -2b
	Inhibidores de ciclofilina	HCV	Alisporivir

2.3 Uso de productos de origen natural para el tratamiento de enfermedades

A través de la historia los hombres han sido dependientes de las plantas para sus necesidades básicas y el uso de plantas medicinalmente activas perdura en la historia moderna. A través de la evolución humana cientos de plantas biológicamente activas se han identificado y forman parte integral de sistemas de medicina tradicional alrededor del mundo. La organización mundial de la salud (WHO) reporta que más del 80% de la población a nivel mundial presenta una dependencia por plantas tradicionales para sus requerimientos de salud (WHO 1993). Y de acuerdo a un inventario llevado a cabo por el instituto nacional indigenista (INI) hay más de 3015 especies de plantas medicinales que son comúnmente usadas para el tratamiento de enfermedades comunes en México (Argueta et al., 1994).

Estas plantas sintetizan un amplio rango de compuestos orgánicos que son clasificados como metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son compuestos que tienen roles esenciales asociados a la fotosíntesis, respiración, crecimiento y desarrollo. Entre estos se incluye los fitoesteroles, acil-lípidos, nucleótidos, aminoácidos y ácidos orgánicos. Mientras que los metabolitos secundarios tienen un rol clave en la protección de las plantas contra herbívoros, patógenos, otras plantas parásitas, contaminación, deficiencia de nutrientes, exceso de nutrientes y sales, cambios climáticos, compactación del suelo y radiación (Joshi et al., 2012). Estos compuestos están divididos en 3 grupos principales: terpenos, alcaloides fenólicos y nitrogenados y compuestos sulfúricos (Crozier et al., 2006; Mazid et al., 2011).

En años recientes los metabolitos secundarios se han vuelto de gran interés para la comunidad científica dado a sus importantes propiedades, una de ellas como potenciales recursos de nuevas drogas de origen natural (Crozier et al., 2006).

Estos metabolitos secundarios son compuestos fitoquímicos (sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes esenciales para la vida por lo menos a corto plazo, pero tienen efectos positivos en la salud). Dependiendo de la especie de planta, la variedad y el tipo de tejido como cáscaras, semillas y huesos, diferentes fitoquímicos podrían encontrarse (Joshi et al., 2012). Estos últimos son comúnmente descartados durante el procesamiento y consumo de alimentos de origen natural y se denominan “subproductos”.

2.4 Producción de subproductos naturales en la industria alimenticia

Dado a que los hábitos alimenticios de consumidores contemporáneos han cambiado en el siglo XXI en relación a los estilos de vida y como resultado de un mejor entendimiento de los efectos que tiene la comida en la salud, existe un incremento en la demanda de frutos y vegetales frescos o procesados, principalmente como jugos, enlatados y congelados. En esta industria alimentaria muchas de las veces puede generarse una importante pérdida a través de la cadena de suministro que tiene lugar ya sea post-cosecha, en las etapas de procesamiento o durante la producción (Parfitt et al. 2010) presentándose así altas cantidades de subproductos como cáscaras, semillas, huesos, pulpa residual, etc. (De Ancos et al., 2015).

De acuerdo a una búsqueda reciente llevada a cabo por la FAO, cerca de 1.3 billones de toneladas se producen cada año a nivel mundial como desperdicio, lo cual representa un tercio del total de la producción de las industrias de alimentos. La mayor cantidad de pérdidas se da por frutas y vegetales, representando 0.5 billones de toneladas (FAO 2000). La **Figura 2** muestra el porcentaje del peso inicial de frutas y vegetales que es descartado en diferentes fases de la cadena alimenticia en diferentes regiones a nivel mundial. Cabe destacar que en la mayoría de los países, el porcentaje del peso inicial de los vegetales y frutas que se pierde supera el 40% llegando hasta 50% en países menos industrializados (Gustavsson et al. 2011).

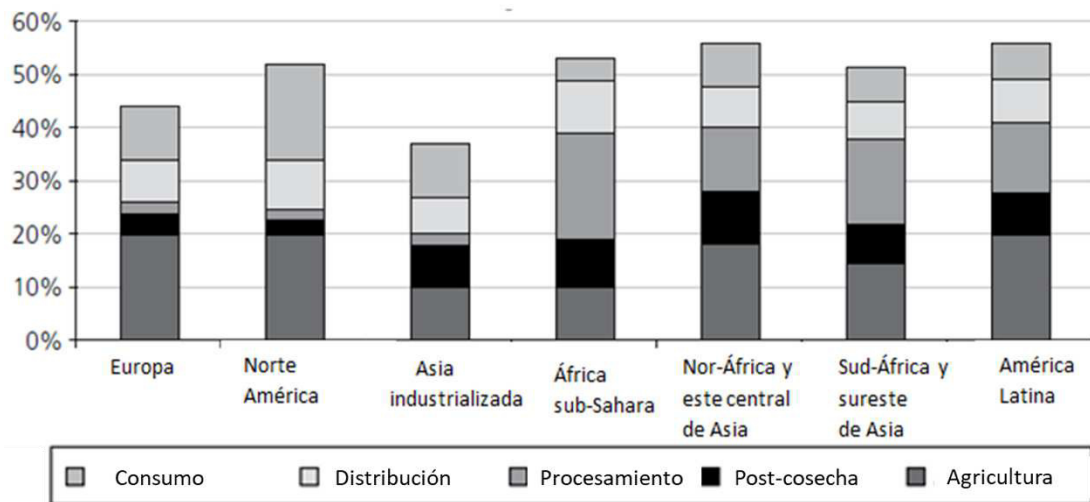


Figura 2. Porcentaje de producción de frutas y vegetales descartados en diferentes fases de la cadena de producción en industrias de alimentos en diferentes regiones a nivel mundial (De Ancos et al., 2015).

Generalmente, los desperdicios o subproductos del procesamiento de frutas y vegetales es reusado como alimento para animales, composta o en biomasa para la producción de combustibles como bioetanol (Lenucci et al., 2013). En el presente, los productores y la industria de alimentos están buscando formas innovadoras de usar estos desperdicios. Por lo que la recuperación y el reciclaje de estos subproductos puede ser económicamente atractivo para las industrias.

2.5 Fitoquímicos presentes en subproductos naturales y su clasificación

Dentro de los fitoquímicos presentes en subproductos naturales se encuentran carotenoides, fibras dietéticas, vitaminas C, minerales y polifenoles. (De Ancos et al., 2015; Jasna et al., 2009; Ayala-Zavala et al., 2010). Los polifenoles constituyen el grupo más amplio de sustancias presentes en el reino vegetal, principalmente flavonoides, a la fecha se conocen más de 8000 flavonoides (Wenzel et al., 2001).

En la **Figura 3** se muestran algunos ejemplos de los principales polifenoles que pueden ser extraídos de subproductos derivados del procesamiento de frutas y vegetales.

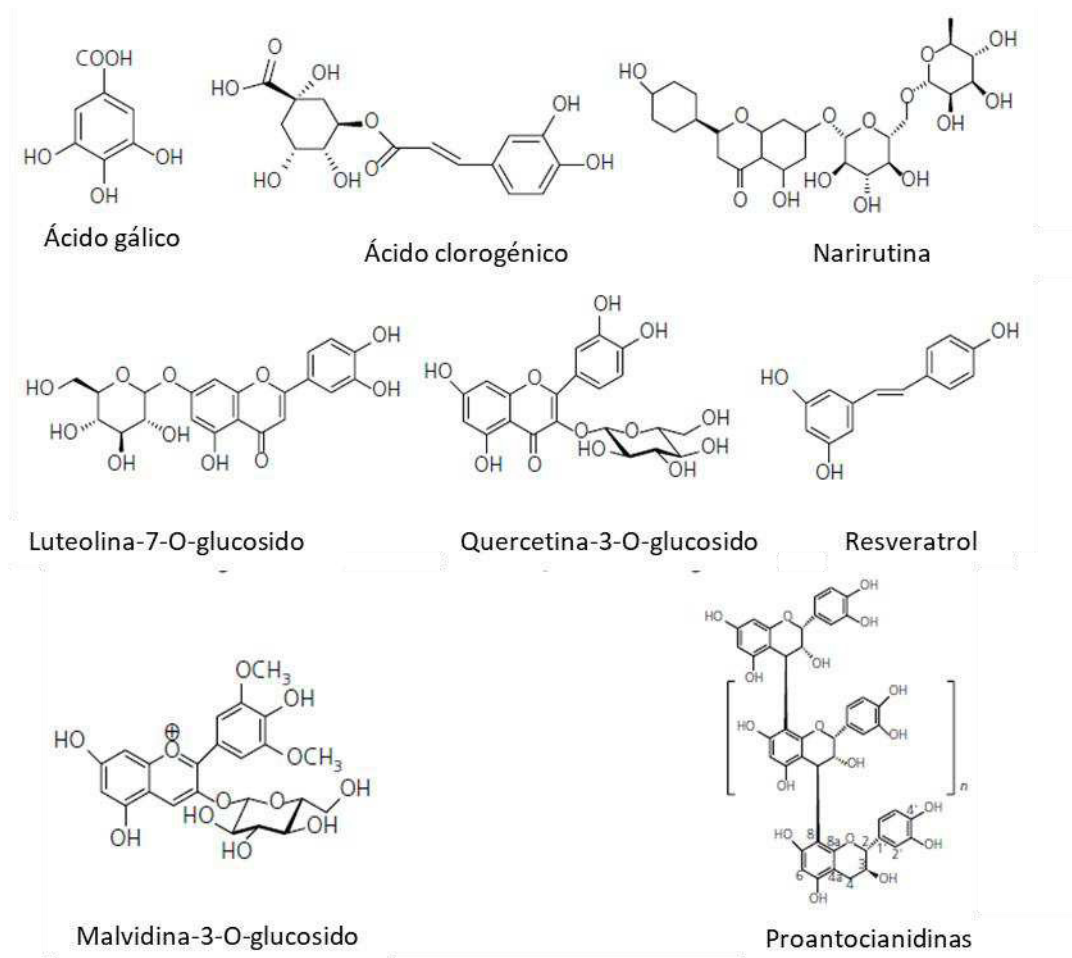


Figura 3. Ejemplos de polifenoles presentes en subproductos naturales (De Ancos et al., 2015).

Estos compuestos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unido y generalmente se clasifican en clases y subclases basadas en su estructura química (Crozier 2009). En subproductos frutales y vegetales una de las cuatro clases principales de polifenoles que se pueden encontrar son ácidos fenólicos, que a su vez, son divididos en hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, dentro de los cuales se incluyen ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido cafeíco, ácido clorogénico, ácido ferúlico y ácido sinápico. Los lignanos y estilbenos también cuentan como principales polifenoles presentes en subproductos vegetales y frutales, pero los flavonoides (sustancias fenólicas hidroxiladas) son los compuestos fenólicos más numerosos en plantas presentes como metabolitos secundarios sintetizados por la vía fenilpropanoide con estructura benzo-gama-pirona.

La naturaleza química de los flavonoides depende de la clase de estructura que presenten, el grado de hidroxilación y otras sustituciones y conjugaciones, además del grado de polimerización (Heim et al., 2002).

La estructura química básica de un flavonoide es un polifenol constante de 15 átomos de carbono consistiendo en dos anillos de benceno (A y B mostrados en la **Figura 4**) unidos mediante un anillo pirano heterocíclico (C mostrado en la **Figura 4**). Su esqueleto puede ser representado como C6-C3-C6. La siguiente figura ilustra la numeración de la estructura de un flavonoide (Naithani et al., 2008).

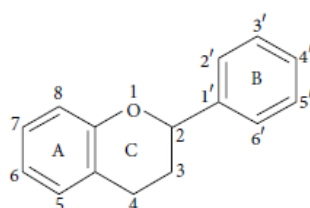


Figura 4. Estructura básica de un flavonoide (Pandey y Kumar, 2013).

Posteriormente este puede ser clasificado en flavonoles, flavones, flavonones, isoflavones, antocianidinas, cumarinas y chalconas basados en los patrones de oxidación y sustitución de los anillos de carbono (Naithani et al., 2008; Shan 2016). La **Figura 5** muestra algunos ejemplos de dicha clasificación.

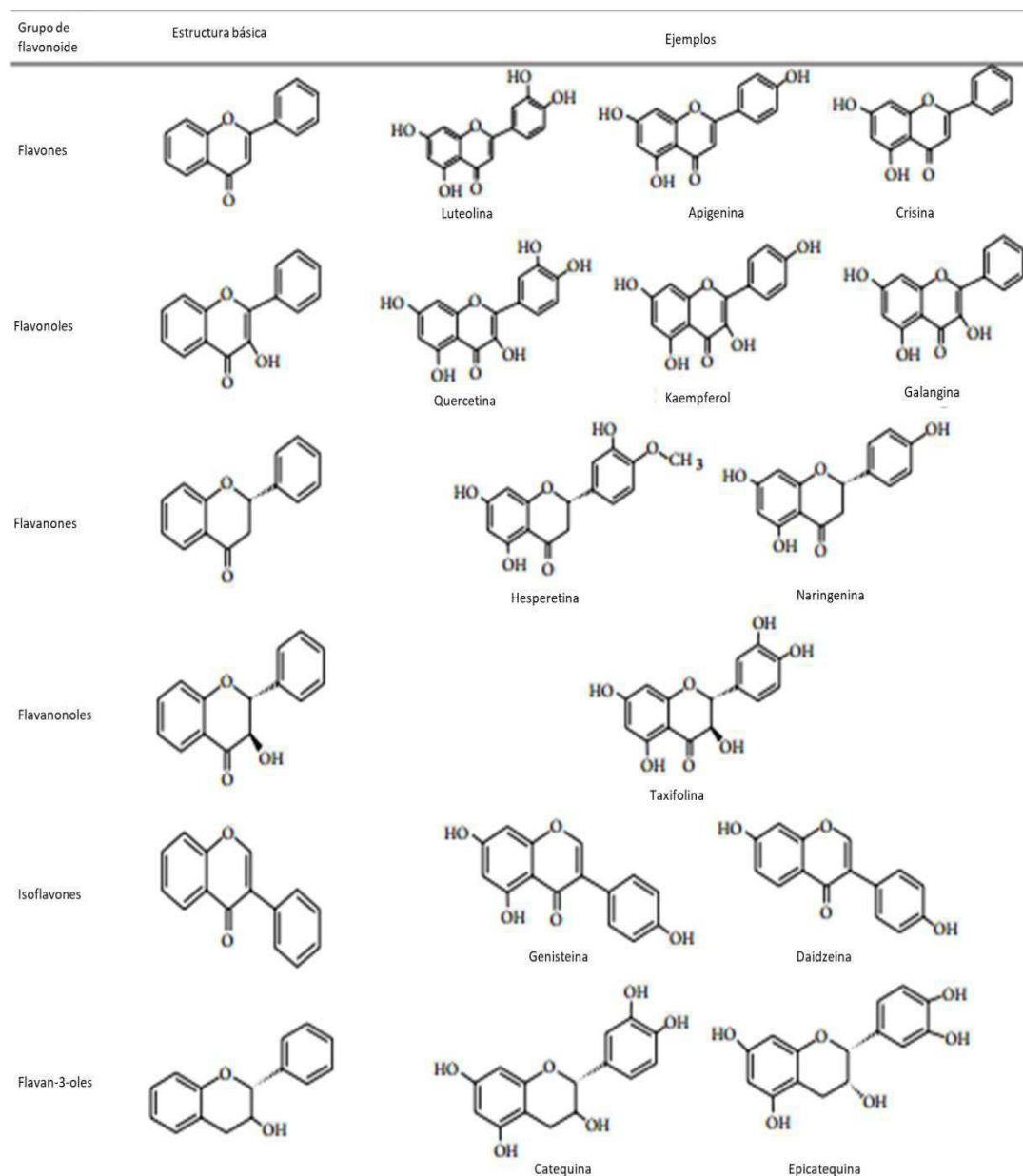


Figura 5. Ejemplos de flavonoides según su clasificación (Shan 2016).

2.6 Actividades biológicas de extractos polifenólicos de subproductos naturales

Los extractos polifenólicos naturales han sido usualmente asociados a diferentes propiedades bioactivas, una de ellas es la actividad antimicrobiana. Leouifoudi et al., evaluaron la actividad antimicrobiana de un extracto polifenólico derivado de subproductos de aceituna contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis* encontrando que este extracto mostraba un espectro antibacterial significativo contra estos microorganismos (Leouifoudi et al., 2015).

Los extractos de subproductos derivados de Anís también han mostrado actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas farmacoresistentes (Ibrahim et al., 2017). Existen antecedentes que demuestran también la actividad antiparasitaria de extractos derivados de subproductos naturales, Teichmann et al., (2016) por ejemplo, encontraron que los extractos crudos de diferentes subproductos naturales obtenidos por la industria alimenticia poseían actividad contra *Cryptosporidium parvum*. Mientras que Kabir et al., (2015) han demostrado la actividad antioxidante del extracto acuoso de semillas de uva y el extracto etanólico de cáscara de piñón.

2.7 Actividad antiviral de polifenoles

Existen antecedentes que demuestran la actividad antiviral contra diferentes virus de RNA como de DNA por parte de diferentes polifenoles. En la **Tabla 2** se mencionan algunos ejemplos.

Tabla 2. Actividad antiviral de polifenoles

Polifenol	Actividad antiviral	Referencia
Baicaleina	Anti-DENV; Anti-HCMV	Zandi et al., 2012; Evers et al., 2005
Quercetina	Anti-DENV; Anti-HSV-1, Anti-poliovirus tipo I, Anti-parainfluenza tipo 3, Anti-RSV	Zandi et al., 2011; Kaul et al., 1985
Narasina	Anti-DENV	Low et al., 2011
Metoxiflavones	Anti-picornavirus	Santhosh y Mishra, 1996
Isoflavona	Anti-Newcastle	Takatsuki et al., 1969
Epicatequina Galatoepicatequina Galangina Kaempferol	Anti-HSV-1	Lyu et al., 2005
Crisina Acacetina Apigenina	Anti-HIV-1	Critchfield et al., 1996
Catequina	Anti-RSV, Anti-HSV-1	Kaul et al., 1985
Apigenina	Anti-EBV; Anti-enterovirus 71	Wu et al., 2017; Qian et al., 2015
Quercetina	Anti-CDV	Carvalho et al., 2013

Morina		
Rutina		
Hesperidina		
Chalconas	Anti-HIV	Deng et al., 2006

2.8 Actividad antiviral de polifenoles derivados de productos naturales

Además de la presencia de actividad antiviral respecto a polifenoles en general, existen antecedentes que demuestran que estos compuestos derivados de productos naturales también poseen tal actividad contra diferentes virus.

Lin et al., (2013) reportan que los taninos hidrolizables ácido quebulágico y punicalagina derivados de *Terminalia chebula* tienen la capacidad de inhibir la interacción entre glicosaminoglicanos de superficie celular y glicoproteínas virales de citomegalovirus humano (HCMV), hepatitis C (HCV), virus del dengue (DENV), virus respiratorio sincitial (RSV) y el virus de sarampión (MeV). Mientras que para herpes simple tipo 1 (HSV-1) observaron que tienen la capacidad de inactivar las partículas virales previniendo su interacción con la superficie celular.

Respecto al virus de influenza Song et al., (2005) han encontrado que las catequinas, presentes como mayor compuesto polifenólico en el té verde pueden alterar la infectividad de los virus mediante la interacción específica con las hemaglutininas virales e intervenir también en la síntesis de RNA en la células huésped. Estos compuestos también son capaces de inhibir la actividad endonucleasa de la RNA polimerasa viral de influenza A (Kuzuhara et al., 2009) y se ha demostrado que poseen una fuerte actividad anti-influenza H1N1 A/NES/33 (Lee et al., 2012).

También existen antecedentes para el virus de coxsackie subgrupo B 1 donde Chiang et al., (2005) han demostrado que la apigenina derivada de la hierba popular culinaria y medicinal *Ocimum basilicum* (albahaca dulce) posee actividad antiviral. Contra respiratorio sincitial (RSV) Huang et al., (2010) han encontrado que tres bioflavonoides llamados genkwanol B, genkwanol C y esteleranol extraídos de *Radix wikstroemiae* poseen actividad y Wang et al., (2012) encontraron que los flavon 6-C-monoglicosidos de las hojas de *Lophatherum gracile* también pueden inhibir la infección por dicho virus.

Phrutivorapongkul et al., (2003) han demostrado que las chalconas derivadas de *Millettia leucantha* KURZ (Leguminosae) tienen actividad antiviral contra HSV y Likhitwitayawuid et al., (2006) demostraron la actividad anti-HSV de compuestos fenólicos aislados del duramen de *Artocarpus gomezianus*.

Lin et al., (2013) reportan que los taninos hidrolizables de *Terminalia chebula* actúan como agentes antivirales de amplio espectro contra varios virus incluyendo el virus del dengue (DENV) mediante la inactivación directamente de las partículas libres de DENV, interfiriendo así con el anclaje y fusión durante la entrada viral.

Ho et al., (2009) encontraron que la galato-epigallocatequina extraída del té verde interfiere con la replicación de enterovirus 71 mediante la modulación de un ambiente celular redox.

Respecto al virus de sarampión se ha encontrado que bioflavonoides aislados de *Rhus succedanea* y *Garcinia multiflora* tienen la capacidad de inhibir la infección del virus de manera *in vitro* (Lin et al., 1999; Parker et al., 2007) y que dos taninos, ácido quebulagico y punicalagina también han mostrado robustos efectos contra su infección, particularmente inactivando las partículas virales, interrumpiendo así la unión y fusión durante la fase de entrada viral y previniendo el esparcimiento del virus post-infección (Lin et al., 2013). Existen también antecedentes de extractos herbales como el Shengma-Gegen-Tang con actividad contra el virus de sarampión (Huang et al., 1997) mediante la estimulación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa).

La mayoría de los antecedentes de polifenoles de productos naturales encontrados se presentan contra el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), tal es el caso de la investigación llevada a cabo por Chiang et al., (2003) donde han encontrado que flavonoides extraídos de *Caesalpinia pulcherrima* poseen actividad antiviral contra HIV durante las primeras etapas del ciclo viral. Los taninos derivados de *Terminalia triflora* por ejemplo, han demostrado poseer un efecto inhibitorio en la acción polimerasa y ribonucleasa de la transcriptasa reversa (RT) del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) (Martino et al., 2002). Y Creagh et al., (2001) encontraron que el calanolido A, una arilcumarina aislada del árbol *Calophyllum lanigerum* en Malasia es un inhibidor de transcriptasa reversa no nucleósido con potente actividad anti-HIV. La baicalina obtenida de *Scutellaria*

baicalensis, una droga medicinal tradicional china y japonesa perteneciente a las siete plantas medicinales constituyentes del Sho-Saiko-To (Ohtake et al., 2004) también ha presentado actividad anti-HIV inhibiendo su replicación en células sanguíneas periféricas mononucleares de manera dosis dependiente (Kitamura et al., 1998; Li et al., 1993). Inhibe también la fusión mediada por la glicoproteína Env con los receptores CD4/CXCR4 y CD4/CCR5T (Li et al., 2000) e induce selectivamente apoptosis en células infectadas (Wu et al., 1995). Tewtrakul et al., (2002) encontraron que el kaempferol y quercetina de hojas de *Thevetia peruviana* exhiben una apreciable actividad inhibitoria de RT de HIV y Mahmood et al., (1993) determinaron que la epicatequina y epicatequina-3-O-galato extraídas de *Detarium microcarpum* bloquean la infección de HIV mediante una interacción irreversible con la glicoproteína gp120. El tetrahidroxiflavonol kaempferol extraído de *Rosa damascena* reduce la maduración de progenie viral infecciosa debido a su inhibición selectiva de proteínas virales de HIV (Hussein et al., 1999). Y el flavonoide glucurónido, apigenina 7-O-beta-D-(4'-caffeoyl) glucurónido aislado de flores de *Chrysanthemum morifolium* ha mostrado una fuerte actividad inhibitoria de integrasa en HIV-1 (Lee et al., 2003). Los flavonoides 4,6-dihidroxi-2-metoxi-3-metil-5(3'-hidroxi)-cinamoilbenzaldehido (una chalcona) y lawinal (una flavanona) aisladas de *Desmos* spp. inhiben la replicación de HIV (Wu et al., 2003). Y Yamaguchi et al., (2002) han demostrado que los galato-epigallocatequinas (EGCG) extraídos también de té verde destruye los viriones de HIV-1 mediante su unión a la superficie de la envoltura viral deformando los fosfolípidos, inhibiendo de manera dosis-dependiente la entrada del virus.

2.9 Actividad antiviral de polifenoles derivados de subproductos naturales

Se ha reportado que los subproductos de origen vegetal son ricos en compuestos fitoquímicos, los cuales podrían ser convertidos en productos de alto valor con aplicaciones en diversos campos biotecnológicos, como productos farmacéuticos, alimentos y cosméticos. Dentro de estos subproductos se encuentran cáscaras, semillas, bagazos, orujos, palos, frutos o vegetales completos, orujos etc. Havsteen et al., (2002) mencionan que las proantocianidinas derivadas de semillas de uva poseen

una prometedora actividad anti-HIV y Nair et al., (2002) han encontrado que disminuyen la expresión de co-receptores de HIV como CCR2b, CCR3, y CCR5.

Los subproductos derivados del té verde presentan catequinas y Lee et al., (2012) han demostrado su actividad anti-influenza en ratones y pollos donde al menos en ratones, la administración oral reduce los títulos virales en los pulmones durante las etapas tempranas de la infección, pero no los protegían de la enfermedad y la muerte. En cambio, su administración terapéutica vía alimentación o en agua resultaba en un efecto antiviral significativo dosis-dependiente en pollos siendo la dosis más efectiva de 10g/kg, por lo cual este estudio demuestra que los extractos derivados de subproductos del té verde son antivirales anti-influenza prometedores para animales.

2.10 Generalidades de productos y subproductos del genero

Citrus

Las especies del género *Citrus* pertenecen a la familia *Rutaceae* la cual incluye frutas como naranja, mandarina, lima, limón y toronja (Rafiq et al., 2016) y es el cultivo más importante a nivel mundial y su principal uso en las industrias incluye el jugo fresco y bebidas preparadas. Prácticamente el 40% de las frutas cítricas va a la producción de jugos. Durante la producción de jugos de cítricos, aproximadamente el 50-60% del peso se considera como subproducto. Los principales subproductos derivados del procesamiento de cítricos es el fruto completo descartado en el proceso de selección, las cáscaras, pulpa y semillas. Siendo la cáscara de los productos cítricos el subproducto principal, el cual representa el 50% del peso de la fruta fresca. La cáscara de los productos del género *Citrus* tradicionalmente se seca y se usa como alimento para animales (Bocco et al., 1998). Hoy en día la cáscara de productos cítricos es un recurso importante de valiosos productos como compuestos saborizantes volátiles usados en industrias cosméticas y de perfumes, compuestos fenólicos y carotenoides y fotoquímicos como limonoides y terpenoides oxigenados. (Djilas 2009; Lagha-Benamrouche y Madani 2013; Joshi et al., 2012; Manthey y Grohmann, 2001).

La producción mundial de productos cítricos es más de 88 x10⁶ toneladas y un tercio de este cultivo es procesado (Izquierdo y Sendra, 2003). A nivel mundial sus desperdicios se estiman en más de 15 x10⁶ toneladas, siendo el 50% de la masa total

del fruto completo, y son explotados por la industria química para extraer flavonoides y aceites esenciales (Marin et al., 2007).

En el 2011 se produjo 131.20 millones de toneladas de productos cítricos siendo China el principal productor con 29.99 millones de toneladas, seguido de Brasil (22.01 millones de toneladas) y Estados Unidos (10.70 millones de toneladas). También hay una remarcable producción en países mediterráneos como España (5.77 millones de toneladas), Italia (3.84 millones de toneladas) y Egipto (3.73 millones de toneladas) (FAO 2011).

Citrus limon es el tercero más importante dentro de las especies de *Citrus*. Muchos estudios han apuntado al limón como importante fruto promotor de la salud rico en compuestos fenólicos. La red de producción del limón genera altas cantidades de desperdicios y sub-productos siendo la cáscara de limón entre el 50 a 65% del peso completo del fruto, constituyendo el principal subproducto derivado del limón (González-Molina et al., 2010). Estos subproductos constituyen un importante recurso con potencial de alimento animal, alimentos manufacturados y cuidado de la salud. Dentro de los componentes químicos importantes presentes en *Citrus limon* se encuentran compuestos fenólicos (principalmente flavonoides) y otros nutrientes y no nutrientes como vitaminas, minerales, fibra dietética, aceites esenciales y carotenoides (González-Molina et al., 2010).

2.10.1. Polifenoles derivados del genero *Citrus*

Más de 60 flavonoides han sido identificados en especies del género *Citrus* y la mayoría de ellos han sido clasificados en 3 grupos: flavanones, flavones y flavonoles (Benavente-García et al., 1997; Macheix et al., 1990) aunque también se ha encontrado ácidos fenólicos.

Los flavanones son la clase más abundante de flavonoides en los productos cítricos (98% en toronjas, 96% en limas y 90% en limones, Peterson et al., 2006) son ácidos débiles y pueden ser fácilmente convertidos en chalconas isoméricas en medio alcalino o ácido (Tomas-Barberan y Clifford, 2000). Su estructura química es casi específica para cada especie, lo cual los pone como una especie de marcador para identificar los jugos comercialmente adulterados (Calabrò et al., 2004; Mouly et al., 1994).

Si comparamos la cáscara con su porción comestible de los productos cítricos, esta contiene incluso mayores cantidades de flavonoides que la porción comestible (Manthey y Grohmann, 2001; Wang et al., 2014). Gorinstein et al., (2001) encontraron que el total de compuestos fenólicos en cáscara de limón, naranjas y toronjas era 15% mayor que la pulpa de estas frutas. La **Tabla 3** muestra el contenido total de contenido fenólico en cáscaras de naranjas, limones y toronjas comparado con el de estos mismos frutos pero sin cáscara (Gorinstein 2001).

Tabla 3. Comparación del contenido de fenoles totales, ácidos fenólicos y actividad antioxidante total en cáscara de diferentes frutos del género *Citrus* y el fruto sin cáscara
(De Ancos et al., 2015).

Variedad	Fenoles totales*	Ácido ferúlico*	Ácido sinápico*	Ácido p-cumárico*	Ácido cafeico*	TRAP**
Naranja sin cáscara	154±10.2	34.1±3.1	30.71±3.1	24.10±2.2	8.10±0.8	2111±199
Cáscara de naranja	179±10.5	39.2±4.0	34.40±3.1	27.90±2.5	9.50±0.8	3183±311
Limón sin cáscara	164±10.3	38.8±4.1	36.40±3.1	31.30±3.1	12.10±0.8	4480±398
Cáscara de limón	190±10.6	44.9±4.2	42.10±4.1	34.90±3.4	14.20±1.3	6720±601
Toronja sin cáscara	135±10.1	27.1±3.0	27.30±2.9	10.80±1.1	5.0±0.5	1111±102
Cáscara de toronja	155±10.3	32.3±3.1	31.90±3.0	13.10±1.3	5.6±0.5	1667±161

*mg/100g de peso fresco **TRAP, captura total de radicales potencial antioxidante

Si comparamos la cáscara con otros subproductos cítricos como las semillas, se ha encontrado que la cáscara es más rica en flavonoides que las semillas (Tripoli et al., 2007). Esta cáscara es rica en neo-eriocitrina, neohesperidina, naringina y tiene pocas cantidades de narirutina (Baldi et al., 1995; Bocco et al., 1998; Kawaii et al., 1999; Wang 2008). También se ha identificado quercetina, kaempferol, iso/limocitrol 3-beta-glucosido, limocitrin 3-beta-d-glucosido y limocitrol como flavonoles polimetoxilados (Dugo et al., 2005; Gentili y Horowitz, 1964; Li et al., 2014) mientras que la semilla contiene eriocitrina y hesperidina más abundante y pocas cantidades de naringina. Limonina, nomilina y nomilina también han sido identificados en subproductos cítricos (Djilas 2009).

Algunos factores que pueden influir en las concentraciones de flavonoides en los frutos del limón depende del cultivar, el estado de madures (González-Molina et al., 2008; Vandercook y Tisserat, 1989; Baldwin 1993; Lallan et al., 2002) o al tipo de fruto dentro del género *Citrus*, por ejemplo: la hesperdina es la principal flavanona en las naranjas, localizándose en cáscara; la naringina es la flavanona predominante en toronjas (Ameer et al., 1996); las cáscaras de limón contiene hesperitina y eriocitrina (eriodictiol 7-rutinosido) (Macheixet al., 1990).

2.10.2. Actividades biológicas de polifenoles derivadas del género *Citrus*

Las frutas cítricas, los extractos de estas frutas y sus flavonoides exhiben un amplio rango de propiedades biológicas debido a su perfil fenólico y antioxidante (Middleton y Kandaswami, 1994; Montanari et al., 1998). Varios ejemplos sobre el uso de las frutas del género *Citrus* como remedios terapéuticos pueden ser citados: naranjas para curar el escorbuto (Magiorkinis et al., 2011), jugos de naranja, lima y limón como remedios para la prevención de formación de piedras en el riñón (Pak 2004), toronjas como agentes capaces de bajar la presión arterial e interferir con bloqueos en los canales de calcio (Sica 2006), flavonoides presentes en productos del género *Citrus* como agentes efectivos a nivel *in vivo* para modular el metabolismo de lípidos en el hígado (Cha et al., 2001), jugo de naranja para prevenir y modular los procesos inflamatorios (Coelho et al., 2013) jugo de toronja con efectos antígenotóxicos (Álvarez-González et al., 2010) entre otros.

La cáscara es un importante recurso de flavonoides con un amplio rango de efectos biológicos como antioxidante donde se ha visto que incrementan la capacidad antioxidante del suero contra la peroxidación lipídica (Assini et al., 2013), también se ha observado su actividad anticancerígena como suplemento de drogas quimioterapéuticas (Meiyanto y Hermawan, 2012) y antiinflamatoria (Romagnolo y Selmin, 2012; Park y Pezzuto, 2012), antiaterosclerosis (Mulvihill y Huff, 2012), antidiabetes (Aruoma et al., 2012), neuroprotectora (Hwang et al., 2012) y antiviral (Harborne 2000).

2.10.3. Actividad antiviral de polifenoles derivados de productos y subproductos del género *Citrus*

El género *Citrus* posee actividad antiviral contra diferentes virus como Newcastle o influenza A (Rezatofighi et al., 2014; Joo y Lee., 2005). Biskind y Martin (1954) han

utilizado flavonoides derivados de Citrus como terapia para el virus de influenza. Balestrieri et al., (2011) han encontrado que la limonina de semillas de *Citrus bergamia* posee la actividad contra HTLV-1 y HIV-1 y Xu et al., (2014) han observado actividad antiviral contra el virus respiratorio sincitial por parte de flavonas polimtoxilados derivados del pericarpio de *Citrus reticulata* “Chachi”.

2.11 Generalidades de productos y subproductos de *Vitis vinífera*

Las uvas son un cultivo importante a nivel mundial, con una producción de 58.5 millones de toneladas en el 2011. Siendo el primer productor China con 9.17 millones de toneladas, seguido de Estados Unidos con 6.75 millones de toneladas y países mediterráneos como Italia con 7.11 millones de toneladas, Francia con 6.58 millones de toneladas y España con 5.80 millones de toneladas. Uno de los productos generados a partir de las uvas es el vino y durante su producción más del 40% de la uva termina como subproducto. Dentro de estos subproductos se incluyen pulpa, semillas, orujo, bagazos, tallos y hojas (Cheynier, 2006, 2012, 2013) que son considerados desperdicios y se generan en gran cantidad (alrededor de 5-9 toneladas por año a nivel mundial). Esto incrementa considerablemente la demanda de oxígeno químico (COD) y bioquímico (BOD) de la atmosfera debido a la fermentación de estos desperdicios como parte de su descomposición, además de ser nocivos para la flora y fauna en las zonas de descarga (Djilas et al., 2009). Sin embargo, estos subproductos son ricos recursos de compuestos fenólicos antioxidantes baratos, las semillas de *Vitis vinífera* por ejemplo, son ricas en compuestos activos, especialmente polifenoles, representando un recurso generoso y disponible para la obtención de nuevas biopreparaciones activas con valoración agrícola, biomédica y ecológica. De tal manera que las semillas desperdiciadas de la industria vinícola se convierten en un recurso natural útil para la obtención de algunos bioproductos con capitalización práctica, ya sea como fertilizante, antimicrobiano, antifúngico, citostático, inmunomodulador y agentes antioxidantes, etc. Siendo además el impacto ambiental un objetivo importante a tomar en cuenta.

2.11.1. Polifenoles derivados de productos y subproductos de *Vitis*

vinífera

Los subproductos de uva como semillas y orujo derivados de la producción de jugo de uva y vino también son recurso de muchos compuestos fenólicos, particularmente mono, oligo y polimeriproantocianidinas (Shrikhande, 2000). Son ricos principalmente en antocianinas, catequinas, procianidinas, flavonoles glicósidos, ácidos fenólicos y estilbenos (Yu, 2013; Djilas et al., 2009).

Su composición fenólica varía considerablemente dependiendo de la variedad de la uva, el cultivar y la tecnología utilizada para producir el vino, el área donde crece, el clima y la maduración de la uva (Cantos et al., 2002; Friedman 2014).

Otro factor que puede determinar el tipo de compuesto polifenólico encontrado puede ser la parte de la uva de la que sea extraído, en semilla por ejemplo se encuentra ácido gálico, catequina, epicatequina, procianidina dimérica y proantocianidinas (Pastrana-Bonilla et al., 2003; Hernandez-Jimenez et al., 2009; Bell et al., 2000; Huang et al., 2005), en hojas miricetina, ácido elágico, kaempferol, quercetina y ácido gálico (Pastrana-Bonilla et al., 2003), en tallo rutina, astilbina (Makris et al., 2008) y en hollejo proantocianidinas, ácido elágico, miricetina, quercetina, kaempferol y trans-resveratrol (Pastrana-Bonilla et al., 2003; Hernandez-Jimenez et al., 2009).

2.11.2. Actividades biológicas de polifenoles derivados de *Vitis vinífera*

Se sabe que *Vitis vinífera* L. posee diferentes actividades biológicas entre ellas antifúngicas, contra la levadura *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*, antimicrobianas contra Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* y Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. También se le ha encontrado efecto antioxidante (Orhan et al., 2009). Burin et al han encontrado que la capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de *Vitis vinífera* variedad Sauvignon y Merlot y *Vitis labrusca* variedad Bordô y Concord estaba fuertemente correlacionada con el contenido de trans-resveratrol (Burin et al., 2014). También se ha observado que los polifenoles de *Vitis vinífera* variedad Petite Sirrah posee actividad antiaterosclerosis (Frankel et al., 1993) y se han visto otros beneficios contra estrés crónico y agudo, dolor gastrointestinal, desórdenes neurológicos (Goldberg y Soleas, 2011; Guilford y Pezzuto, 2011; Catalgol et al.,

2012; Del Rio et al., 2013), pancreatitis y carcinogénesis. Se ha reportado una significativa citotoxicidad contra células de adenocarcinomas de mama, pulmón y gástricas, así como proliferación y viabilidad de células normales (Bagchi et al., 2002, 2014; Mihai et al., 2016).

2.11.3. Actividad antiviral de *Vitis vinífera*

Se ha observado que el resveratrol extraído de uva inhibe irreversiblemente la replicación de adenovirus (Matias et al., 2010) y se ha visto que este compuesto también es capaz de reducir la replicación de DNA de citomegalovirus (Campagna y Rivas, 2010).

2.12 Efecto de combinaciones de polifenoles y fármacos antivirales comerciales

La combinación de quimioterapia antiviral puede ofrecer ventajas por encima de un solo agente antiviral, incrementando la eficiencia, potencial y retrasando la emergencia de un virus resistente (Wijesekara et al., 2011).

La quimioterapia en combinación con agentes antivirales sinergistas tienen diferentes puntos blanco para la replicación viral, lo que puede ofrecer ciertas ventajas en lugar de tratar solo con un agente antiviral, como una mayor potencia, superior eficiencia clínica, reducción de la toxicidad y efectos secundarios debido a la reducción de la dosis necesaria de la droga, supresión de emergencia de cepas resistentes a la droga, además de resultar más económicos (Vlieghe et al., 2002).

Se ha observado efecto sinérgico entre la mezcla de polifenoles, como kaempferol y luteolina que mostraron un efecto sinérgico contra el virus de HSV y se ha sugerido ser más activo que el componente de manera individual (Amoros et al., 1992). El sinergismo se ha mostrado incluso entre flavonoides y otros agentes antivirales. Se ha reportado que la quercetina tiene la capacidad de potencializar los efectos de 5-etil-2-dioxiuridina y Aciclovir contra HSV y pseudorabia (Gegova et al., 1993; Haidari et al., 2009; Serkedjieva et al., 2010).

2.13 Generalidades del virus de sarampión

Pertenece a la familia de los Paramyxoviridae, al género de los Morbillivirus, que agrupa a los virus del moquillo canino, virus de la peste bovina, virus de los

pequeños rumiantes, morbillivirus de los fócidos y al morbillivirus de los delfines. Es un virus de RNA de una sola cadena de polaridad negativa (complementaria a los RNA mensajeros) que forma nucleocápside helicoidal recubierta de membrana de origen celular (Flint et al., 2015).

El genoma de los virus del sarampión es una molécula de RNA de 15, 984 nucleótidos, codifica para las proteínas estructurales: N (nucleocápside); P (fosfoproteína); L (polimerasa); M (matriz); H (hemaglutinina) y F (fusión), que se incorporan a las partículas víricas, y otras no estructurales las V y C que son codificadas por el gen *P* mediante edición del RNA y cambio en el marco de lectura respectivamente y contrarrestan la respuesta de interferón del huésped (Ito et al., 2013). Dos proteínas en la membrana de envoltura son importantes para su patogénesis, siendo una de estas la proteína F, que es responsable de la fusión del virus con la membrana de la célula huésped, la penetración viral y la hemólisis. Y por otro lado, está la proteína H, la cual es responsable de la adsorción del virus en las células (Flint et al., 2015) (**Figura 6**).

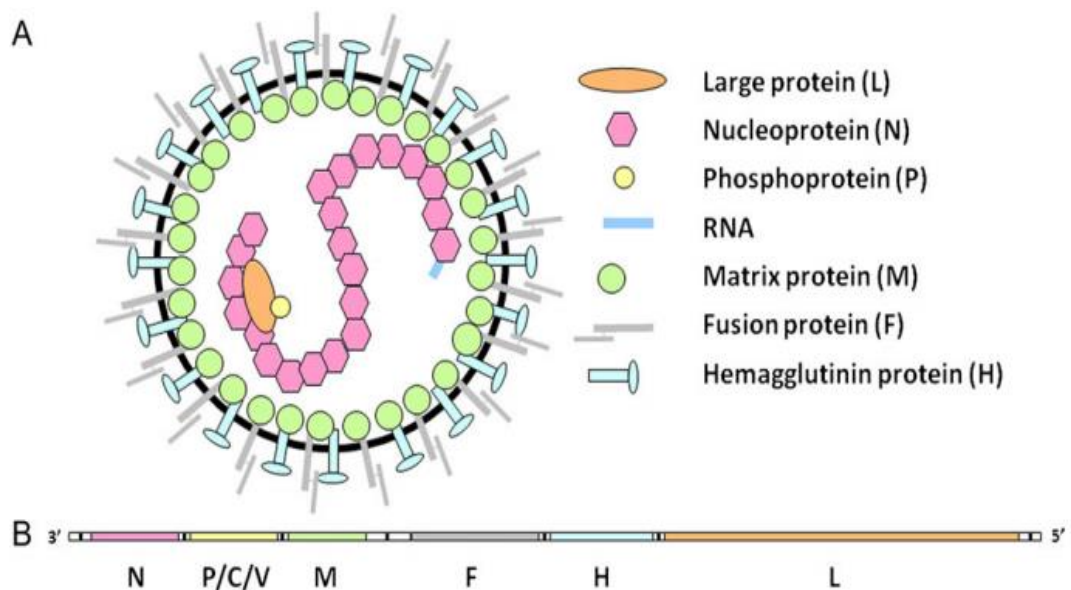


Figura 6. A) Representación esquemática del virion de sarampión. B) Organización del genoma del virus de sarampión. Los rectángulos coloreados representan las regiones codificantes y los rectángulos blancos las no codificantes, las barras negras representan trinucleótidos intergénicos. El tamaño de las regiones individuales no está a escala (Bankamp et al., 2015).

El genoma del virus de sarampión sufre una replicación propensa a errores como otros virus de RNA, pero con el tiempo, se ha mantenido antigénicamente monotípico. La tasa de mutación del virus de sarampión es aproximadamente de 1.8×10^{-6} por base por evento de replicación (Zhang et al., 2013). Las limitaciones en el virus que impiden la aparición de variantes antigénicas no están claras. La inmunidad desarrollada por el huésped depende del desarrollo de anticuerpos neutralizantes a las glicoproteínas hemaglutinina y de fusión. Fulton et al., (2015) sugieren que estas proteínas ocupan poco espacio evolutivo, por lo que tienen dificultades para cambiar frente a las presiones selectivas. Proponiendo que estas proteínas previenen la variación de secuencia requerida para escapar de la neutralización de anticuerpos por el huésped, permitiendo una larga inmunidad después de la infección viral.

2.14 Ciclo viral del virus de sarampión

La infección inicia una vez que se da la unión de la proteína de anclaje H (hemaglutinina) con los receptores principales SLAM o molécula de señalización para la activación de linfocitos, también llamada CD150 y el receptor 4 relacionado a poliovirus (PVRL4) también llamado nectina 4. El virus de sarampión también puede utilizar al cofactor proteico de membrana CD46 como receptor alternativo para llevar a cabo la adsorción del virus. Mientras que la proteína F (fusión) lleva a cabo la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula huésped para permitir la entrada del virus (Griffin et al., 2012).

La proteína F es una glicoproteína integral de membrana tipo I (el grupo amino terminal yace fuera de la membrana viral). Es sintetizada como un precursor llamado F0 que es cortada durante su paso por la superficie celular por una proteasa de la célula huésped para producir 2 subunidades, F1 y F2 unidas por un enlace disulfuro. El nuevo grupo amino terminal formado por 20 aminoácidos de la subunidad F1 es altamente hidrofóbico, formando una región llamada péptido de fusión. Estos cambios conformacionales en la proteína F pueden dejar al péptido de fusión en una posición expuesta, pudiendo tener contacto así con la membrana de la célula blanco (Flint et al., 2015).

Dado que las células infectadas expresan las glicoproteínas virales en la superficie celular, son capaces de fusionarse con células vecinas no infectadas produciendo

células gigantes multinucleadas denominadas sincicios. Sin embargo, no todo tipo de células infectadas forman sincicios. Se han observado de manera *in vivo* en células de pulmón, piel y tejido linfático, pero no en células del sistema nervioso central (Griffin et al., 2012).

Como resultado de la fusión entre la membrana plasmática y la membrana viral, la nucleocápside viral, una ribonucleoproteína que consiste en un genoma viral de RNA de sentido negativo asociado a las proteínas virales L (polimerasa) la cual contiene las actividades enzimáticas del complejo de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), la proteína N (nucleocápside) y la proteína P (fosfoproteína) es liberada en el citoplasma donde comienza la síntesis de RNA mensajeros. El complejo RdRp actúa tanto como transcriptasa viral y como replicasa (Flint et al., 2015; Griffin y Oldstone, 2009). El complejo de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) inicia la transcripción uniéndose a la región 3'UTR de la cadena de RNA negativa (genoma). A los mRNA sintetizados de cada gen se les agrega el "cap" y al final de cada gen viral hay una señal de paro hacia el extremo 5' en la cual RdRp produce una señal de poliadenilación mediante "tartamudeo" sobre un tramo de uracilos en el extremo 5' antes de liberar el mRNA. Para luego volver a iniciar la transcripción en la siguiente señal de iniciación, es decir lleva a cabo una "transcripción secuencial". Cada mRNA se traduce y la replicación de un genoma de longitud completa ocurre eficientemente solo después de la acumulación de proteínas virales, ya que la molécula de RNA naciente es inmediatamente encapsulada por la proteína N, así que debe haber cantidad suficiente de dicha proteína (Griffin y Oldstone, 2009). El complejo RdRp viral es probablemente el mismo para la replicación y para la transcripción. Puede ser transcriptasa y también puede convertirse en replicasa dependiendo de la concentración de nucleocápside.

El proceso de replicación viral del virus de sarampión involucra la producción de anti-genomas con sentido positivo, los cuales actúan como plantilla para la síntesis de nuevos RNAs genómicos de sentido negativo (Flint et al., 2015). El complejo de la RNA polimerasa dependiente de RNA se une a la región 3'UTR del genoma de RNA sentido negativo con capsido y comienza la replicación creando cadenas de RNA de sentido positivo también llamado antigenoma el cual es al mismo tiempo encapsidado durante la replicación. Para esto, el complejo de RNA polimerasa dependiente de RNA ignora todas las señales de transcripción cuando está en modo

de replicación. A partir de las cadenas de RNA de sentido positivo creadas, RdRp comienza a transcribir a partir de la región 3'UTR y crea nuevas cadenas de RNA de sentido negativo. Al mismo tiempo que las nuevas cadenas de RNA de sentido negativo son sintetizadas son encapsidadas. Los genomas de la progenie pueden ser usados después para la replicación, transcripción secundaria o su incorporación en partículas virales (Flint et al., 2015). Las proteínas de membrana viral alcanzan su destino mediante una vía secretora celular donde el primer punto de parada es el retículo endoplásmico rugoso. Como los procesos proteolíticos son necesarios para producir glicoproteínas de envoltura maduras, los precursores entran en esta vía. El lumen del retículo endoplásmico posee enzimas que catalizan las modificaciones químicas como la formación de enlaces disulfuro en los pasos iniciales del ensamblaje de las cadenas de los oligosacáridos (glicosilación). La glicosilación se lleva a cabo mediante la adición de asparagina (N-glicosilación) serina o treonina (O-glicosilación). La proteína posteriormente es transportada hacia el aparato de Golgi mediante un transporte de vesículas donde salen de un compartimiento a otro en una vía secretora. Cuando una vesícula de transporte se encuentra con la membrana blanco se desensambla como resultado de interacciones entre proteínas de fusión de membranas (Snare) presentes en la vesícula y en la membrana blanco. El complejo N-etilmaleimida-sensitiva (Nsf) y la proteína de anclaje soluble a Nsf (Snaps) preparan la fusión de membranas ensamblándose de manera regulada y yuxtaponiendo las membrana que se fusionarán (Griffin y Oldstone, 2009). Una vez dentro del aparato de Golgi ocurren reacciones específicas en cada uno de sus compartimientos. Las enzimas responsables de las reacciones tempranas de maduración de estos oligosacáridos se encuentran en las “cisternas cis” de la red cis del aparato de Golgi, mientras que las reacciones tardías se llevan a cabo en los “cisternas trans”. Dicha separación asegura que el procesamiento del oligosacárido siga una secuencia precisa conforme pasan a través del aparato de Golgi.

Las nuevas ribonucleocápsides sintetizadas son transportadas a sitios selectos de la membrana plasmática, donde ocurre la interacción con las glicoproteínas integrales de membrana viral, seguido del rompimiento de la membrana y liberación de las partículas virales mediante el complejo endosomal requerido para transporte (ESCRT, Griffin et al., 2012) (**Figura 7**).

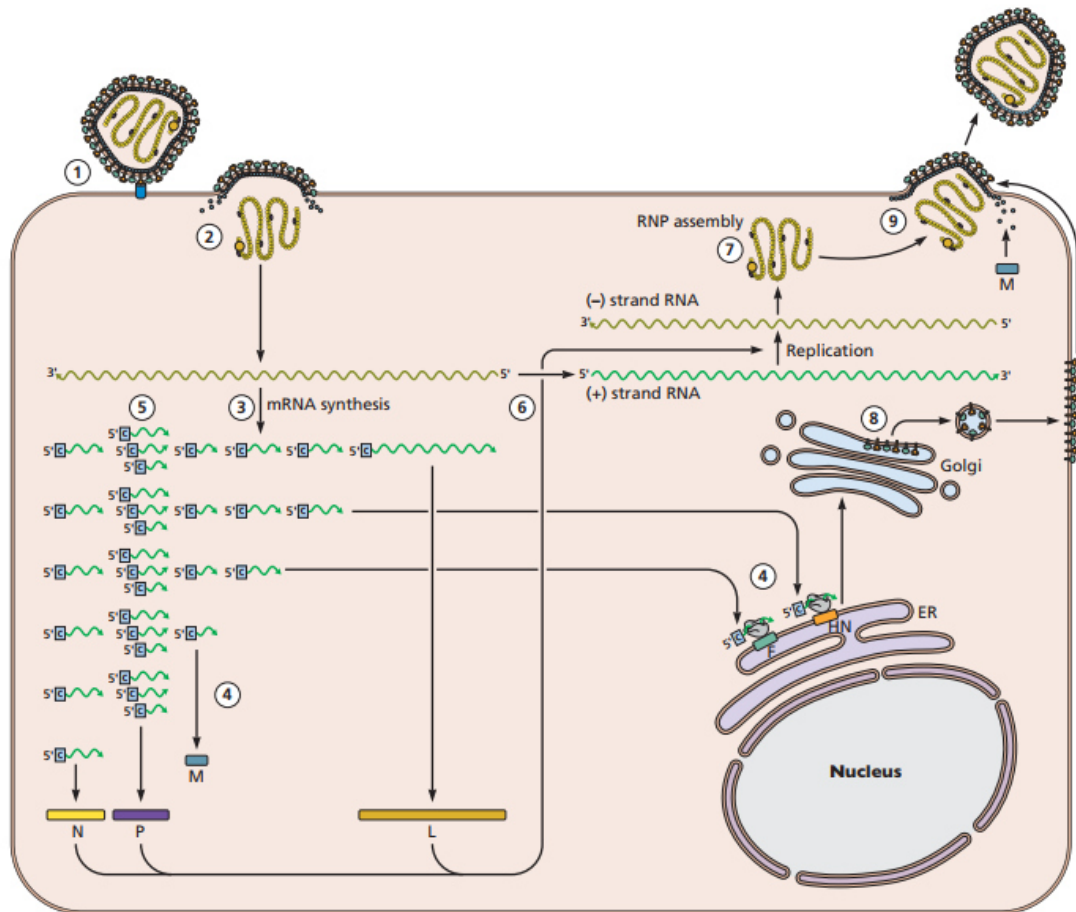


Figura 7. Representación esquemática del ciclo viral de sarampión (Flint et al., 2015)

2.15 Situación actual de casos reportados por el virus de sarampión a nivel mundial

Sarampión es una enfermedad viral altamente contagiosa que continúa siendo una de las principales causas de muerte en niños pequeños a nivel mundial a pesar de la disponibilidad de una vacuna segura y efectiva. Esta enfermedad se transmite mediante gotas de saliva expulsadas mediante la tos, estornudos y al hablar y mediante moco. Dentro de los síntomas que provoca están fiebre alta, escurreimiento nasal, ojos rojos y rash en la piel, pero las complicaciones clínicas más serias incluyen ceguera, encefalitis, diarrea severa, deshidratación e infecciones respiratorias severas como neumonía (WHO, 2017).

En el 2011 se reportaron 26,025 casos en el continente Europeo, de los cuales la mayoría de ellos se presentaron en Francia. Durante el mismo año se reportaron más de 103,000 casos en el continente africano y en América el último caso reportado había sido en el 2002 pero en el año 2011 se reportaron brotes relacionados a la

importación del virus desde otras regiones, alcanzando para al menos América Latina 75 casos.

En marzo del 2013 se presentaron 219 casos y 88 hospitalizaciones en el Reino Unido y a finales de ese mismo año 6497 casos y 23 muertes ocurrieron en Filipinas. Hasta mayo del año siguiente se presentaron 288 casos en Estados Unidos y para enero del 2015 el número de casos aumento debido a un brote generado por personas que contrajeron la enfermedad en el parque temático de Disneylandia (Zipprich et al., 2015).

Si bien es cierto que las muertes causadas por esta enfermedad han disminuido en años recientes a nivel mundial de 550,100 en el año 2000 a 89,780 en el 2016, sin embargo permanece en países en desarrollo, particularmente en partes de África y Asia al menos en lo que va hasta el mes de Octubre del 2017 (WHO, 2017) (**Figura 8**).

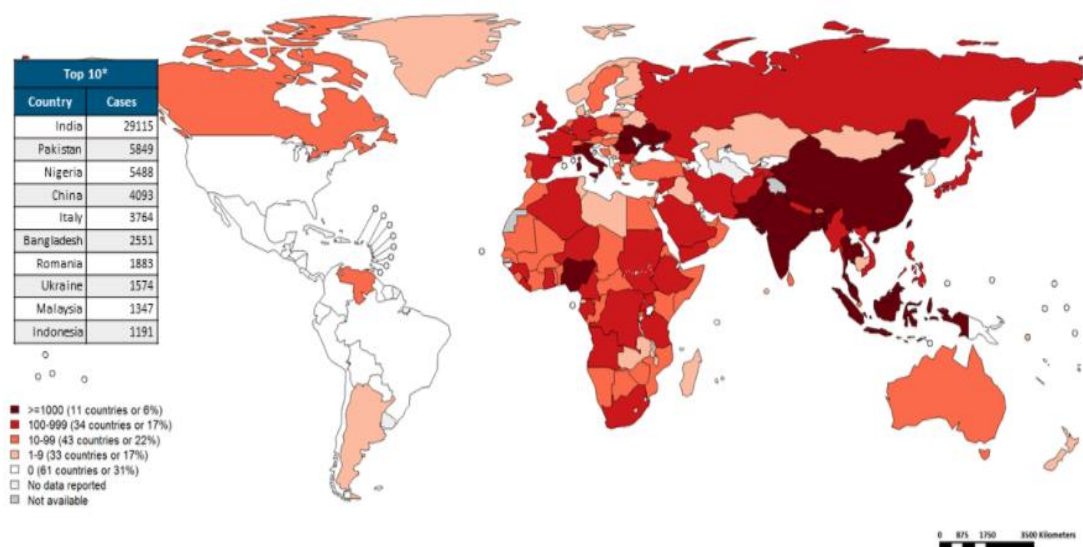


Figura 8. Mapa mundi representando el número de casos de personas infectadas con el virus de sarampión reportados a nivel mundial hasta el mes de Octubre del 2017 (WHO, 2017).

El centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) reporta 120 personas infectadas con el virus de sarampión dentro de 15 estados de los Estados Unidos dentro del periodo que va del primero de Enero hasta el 7 de Octubre del presente año. Además, mencionan que la mayoría de estas personas contrajo la enfermedad debido a que no estaban vacunados o a la realización de viajes internacionales (CDC, 2017)

2.16 Situación actual de casos reportados por el virus de sarampión en México

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) en su boletín semanal de sarampión y rubéola reporta 2.6 casos sospechosos por cada 100,000 habitantes para nuestro país (**Tabla 4**).

Tabla 4. Indicadores de vigilancia del sarampión y rubéola para el periodo entre las semanas 1-42 del año 2017 (OPS, 2017)

Subregión y País		% de sitios notificando semanalmente		% de casos con investigación adecuada	% casos con muestra de sangre adecuada	% de muestras de sangre que llegan al lab. <= 5 días	% de resultados de lab. <=4 días reportados	Tasa de casos sospechosos Últimas 52 semanas (2016/43-2017/42)	
		Total Unidades	%Actual					Sar./Rub. (100.000 pob.)	SRC (10,000 nv)
AND	BOL	3514	0	98	100	72	65	0.6	0.0
	COL	5212	97	75	97	86	96	2.4	12.3
	ECU	3208	0	96	100	83	86	1.5	0.0
	PER	7771	0	87	95	72	55	1.1	0.0
	VEN	13092	0	99	96	56	68	1.6	0.7
CAP	BRA	11660	79	62	58	58	54	0.7	0.2
	CRI	57	0	74	95	83	87	1.9	30.8
	GTM	1541	0	0	94	47	82	0.6	0.0
	HND	470	92	58	99	75	99	1.7	3.1
	NIC	185	100	85	100	94	90	3.5	6.4
	PAN	348	0	86	100	88	93	1.3	0.0
CAR	SLV	1256	0	72	94	97	91	3.3	0.0
	CAR	700	66	92	92	11	75	2.1	7.7
	CUB	168	0	100	100	100	100	15.0	0.0
LAC	DOM	247	0	2	97	50	56	1.1	0.0
	HTI	368	0	84	97	56	69	1.2	1.7
	MEX	20146	0	97	98	92	91	2.6	0.0
NOA	CAN
SOC	USA
	ARG	809	0	18	78	63	67	0.7	2.8
	CHL	783	86	34	80	83	98	0.9	8.0
	PRY	1159	0	80	98	89	96	7.1	0.2
	URY	335	0	0	0	0	0	0.0	0.0
Total y promedio*		73029	22	83	91	81	84	1.8	1.3

*ponderado

... No se recibió informe

Mientras que la Secretaría de Salud solo ha alertado a los mexicanos en diversos meses del presente año con avisos preventivos y epidemiológicos sobre casos reportados del virus de sarampión alrededor del mundo recomendando no hacer viajes a esas zonas o tomar las medidas preventivas necesarias (Secretaría de salud, 2017) pero no se encuentran reportes de casos actualmente en el país mediante dicha fuente.

2.17 Plan estratégico para la erradicación del virus de rubeola y sarampión

Para el año 2010, el impulso global para mejorar la cobertura de vacunación contra los virus de rubeola y sarampión resultó en una reducción de muertes del 74%. Los 194 miembros de la Organización Mundial de la Salud (WHO) continúan comprometidos a reducir las muertes por el virus de sarampión hasta un 95% para el año 2015 (WHO, 2012).

El plan hace hincapié en la importancia de una sólida inmunización sistemática con sistemas de campañas, la vigilancia de laboratorio, la preparación en caso de brotes así como la investigación y el desarrollo. Presenta claras estrategias para el control y eliminación del virus de rubeola y sarampión, el cual se busca alcanzar entre el año 2015 y el año 2020, dentro del cual, una de las metas es la investigación científica y desarrollo que apoyen operaciones económicas y efectivas (WHO, 2012).

A pesar del control exitoso a nivel global, el progreso busca la reducción en el número de casos y muertes dadas por el virus de sarampión el cual se estancó entre los años 2008 y 2010 debido a numerosos brotes de sarampión en África y Europa y un alta tasa de mortalidad aun continua en India. La investigación apoya las bases científicas de las estrategias, lo que comprende el desarrollo de nuevas estrategias de inmunización y herramientas de defensa efectivas (WHO, 2012).

Las localidades con alta densidad de población, las rutas de migración, así como la naturaleza de infección que presenta el virus de sarampión vuelven un reto el control y la eliminación del virus de sarampión. India tiene actualmente el número más alto estimado de casos y muertes debido a su baja cobertura de inmunización y la implementación incompleta de la vacuna (WHO, 2012).

Cuando los individuos ya no ven casos de una enfermedad previamente común, comienzan a creer que la vacuna no proporciona beneficios, por lo que los programas exitosos pueden comenzar a sufrir malos entendidos, donde la población tiene la percepción errónea de que los riesgos asociados a la vacuna podrían superar los invisibles beneficios de esta (WHO, 2012).

La responsabilidad para la eliminación del virus de sarampión no puede alcanzarse sin el compromiso y apoyo global de todos. Cada uno debería hacer uso de sus ventajas para apoyar al país a alcanzar las metas. Este apoyo puede ayudar a proveer de asistencia técnica, como el ámbito científico, por lo que la búsqueda de compuestos activos que puedan ser candidatos a fármacos antivirales podría contribuir a esta causa (WHO, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

El virus de sarampión es una enfermedad altamente contagiosa que continúa siendo una de las principales causas de muerte en niños en países sub-desarrollados a pesar de la existencia de una vacuna viva atenuada. Las campañas de vacunación han logrado disminuir el índice de personas infectadas, sin embargo, en la actualidad continúan presentándose casos a nivel mundial. En respuesta, la Organización Mundial de la Salud ha creado un plan estratégico para lograr el control y la eliminación del virus de sarampión y rubeola en un periodo que va del 2012 al 2020.

Dicho plan se enfoca en la implementación de componentes como alcanzar y mantener una alta cobertura de vacunación, monitorear la enfermedad mediante vigilancia efectiva, tener una rápida respuesta a los brotes y el tratamiento efectivo de los casos.

La FDA ha aprobado actualmente alrededor de 90 fármacos antivirales, sin embargo, estos presentan un estrecho espectro de actividad entre los cuales no se encuentra el virus de sarampión, tienen una limitada utilidad terapéutica y son altamente tóxicos.

Los productos naturales tienen una interminable variedad de constituyentes químicos y se ha observado que los subproductos naturales o de desecho generados mediante el procesamiento de productos naturales en la industria alimenticia poseen incluso mayor cantidad de metabolitos secundarios bioactivos que el producto de consumo en sí. Uno de estos compuestos son los polifenoles, los cuales ya se ha observado que poseen actividad antiviral pudiendo ser utilizados para inhibir la replicación de virus de DNA y RNA mediante diferentes mecanismos.

El desarrollo de agentes antivirales derivados de compuestos polifenólicos a partir de subproductos naturales sería un recurso de bajo costo para la población pudiendo ser aprovechados en lugar de ser considerados como desechos siendo además un valioso elemento que trabaje en conjunto con la vacuna existente. Aquellas poblaciones que sean infectadas con el virus tendrían así una alternativa como tratamiento además de colaborar a la erradicación de la enfermedad.

4. HIPOTESIS

Los extractos hidroalcoholicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales poseen actividad antiviral contra el virus de sarampión cepa Edmoston de manera individual o en combinación con ribavirina.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antiviral, el nivel de acción y el efecto combinado con Ribavirina de polifenoles derivados de subproductos naturales contra el virus de sarampión cepa Edmoston.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Realizar la selección de los extractos polifenólicos que presenten actividad antiviral contra el virus de sarampión cepa Edmoston
- II. Determinar el efecto citotóxico de los extractos polifenólicos seleccionados sobre celular Vero
- III. Determinar el efecto inhibitorio de los compuestos seleccionados contra el virus de sarampión cepa Edmoston
- IV. Determinar si la acción antiviral ejercida por el (los) compuesto(s) ocurre a nivel virucida y/o en los primeros pasos de la infección y/o etapas posteriores a la entrada del virus
- V. Determinar el efecto de combinaciones de los compuestos seleccionados y la Ribavirina en contra del virus de sarampión cepa Edmoston

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Diseño experimental

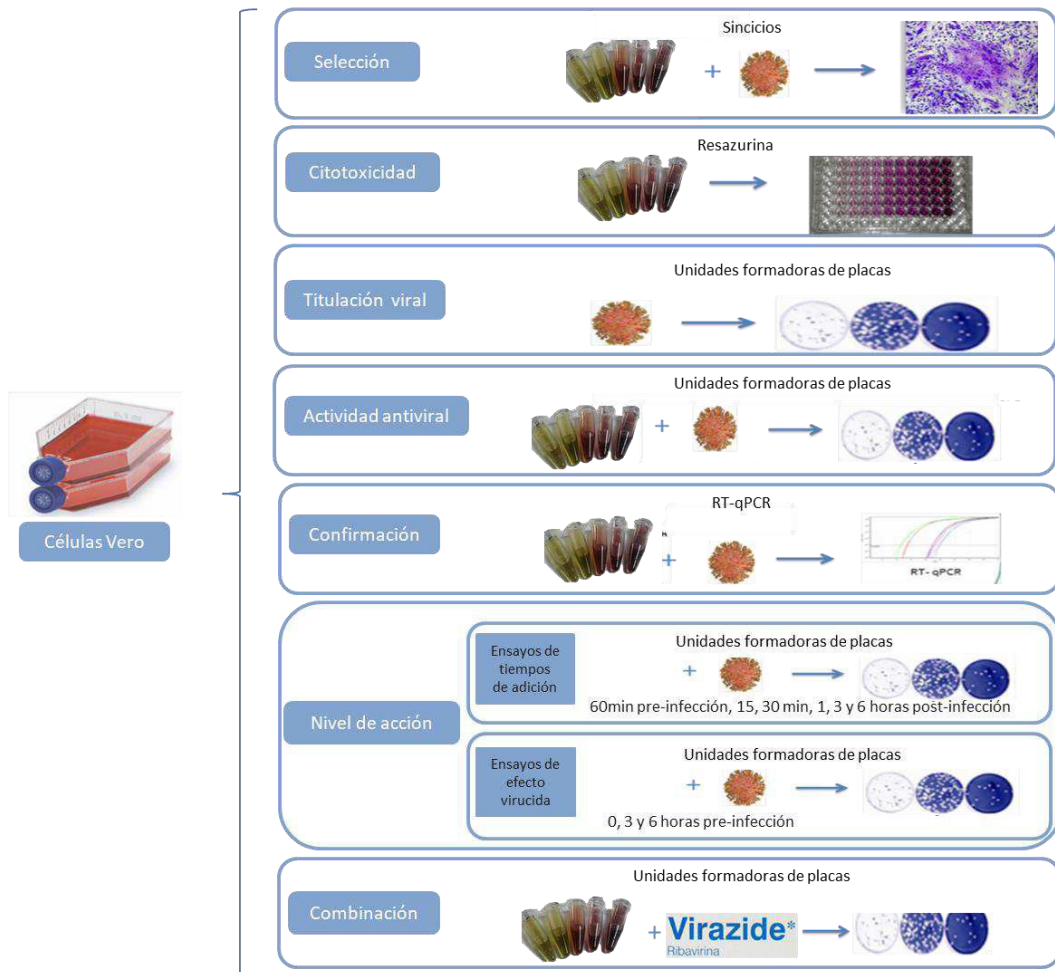


Figura 9. Representación esquemática del diseño experimental.

6.2 Material Biológico

- ❖ Virus de sarampión cepa Edmoston ATCC VR-24 Lote: 62653191.
- ❖ Línea celular de riñón de mono verde africano (Vero, ATCC® CCL-81).
- ❖ Extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de cáscara de *Citrus limon* con concentraciones de 24.67 mg EAG/g p.s de fenoles totales, 66.90 mg EQ/g p.s de flavonoides totales y 9.69 mg ECat/g p.s de taninos totales recolectado de comercios en Monterrey, Nuevo León, México.
- ❖ Extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de cáscara de *Citrus medica* con 23.07 mg EAG/g p.s de fenoles totales, 83.38 mg EQ/g p.s de flavonoides totales y 23.70 mg ECat/g p.s de taninos totales recolectado de comercios en Monterrey, Nuevo León, México.

- ❖ Extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de orujo húmedo de *Vitis vinífera* con 149.18 mg EAG/g p.s de fenoles totales, 140.88 mg EQ/g p.s de flavonoides totales y 110.02 mg ECat/g p.s de taninos totales proporcionado por vinicultores de Guanajuato, México.
- ❖ Extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de orujo seco de *Vitis vinífera* con 101.51 mg EAG/g p.s de fenoles totales, 61.88 mg EQ/g p.s de flavonoides totales y 55.86 mg ECat/g p.s de taninos totales proporcionado por vinicultores de Guanajuato, México.
- ❖ Extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados del tallo de *Haematoxylum brasiletto* con 268.48 mg EAG/g p.s de fenoles totales, 409.53 mg EQ/g p.s de flavonoides totales y 53.70 mg ECat/g p.s de taninos totales.

6.3 Extracción hidroalcohólica para la obtención de polifenoles y determinación de fenoles, flavonoides y taninos totales de los subproductos derivados de subproductos naturales.

El material vegetativo fue trasladado al Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León donde se desinfectó y se liofilizó para después ser triturado y macerado en etanol-H₂O (7:3) para extraer fitoquímicos. El extracto obtenido se evaporó en rotavapor (30°C-700 mmHg), el concentrado fue resuspendido en agua esteril. Posteriormente se determinó el contenido de fenoles totales por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu propuesto por Swain y Hillis (1959) con algunas modificaciones, flavonoides totales mediante la metodología descrita por Ghasemi et al., (2009), con ligeras modificaciones y de taninos totales mediante lo descrito por Sun et al., (1998).

6.4 Selección de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales con actividad anti-sarampión

6.4.1. Cultivo de células Vero

Se utilizó la línea celular Vero (ATCC® CCL-81), la cual se cultivó en medio DMEM enriquecido con 5% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico (Penicilina 10, 000 unidades y Estreptomocina 10 mg/ml) (AB). En cajas de cultivo de 25 cm³ con 4 ml de medio a 37°C en atmosfera de aire con 5% de CO₂ y 85% de humedad relativa.

6.4.2. Propagación del virus de sarampión

Se utilizó el virus de sarampión de la cepa vacunal Edmoston (ATCC VR-24 Lote: 62653191). Se propagó el virus en células Vero (ATCC®CCL-81™). Se agregaron 500µl del virus a una monocapa de células Vero en una caja de cultivo de 25cm³ con 500µl medio DMEM enriquecido con 5% SFB y 1% AB incubándose a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones adecuadas de humedad por 1 hora. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 3ml de medio DMEM 5%SFB 1% AB y se dejó incubando durante 72 horas. Posteriormente, una vez observado el daño citopático causado por el virus se transfirió la caja al congelador (-80 °C) donde se mantuvo por 24 horas. Luego, esta fue descongelada y el medio de cultivo fue transferido en alícuotas en tubos de 200µl, cada alícuota con un volumen de 20µl.

6.4.3. Titulación del virus de sarampión cepa Edmoston mediante Dosis Infectiva en Cultivo de Tejidos al 50% (DICT₅₀)

En placas de 96 pozos se sembraron 15,000 células por pozo en medio DMEM 5% SFB 1% AB y se dejaron incubar a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad hasta que alcanzara una confluencia de 80%. Posteriormente se retiró el medio y se agregaron 100µl de diluciones en base 10 del virus de sarampión cepa Edmoston previamente preparadas en DMEM (6 repeticiones para cada dilución) a partir de 1:10¹ hasta 1:10⁹ y 100 µl de DMEM a 6 pozos de control celular. Se incubó durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂ en condiciones de humedad para luego retirar el medio con el virus, colocar 200µl de DMEM e incubar la placa a 37°C, 5% de CO₂ en condiciones de humedad hasta observar en microscopio invertido la

presencia de sincicios. Se consideró como la dilución de punto final aquella en la cual el 50% de los tratamientos presentaron efecto citopático siguiendo el método de Reed y Muench (1938). Los ensayos se realizaron por triplicado.

6.4.4. Actividad antiviral mediante inhibición de sincicios

Se trabajó en placas para cultivo celular de 12 pozos (CELLTREAT®) a las que se les colocaron 50,000 células por pozo de la línea celular Vero en medio DMEM enriquecido con 5% de SFB y 1% de antibiótico. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta obtener un 80% de confluencia. Posteriormente se removió el medio DMEM y se agregaron 500µl en cada pozo de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos, a concentraciones 0.01, 0.1, 1 y 10µg/ml, y 500µl del virus de sarampión cepa Edmoston 10⁵ DICT₅₀/ml. Cada concentración se llevó a cabo por triplicado para cada experimento y cada experimento fue repetido al menos tres veces. Se dejó incubando durante 1 hora a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad. Cada 15 minutos dentro del periodo de incubación se agitó cuidadosamente la placa. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio con el tratamiento y el virus y se agregó 1 ml de medio DMEM enriquecido con 5% SFB y 1% de antibiótico y 1 ml del extracto, por pozo y se dejó incubar de nuevo hasta que el control viral presentó formación de sincicios. Una vez notando sincicios en el control viral de tamaño adecuado se retiró el medio y se fijaron las células agregando 500ml de metanol-acetona (1:1) a -30°C durante 30 min por pozo. Posteriormente se agregaron 350µl de cristal violeta 1% y se dejó teñir durante 1 hora. Luego se realizaron lavados con 500ml de PBS hasta no ver residuos de cristales del colorante y se observaron en microscopio invertido para contar la totalidad de sincicios por pozo.

Este ensayo se realizó empleando tres pozos con cada concentración evaluada y el ensayo se realizó por triplicado.

En base a estos ensayos se seleccionaron los extractos polifenólicos derivados de subproductos naturales que presentasen actividad antiviral contra el virus de sarampión cepa Edmoston.

6.5 Determinación del efecto citotóxico de el/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivados del/los subproducto(s) seleccionado(s) sobre la línea celular Vero

Se determinó el efecto citotóxico de los polisacáridos sulfatados mediante la reducción de resazurina (7-hydroxi-3H-fenoxazin-3-uno 10-oxido) preparando el reactivo a 0.15 mg/ml en PBS (buffer de fosfatos- salina) para posteriormente ser filtrado con filtro de 0.25µm. Se colocó en un tubo estéril de 15ml cubierto de la luz y se mantuvo en refrigeración a 4°C.

Se preparó una caja de 25cm³ con células Vero a un 80% de confluencia, a la cual se le retiró el medio de cultivo (DMEM enriquecido con 5% de SFB y 1% AB) y se disgregaron las células con solución tripsina-verseno al 0.25%, se realizó el conteo de las células en una cámara Neubauer. Posteriormente se pasaron las células a placas de microtitulación de 96 pozos con fondo plano (CELLTREAT®), con una cantidad de 15,000 células por pozo resuspendidas en 500µl de medio DMEM suplementado con 5% SFB y 1% AB. Después fueron incubadas en a 37°C y 5% de CO₂ en condiciones de humedad hasta que las células en la microplaca presentaron una confluencia de 80%. A continuación, se retiró el contenido de cada uno de los pozos y se agregaron 200µl del extracto a cada uno de los pozos manejando las siguientes concentraciones: 0.1, 1, 10, 250, 500, 1000, y 1500 µl/ml. Se incubó la placa con los extractos durante 48 horas a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad. Luego se eliminaron los extractos y se agregaron 100µl de medio DMEM más 22µl de resazurina. Se incubó a 37°C durante 4 horas para posteriormente leer su fluorescencia en un lector de placas ELISA a 560 nm de excitación/590 nm de emisión. Cada concentración del extracto se evaluó por triplicado en cada experimento y cada experimento se realizó al menos tres veces.

Se calcularon los porcentajes de supervivencia relativa a las células control no tratadas y mediante un análisis de regresión Probit se calcularon las concentraciones citotóxicas al 50% (CC₅₀) de las células tratadas.

6.6 Evaluación del efecto antiviral de/los extracto(s)

hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivados del/los subproducto(s) seleccionado(s)

6.6.1. Titulación del virus de sarampión cepa Edmoston por Unidades Formadoras de Placa (UFP)

Al agregar el virus de sarampión a un medio de cultivo celular este se deja incubar durante un tiempo determinado para que el virus se adsorba y posteriormente se agrega agar (1.2%). La progenie viral solo podrá infectar a las células inmediatamente vecinas y no a las alejadas, ya que el medio semisólido limitará su movilidad. Posteriormente cuando estas células sean coloreadas se observarán zonas no teñidas a lo cual se le denomina placas de lisis. Estas placas corresponden a las células destruidas y contienen los nuevos viriones que se produjeron durante la infección. En teoría cada placa de lisis formada corresponde a un único virus de la suspensión inicial. Esto se conoce como unidades formadoras de placas.

En placas de 6 pozos se sembraron 350,000 células Vero con medio DMEM 5% SFB 1% AB y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad adecuadas hasta obtener 80% de confluencia, posteriormente se infectó cada pozo con 1 ml de diferente dilución del virus de sarampión (diluciones en base 10, con su respectivo control celular sin infectar); se incubaron durante 1 h a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad, se retiró el inóculo y se cubrió cada pozo con 1 ml de agar (MP Biomedicals Cat No. 194615 Lot No. R19854) al 1.2% disuelto en medio DMEM y 1 ml de DMEM, se incubaron por 72 h en ambiente controlado, al término de lo cual se retiró el agar y se fijaron las células con metanol-acetona 1:1 durante 30min a -30°C y se tiñeron con cristal violeta al 1% para cuantificar las UFP. Este ensayo se realizó por triplicado.

6.6.2. Ensayo de actividad antiviral del/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivado del/los subproducto(s) seleccionado(s) por medio de UFP

Se plaquearon 350,000 células Vero por pozo en placas de 6 pozos en medio DMEM 5% SFB, 1% AB y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y condiciones de humedad adecuadas hasta obtener una confluencia del 80%. Posteriormente se infectaron con 500µl del virus de sarampión (5.8×10^{-4} UFP/ml) y 500 µl de los extractos

hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos seleccionados disueltos en medio DMEM a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1 y 10µg/µl). Posteriormente se incubó durante una hora a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad agitando la placa cada 15 minutos dentro del periodo de incubación. Luego se removió el virus y el extracto de cada pozo y se adiciono 1 ml de la misma concentración de extracto y 1ml de agar 1.2% disuelto en medio DMEM. Se incubó a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad y después de 72 horas, se retiró el agar, se fijaron con metanol-acetona por 30min a -30°C y se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 1 hora para finalmente contar el número de placas detectadas. Este ensayo se realizó empleando tres pozos con cada concentración evaluada y el ensayo se realizó por triplicado.

Los valores de la concentración efectiva al 50% (CE₅₀) se determinaron mediante un análisis de regresión Probit y se calculó el Índice Terapéutico (IT) o Índice de Selectividad (IS) mediante la siguiente formula en base a los valores de CC₅₀ previamente obtenidos por los ensayos de viabilidad.

$$IT = \frac{CC_{50}}{CE_{50}}$$

6.7 Confirmación de la actividad antiviral del/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivado del/los subproducto(s) seleccionado(s) por RT-qPCR

Se plaquearon 85,000 células Vero por pozo en placas de 12 pozos en medio DMEM 5% SFB, 1% AB y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y condiciones de humedad adecuadas hasta obtener una confluencia del 80%. Posteriormente se agregaron 250µl del virus de sarampión (5.8x10⁻⁴ UFP/ml) y 250 µl de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles de los subproductos seleccionados a diferentes concentraciones. Posteriormente se incubó la placa durante una hora a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad agitando la placa cada 15 minutos dentro del periodo de incubación. Luego se removió el virus y el extracto de cada pozo y se adicionaron 500 µl del extracto a la misma concentración y 500 µl de medio DMEM. Se incubó a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad y después de 72 horas

se retiró el medio y se realizó una extracción de RNA con el reactivo RNazol® RT (MRC Inc., USA). Posteriormente la transcripción reversa fue realizada por medio de random primers utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA). Un fragmento de 95 nucleótidos del gen N del virus fue amplificado utilizando primers específicos (MeVF: 5' GAGGGTCAAACAGAGTCGAG 3', MeVR: 5' CGGTTGGAAGATGGGCAG 3'). La qPCR se realizó utilizando el kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX (BIOLINE, USA) y utilizando el termociclador Chromo4™ Real-Time PCR Detector (Bio-Rad, USA) con el siguiente programa: 95°C por 2min, seguido de 50 ciclos de 95°C por 2seg, 60°C por 10seg y 72°C por 20seg. La curva estándar se obtuvo graficando el valor Ct (en inglés threshold cycle) de cada una de las diluciones contra el logaritmo del número de copias del gen N de MeV. Cada punto de la curva estándar se corrió por triplicado. Para validar la cuantificación absoluta se corrió en tres ensayos independientes.

La estimación del número de copias del gen N de los estándares utilizados para la construcción de la curva estándar se hizo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Número de copias de gen} = \frac{(\text{Cantidad de transcrito})(\# \text{ de Avogadro})}{(\# \text{ pares de bases})(1 \times 10^3)(340)}$$

Donde la cantidad de transcrito de RNA se expresa en mg, el número de Avogadro corresponde a 6.02×10^{23} , pb al número de pares de bases del transcrito, 1×10^3 es un factor de conversión para convertir de g a mg y 340 es el peso molecular promedio de un nucleótido en una hebra sencilla de RNA. Se determinó el título viral en cada una de los tratamientos por la interpolación del valor Ct en la curva. Se calcularon los porcentajes de inhibición relativos al control viral para comparar el resultado con el previamente obtenido por el ensayo de UFP.

6.8 Evaluación del nivel de acción de los extractos

6.8.1. Ensayos de inhibición viral del/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivados del/los subproducto(s) seleccionado(s) a diferentes tiempos de infección mediante UFP

Se plaquearon 350,000 células Vero por pozo en placas de 6 pozos en medio DMEM 5% SFB, 1% AB y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y condiciones de humedad

adecuadas hasta obtener una confluencia del 80%. Posteriormente se infectó con 500µl del virus de sarampión cepa Edmoston 5.8×10^{-4} UFP/ml y se adicionó el compuesto con el siguiente esquema: se adicionó 500µl de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales seleccionados a diferentes tiempos de infección (1 h pre-infección, de forma simultánea a la infección o tiempo 0 de la infección, 15 min y 30 min post-infección y 1, 2, 4 y 6 horas post-infección). Se incubó durante una hora a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad para posteriormente remover los extractos y el virus. Se agregó 1 ml de agar al 1.2% disuelto en medio DMEM y 1 ml de DMEM, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad. Después de 72 horas, se retiró el agar, y las células se fijaron con metanol-acetona 1:1 por 30min a -30°C y se tiñeron con cristal violeta al 1%. Finalmente se contó el número de placas detectadas.

6.8.2. Ensayo de efecto virucida del/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivado(s) del/los subproducto(s) seleccionado(s) mediante UFP

Para analizar si los compuestos actúan directamente sobre la partícula viral llevando a cabo la inactivación de los viriones, se realizó un ensayo virucida. En placas de 6 pozos se sembraron 350,000 células por pozo y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad hasta obtener una confluencia del 80%. Se pusieron en contacto 500µl del virus de sarampión (5.8×10^{-4} UFP/ml) con 500µl de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos seleccionados (1 y 10 µg/ml) y fueron agregados inmediatamente al cultivo celular en placa, contando esto como el tiempo 0. A su vez, se puso en contacto 500µl del virus de sarampión (5.8×10^{-4} UFP/ml) y 500µl de los extractos (1 y 10 µg/ml) y se incubaron durante 3 o 6 horas para posteriormente, pasado este tiempo, ser adicionados al cultivo de células Vero en placa. Después de agregar la mezcla a los pozos con cultivo de células, se incubó durante 1 hora a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad para posteriormente ser retirada de los pozos. Se adicionó 1 ml de DMEM y 1 ml de agar al 1.2% disuelto en DMEM y se incubó durante 72 horas a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad. Posteriormente se retiró el agar y se fijó la placa con

metanol-acetona 1:1 durante 30 min a -30°C . Finalmente se tiñó cada uno de los pozos con cristal violeta al 1% y se cuantificó las UFP presentes. Este ensayo se realizó por triplicado.

6.9 Evaluación del efecto en combinación (aditivo, sinérgico o antagonista) de el/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenoles derivado(s) del/los subproducto(s) seleccionado(s)

Con los valores de concentración efectiva al 25% (CE_{25}) y de concentración efectiva al 50% (CE_{50}) previamente obtenidos de los ensayos de actividad antiviral por UFP, se llevaron a cabo combinaciones entre el/los extracto(s) hidroalcohólico(s) rico(s) en polifenole(s) derivado(s) del/los subproducto(s) con mejor actividad antiviral y el fármaco antiviral Ribavirina.

En placas de cultivo de 6 pozos se colocaron 350,000 células por pozo de la línea celular Vero en medio DMEM enriquecido con 5% de SFB y 1% AB y se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 en condiciones de humedad hasta obtener un 80% de confluencia. Posteriormente se retiró el medio DMEM de la placa y se agregaron 500 μl de cada combinación y 500 μl del virus de sarampión (5.8×10^{-4} UFP/ml) a cada pozo. Se incubó durante 1 hora a 37°C con 5% de CO_2 en condiciones de humedad agitando cuidadosamente la placa cada 15 minutos. Posteriormente se retiraron los extractos y el virus para luego agregar 1 ml de cada combinación y 1 ml de agar al 1.2% disuelto en medio DMEM a cada pozo. Después se dejó incubar durante 72 horas a 37°C con 5% de CO_2 en condiciones de humedad. Posteriormente se retiró el agar y se fijaron las células agregando 500ml de metanol-acetona (1:1) a -30°C durante 30 min. Posteriormente se tiñeron con cristal violeta 1% durante 30 minutos para finalmente realizar lavados con 500 ml de PBS y realizar la cuenta de placas presentes.

El efecto de las combinaciones de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales y la Ribavirina fue calculado usando el índice

combinacional (IC) obtenido mediante el programa estadístico Compusyn creado por Ting Chao Chou, el cual es un software que provee de la simulación analítica computarizada simple usando el principio del efecto medio basado en el principio físico-químico en relación a su masa-acción. La ecuación del efecto medio deriva de una inducción y deducción matemática de ecuaciones derivadas de los modelos de cinética enzimática con diferentes mecanismos de acción en presencia de un inhibidor. La validación de la ecuación del efecto medio se da a partir del hecho que deriva de las cuatro reacciones principales en la bioquímica, llamadas ecuación de Michaelis-Menten para la cinética enzimática, la ecuación de Hill para la ocupación del receptor, la ecuación de Scatchard para la unión del receptor y la ecuación de Henderson-Hasselbach para la ionización de pH. Un índice combinacional (IC) < 1 indica sinergismo, un IC =1 indica efecto aditivo y un IC > 1 indica antagonismo.

6.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS versión 20. Todas las variables fueron analizadas por triplicado para cada experimento, y cada experimento se llevó a cabo al menos tres veces. Los valores de CE₂₅ y CE₅₀ fueron determinados mediante un análisis de regresión Probit. Se realizó un análisis ANOVA de un factor y se utilizó la prueba Dunnet para la comparación de medias contra el control viral y prueba Tukey para comparar las medias de distintas técnicas. Los resultados fueron considerados como significativos si $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Selección de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales con actividad antiviral

7.1.1. Obtención del título del virus de sarampión cepa Edmoston por Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos al 50% (DICT₅₀)

El título viral obtenido por la técnica de dosis infecciosa en cultivo de tejidos al 50% fue de 10^5 DICT₅₀/ml.

7.1.2. Actividad antiviral de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales mediante inhibición de sincicios

El virus de sarampión tiene la capacidad de diseminarse intracelularmente debido a la glicoproteína de fusión “F” presente en su envoltura por lo que puede presentarse la formación de sincicios. Las células Vero cultivadas fueron tratadas con diferentes dosis de los polifenoles derivados de subproductos naturales y se infectaron con MeV. Se analizó la inhibición de la formación de sincicios como se indica en la metodología.

Todos los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales probados redujeron el número de sincicios de las células infectadas con MeV en comparación con el control viral (CV), sin embargo, a 10 µg/ml el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la corteza de *H. brasiletto* fueron altamente citotóxico llegando a causar la lisis de la monocapa celular, por lo cual no se pudo evaluar la presencia de sincicios a esta dosis (**Figura 10**).

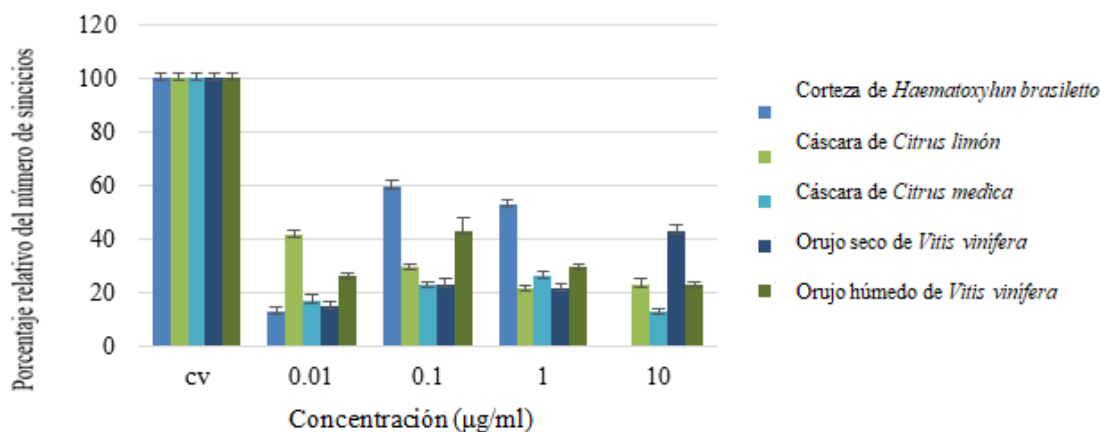


Figura 10. Selección de extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales con actividad anti-sarampión. Las columnas de la izquierda muestran las células sin tratamiento polifenólico tomadas como el 100% representado como CV (control viral) seguidas de las células tratadas con concentraciones de 0.01 a 10µg/ml de los compuestos.

7.2 Efecto citotóxico de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos naturales seleccionados sobre las células Vero

Para determinar la citotoxicidad de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos seleccionados *Citrus limon*, *Citrus medica*, *Vitis vinífera* (seco) y *Vitis vinífera* (húmedo) se realizaron ensayos de viabilidad celular en células Vero mediante la técnica fluorescente de reducción de resazurina tal cual se menciona en la metodología. Se realizaron tres ensayos por triplicado para cada uno de los extractos y se calculó la CC_{50} mediante regresión lineal (Probit) con el programa SPSS 20.

En la **Figura 11** se muestra la gráfica correspondiente a la determinación del efecto citotóxico de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles de los subproductos seleccionados. Se observó que a concentraciones de 0.1 µg/ml a 100 µg/ml, el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *Citrus limon* no presentó citotoxicidad y que de 0.1 µg/ml a 50 µg/ml el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *Citrus medica* presentó el mismo efecto. El extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *Citrus limon* mostró una CC_{50} de 214.429 µg/ml y el de cáscara de *Citrus medica* una CE_{50} 75.250 µg/ml.

Los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los orujos húmedo y seco de *Vitis vinífera* presentaron una citotoxicidad a partir de 50 µg/ml llegando a

ser altamente tóxicos a 250 µg/ml con 0% de viabilidad a esta concentración. Con el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado del orujo húmedo de *Vitis vinífera* se obtuvo una CC₅₀ de 86.351 µg/ml y con el del orujo seco de *Vitis vinífera* se encontró la menor CC₅₀ obtenida comparada con el resto de los tratamientos con un valor de 75.250 µg/ml.

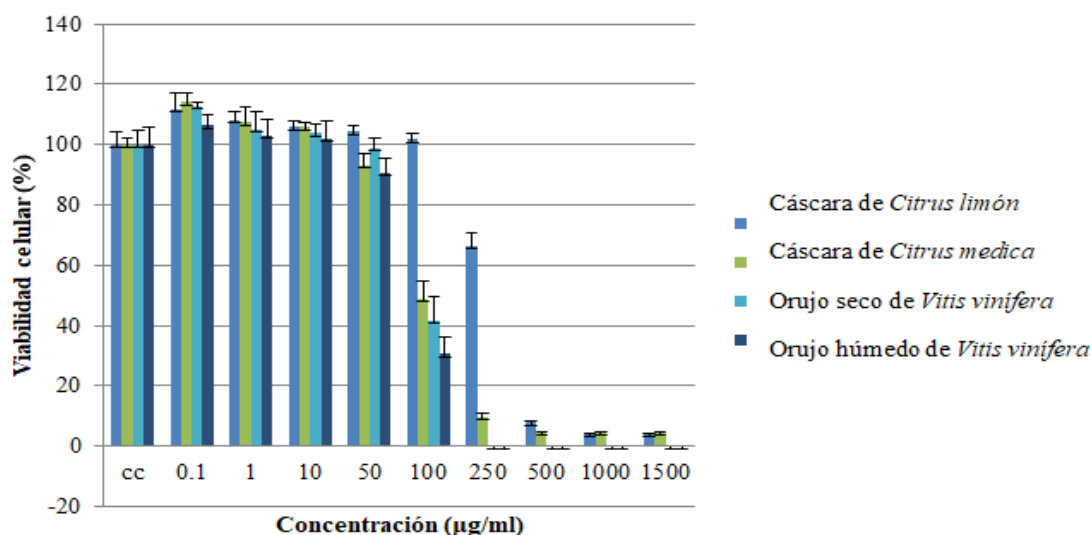


Figura 11. Efecto citotóxico de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos seleccionados sobre la viabilidad celular. Las columnas de la izquierda muestran la absorbancia de células Vero sin tratar y tomadas como 100% de viabilidad (control), seguidas de las células tratadas con concentraciones de 0.1 a 1,500 µg/ml

Por medio de un ANOVA de un factor y posteriormente una prueba Dunnet ($p < 0.05$), se determinó que no existe diferencia significativa entre la viabilidad celular presentada con los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles de los subproductos naturales a concentraciones de 0.1-100 µg/ml y el control celular, pero comparando las concentraciones de 250 - 1500 µg/ml de los extractos respecto al control celular existe diferencia altamente significativa.

7.3 Evaluación del efecto antiviral de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos seleccionados

7.3.1. Obtención del título del virus de sarampión cepa Edmoston por unidades formadoras de placas (UFP)

El título viral obtenido por la técnica de UFP fue de 5.8×10^{-4} UFP/ml.

7.3.2. Efecto antiviral de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos seleccionados mediante UFP

Todos los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de los subproductos seleccionados mostraron una reducción en el porcentaje relativo del número de placas siguiendo una curva dosis respuesta, donde a mayor concentración se obtuvo una mayor actividad antiviral (**Figura 12**). Los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de la cáscara de *C. limon* y *C. medica* y del orujo húmedo de *V. vinífera* presentaron un porcentaje relativo de inhibición del número de placas similar a 10 µg/ml, obteniendo valores de 44.64%, 44.79 y 45.31% respectivamente. Sus CE₅₀ también fueron similares obteniendo valores de 8.68, 8.94 y 8.10 µg/ml respectivamente. El valor de CE₅₀ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado del orujo seco de *V. vinífera* no se pudo determinar, ya que este valor se encontraba fuera de la concentración máxima evaluada en este trabajo (10 µg/ml).

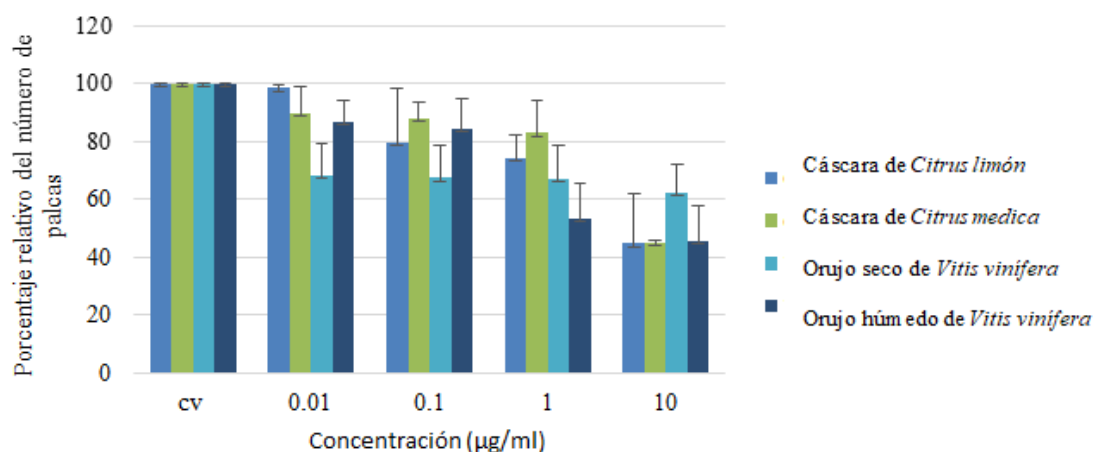


Figura 12. Inhibición de UFP producidas por el virus de sarampión cepa Edmoston con los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales. Las columnas de la izquierda muestran las células sin tratamiento polifenólico tomadas como el 100% (control viral) seguidas de las células tratadas con concentraciones de 0.01 a 10µg/ml de los compuestos.

Comparando el porcentaje relativo del número de placas resultantes bajo las diferentes concentraciones de los tratamientos mediante un ANOVA simple de un factor y una posterior prueba Dunnet ($p < 0.05$), se determinó que a 0.01 µg/ml no

existe diferencia significativa con el control viral, a 0.1 y 1 µg/ml existe diferencia significativa y a 10 µg/ml existe diferencia altamente significativa.

En base a los valores de CC₅₀ y CE₅₀ obtenidos en los ensayos de citotoxicidad y de actividad antiviral se calcula el índice de selectividad (IS). Este es un parámetro importante para evaluar la actividad antiviral ya que indica que tan efectivo puede ser un antiviral sin llegar a ser tóxico para la célula huésped. Se calculó el IS para los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de la cáscara de *C. limon*, *C. medica* y orujo húmedo de *V. vinífera* húmedo encontrando que este último mostró un IS de 10.66, el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. medica* alcanzó un IS=12.11 y el mayor IS observado lo presentó el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *Citrus limon*, con un valor igual a 24.70. Por lo que este tratamiento fue seleccionado para determinar su mecanismo de acción y su efecto en combinación con antivirales comerciales (**Tabla 5**). El IS del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado del orujo seco de *V. vinífera* no pudo determinarse dado a que no se obtuvo su CE₅₀.

Tabla 5. Valores de IS obtenidos para los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de la cáscara de *C. limon* y *C. medica* y del orujo húmedo de *V. vinífera*

Subproducto	CC ₅₀ (µg/ml)	CE ₅₀ (µg/ml)	IS (CC ₅₀ /CE ₅₀)
<i>Citrus limon</i>	214.429	8.68	24.70
<i>Citrus medica</i>	108.77	8.94	12.11
<i>Vitis vinífera</i> húmedo	86.351	8.10	10.66
<i>Vitis vinífera</i> seco	75.250	No calculable	No calculable

7.3.3. Evaluación del efecto del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *Citrus limon* sobre la carga viral del virus de sarampión por RT-qPCR

Con el fin de confirmar la actividad antiviral del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *Citrus limon*, una placa de 12 pozos con una monocapa de células Vero se infectó con el virus de sarampión cepa Edmoston, luego de las 72 horas de incubación se realizó la extracción de RNA total de cada pozo y finalmente se realizó una RT-qPCR para la obtención del porcentaje de inhibición de número de copias virales. La curva de amplificación obtenida mediante

la RT-qPCR muestra efectivamente una reducción de la carga viral a 1 (mostrado en color azul) y 10 $\mu\text{g/ml}$ (mostrado en color celeste) del compuesto comparado con el control viral (mostrado en color verde) en la **Figura 13**.

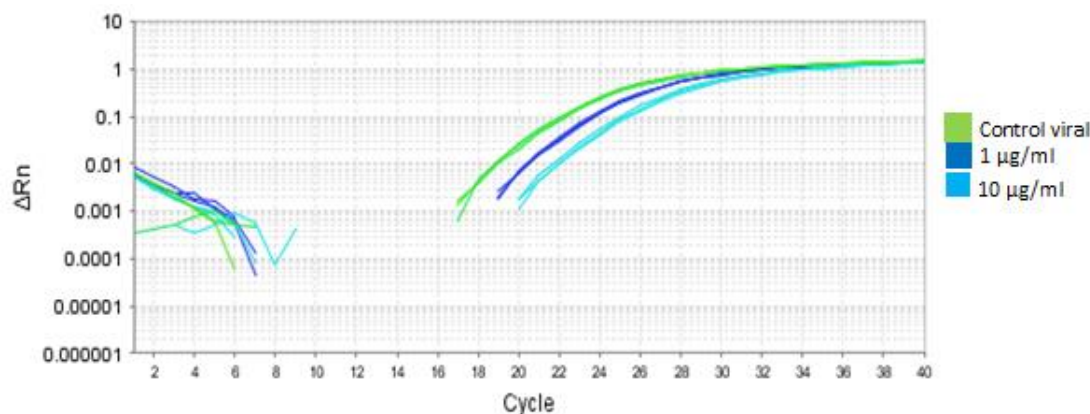


Figura 13. Curva de amplificación del cDNA del gen N del virus de sarampión a las concentraciones 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *Citrus limón* obtenida mediante qPCR. En el eje de las “y” se indica ΔR_n que representa la magnitud de señal generada mediante las condiciones de PCR y en el eje de las “x” se indica el número de ciclo.

En la **Figura 14** se muestra que no se observa diferencia significativa entre el porcentaje relativo del número de placas y la carga viral.

A concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon* se obtiene (mediante RT-qPCR) un porcentaje de copias virales de 66.92%, mientras que mediante UFP se obtiene un porcentaje relativo del número de placas de 73.96%. A 10 $\mu\text{g/ml}$ mediante RT-qPCR se alcanza un porcentaje de copias virales de 36.73% y mediante UFP un porcentaje relativo de número de placas de 44.64%.

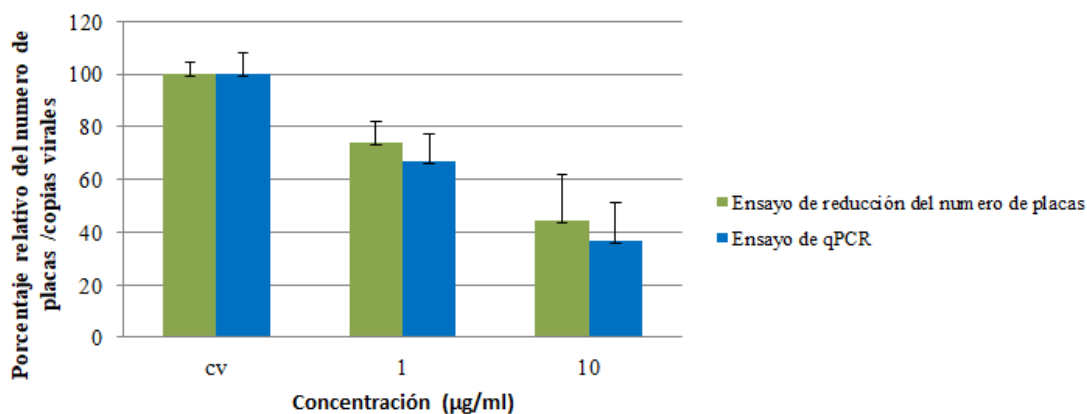


Figura 14. Evaluación de la actividad antiviral del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon* mediante las técnicas de unidades formadoras de placas (UFP) y qPCR. Las columnas de la izquierda muestran las células sin tratamiento polifenólico tomadas como el 100% (control viral) seguidas de las células tratadas con las concentraciones 1 y 10µg/ml de los compuestos. En color verde se representa la actividad antiviral conseguida mediante UFP y en color azul mediante RT-qPCR.

No existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por las diferentes técnicas (RT-qPCR y UFP) pero si existe diferencia significativa entre el porcentaje relativo del número de placas y de copias virales obtenidas a las concentraciones de 1 y 10 µg/ml respecto al control viral.

7.4 Evaluación del nivel de acción del extracto

hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon*

7.4.1. Efecto del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon* en la infección por el virus de sarampión cepa Edmoston a diferentes tiempos de adición

Para la determinación de la etapa en la cual el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon* actuaba a lo largo del ciclo viral se realizaron ensayos de tiempos de adición analizando la inhibición del porcentaje relativo del número de placas sobre células Vero.

En la **Figura 15** se observa que el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon* generan una reducción en el porcentaje relativo del número de placas de 0 a 30 minutos post-infección, lo que corresponde a las

primeras etapas del ciclo replicativo del virus de sarampión. Sin embargo, a los 15 minutos post-infección se observa un mayor efecto antiviral.

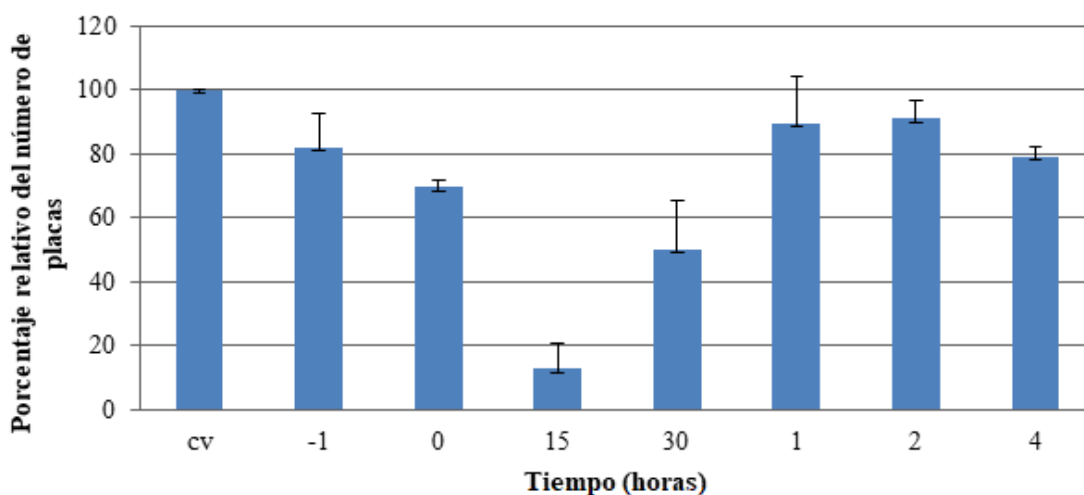


Figura 15. Efecto del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *Citrus limon* a diferentes horas de la infección sobre la formación de UFP. Las columnas de la izquierda muestran las células sin tratamiento tomadas como el 100% (control viral) seguidas de las células tratadas con la CE₅₀ de *C. limon* a diferentes tiempos de infección.

Se determinó que no existe diferencia significativa en el porcentaje relativo del número de placas en los tiempos -1, 1, 2 y 4 horas respecto al control viral. Sin embargo, de 0 a 30 min si se presentó diferencia significativa.

7.4.2. Evaluación del efecto virucida contra el virus de sarampión del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivados la cáscara de *Citrus limon*

Se realizaron ensayos de efecto virucida en una monocapa de células Vero mediante la técnica de UFP para determinar si el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivados la cáscara de *C. limon* poseía un efecto sobre la partícula viral impidiendo de esta manera que esta pudiese entrar en contacto con la célula huésped.

En la **Figura 16** se muestra con la CE₅₀ determinada para el extracto una inhibición de 61.77% a las 0 horas de incubación virus/polifenol en comparación con el control viral, mientras que a 3 y 6 horas se presenta una inhibición del 100% en comparación con el control viral. Con la CE₂₅ del extracto se obtuvo una inhibición de 80.56% a las 0 horas de incubación en comparación con el control viral mientras que a las 3 horas y 6 horas de incubación presenta una inhibición de 95.24 %. Esto indica que el

compuesto es capaz de inhibir más del 95% de las partículas virales después de 3 horas de contacto con estas.

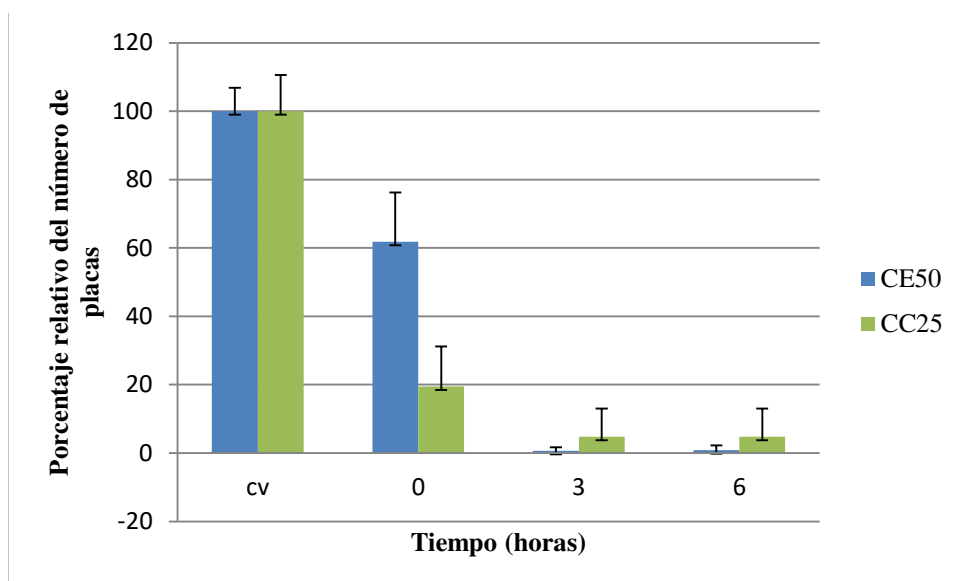
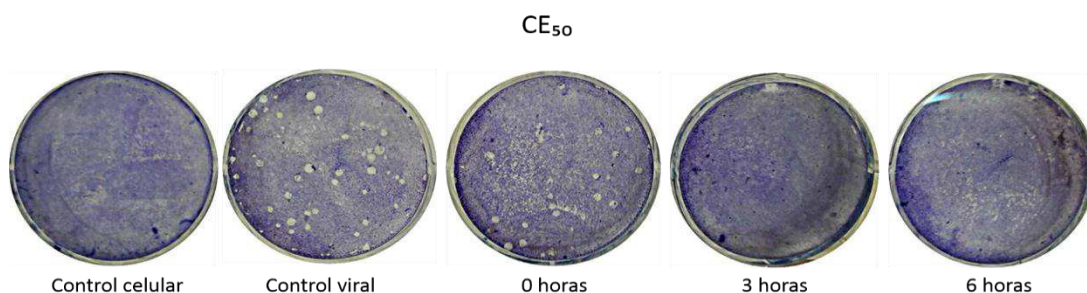


Figura 16. Efecto virucida del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon* a diferentes horas sobre la formación de UFP. Las columnas de la izquierda muestran las células sin tratamiento tomadas como el 100% (control viral) seguidas de las células tratadas con la CE₅₀ (azul) y CE₂₅ de *C. limon* luego de 0,3 y 6 horas de contacto virus-polifenol.

El análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa entre el porcentaje relativo del número de placas presentadas bajo el tratamiento CE₅₀ y CE₂₅ a 0, 3 y 6 horas de contacto virus-polifenol respecto al control viral.

En la **Figura 17** se observa la reducción del número de placas comparado con el control viral en una monocapa de células Vero infectadas con el virus de sarampión cepa Edmoston generada por la CE₂₅ y CE₅₀ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon* luego de 3 y 6 horas de interacción virus-polifenol.



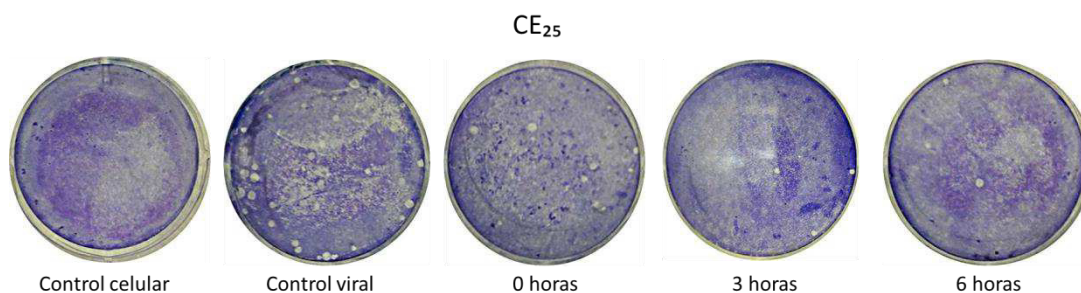


Figura 17. Efecto del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* sobre los virones de sarampión (efecto virucida). Fotografías de las unidades formadoras de placas (UFP) presentadas por la concentración efectiva 50% (CE₅₀) en A y 25% (CE₂₅) en B de *Citrus limon* a las 0, 3 y 6 horas de exposición virus-polifenol.

7.5 Evaluación del efecto combinado del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon*

7.5.1. Evaluación del efecto combinado del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* y el antiviral comercial Ribavirina sobre la formación de unidades formadoras de placas (UFP) producidos por el virus de sarampión cepa Edmoston

En base a las concentraciones efectivas al 25% y 50% obtenidas se desarrollaron 4 combinaciones donde se mezclaron las CE₂₅ y CE₅₀ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* y el antiviral comercial Ribavirina tal como se muestra en la **Tabla 6**. Los valores de CE₂₅ y CE₅₀ de la Ribavirina fueron previamente obtenidos por nuestro equipo de investigación publicado por Morán-Santibáñez, 2016.

Tabla 6. Conformación de las combinaciones del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* y la Ribavirina

Combinación de los compuestos	Concentración de los compuestos (µg/ml)	
	Ribavirina	<i>Citrus limon</i>
R50/L50	36	8.68
R50/L25	36	3.14
R25/L50	26	8.68
R25/L25	26	3.14

Se realizaron ensayos de actividad antiviral mediante la técnica de UFP con dichas combinaciones. En la **Figura 18** se muestra que las combinaciones R50/L50 y R25/L50 presentan un efecto antiviral similar al que presentó el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* de manera individual, obteniendo una inhibición de 55.38% y 51.79% respectivamente.

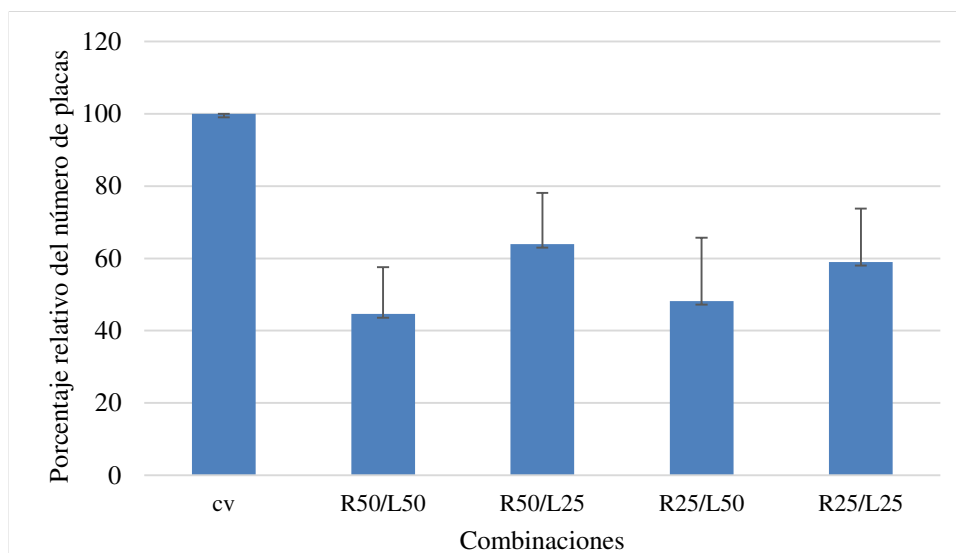


Figura 18. Actividad antiviral del efecto combinado del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivados cáscara de *C. limon* y Ribavirina. Las columnas de la izquierda muestran las células sin tratamiento tomadas como el 100% (control viral). La letra R corresponde a Ribavirina y L a *C. limon*, así como 50 y 25 corresponde a las CE₅₀ y CE₂₅ respectivamente.

El análisis estadístico demostró que existe diferencia significativa entre el porcentaje relativo del número de placas presentado por las combinaciones respecto al control viral pero no existe diferencia significativa entre ellas (prueba Tukey).

7.5.2. Evaluación del efecto de combinaciones (antagonismo, aditividad o sinergismo) del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* y el antiviral comercial Ribavirina

Se utilizó el software Compusyn credo por Ting Chao Chou el cual genera ecuaciones para proveer la base teórica para el índice combinacional (IC) que permite la determinación de las interacciones entre diversas drogas donde un IC < 1 indica sinergismo, un IC =1 indica efecto aditivo y un IC > 1 indica antagonismo (Chou T, 2006).

Un valor de IC dentro del rango 0.1 a 0.3 es considerado fuertemente antagonista, un valor de IC dentro del rango 0.3 a 0.7 son considerados sinergistas y un valor de IC dentro del rango 0.7 a 0.85 es considerado sinergismo moderado.

En el gráfico del efecto medio (Figura 19) obtenido con el software Compusyn se muestran las cuatro combinaciones del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* y el antiviral comercial Ribavirina en relación a los tratamientos de manera individual observándose el efecto antagónico de estas combinaciones.

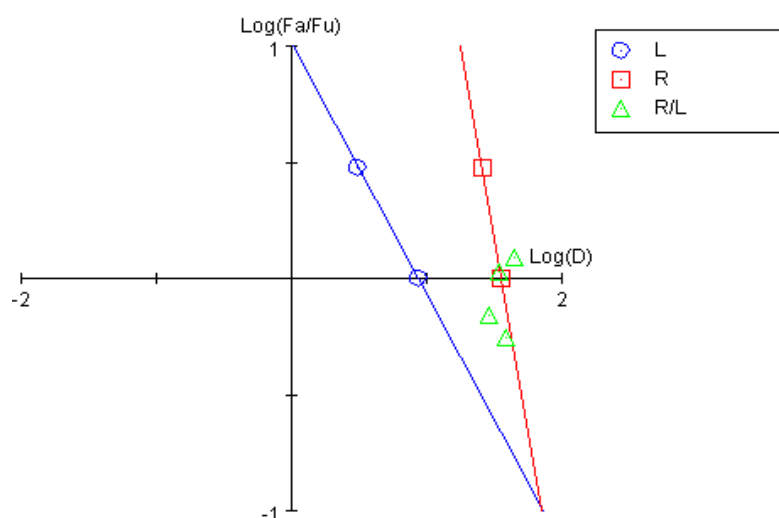


Figura 19. Gráfico del efecto medio de las combinaciones CE_{50} y CE_{25} del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* (círculos azules) y el antiviral comercial Ribavirina (cuadros rojos). Las combinaciones están representadas por triángulos verdes.

En el isoblograma normalizado a radios no constantes (**Figura 20**) obtenido mediante dicho software se muestra de manera gráfica los IC resultantes de las combinaciones. En este isoblograma no se muestra ninguna de las figuras representantes de cada una de las combinaciones debido al alto IC que mostraron (>1) de tal manera que su comportamiento se describe como antagónico.

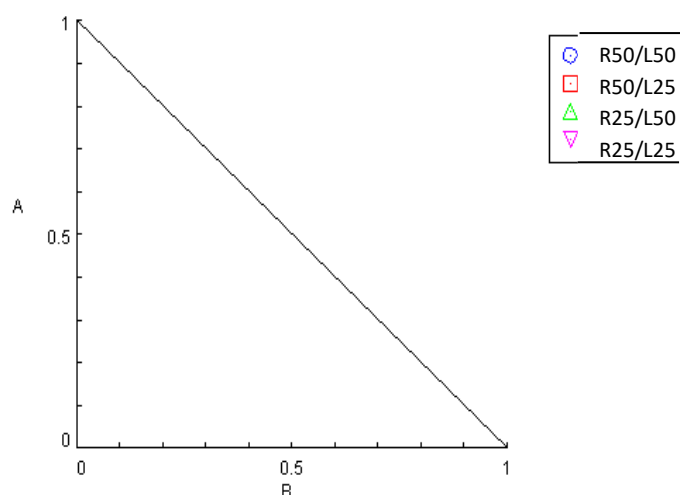


Figura 20. Isoblograma normalizado de las combinaciones de las CE₅₀ y CE₂₅ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* y el antiviral comercial Ribavirina a radios no constantes. Cada punto representa una de las cuatro combinaciones cuyo IC fue calculado mediante el software Compusyn y es representada por figuras diferentes.

En la **Tabla 7** se observa que el índice combinacional (IC) de las cuatro combinaciones probadas para el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* y el antiviral Ribavirina mostraron un efecto fuertemente antagonístico dado que todas las combinaciones alcanzaron IC muy superiores a 1.

Tabla 7. Efecto combinado del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* y el antiviral comercial Ribavirina

Combinación de los compuestos	Índice combinacional (IC)	Descripción
R50/L50	5.32251	Fuerte antagonismo
R50/L25	2.51229	Fuerte antagonismo
R25/L50	3.44662	Fuerte antagonismo
R25/L25	2.21762	Fuerte antagonismo

Dado a que el efecto combinado no fue el esperado, se disminuyó la concentración del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* hasta alcanzar una CE₁₅ combinándola con las CE₅₀ y CE₂₅ de la Ribavirina.

La actividad antiviral obtenida por la combinación de CE₅₀ Ribavirina/ CE₁₅ de *C. limon* fue mayor que la combinación antes probada de CE₅₀ Ribavirina/CE₂₅ de *C.*

limon, e incluso mejor que la actividad antiviral del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* de manera individual presentando un porcentaje relativo del número de placas de 30% (**Figura 21**).

La combinación de CE₂₅ Ribavirina/CE₁₅ de *C. limon* también mostro una mejor actividad antiviral que la combinación antes probada de CE₂₅ Ribavirina/CE₂₅ *Citrus limon* con un 42.5% de porcentaje relativo del número de placas, siendo muy similar a la actividad antiviral mostrada por el extracto de manera individual (44.64% a 10µg/ml).

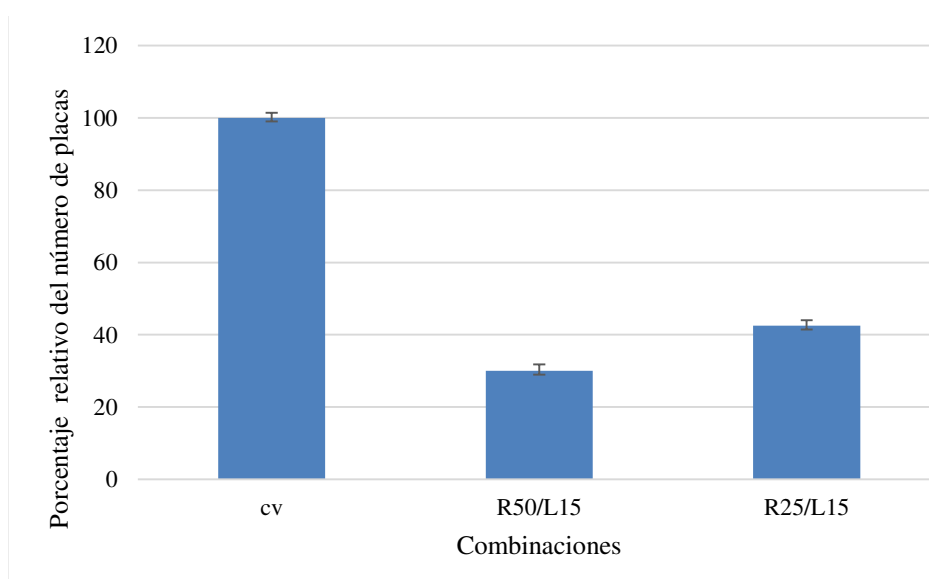


Figura 21. Actividad antiviral del efecto combinado del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* y Ribavirina. Las columnas de la izquierda muestran las células sin tratamiento tomadas como el 100% (control viral). La letra R corresponde a Ribavirina y L a *C. limon*, así como 50 y 15 corresponde a las CE₅₀ y CE₁₅ respectivamente.

Se determinó que existe diferencia significativa entre el porcentaje relativo de número de placas presentado por ambas combinaciones respecto al control viral. Posteriormente se realizó una prueba Tukey en la cual se obtuvo que no existe diferencia significativa entre ambas combinaciones

Luego de analizar su efecto en combinación mediante el software Compusyn se obtuvo un gráfico del efecto medio que muestra que las dos combinaciones CE₅₀ Ribavirina/CE₁₅ *C. limon* y CE₂₅ Ribavirina/CE₁₅ *C. limon* presentan un comportamiento sinérgico (**Figura 22**).

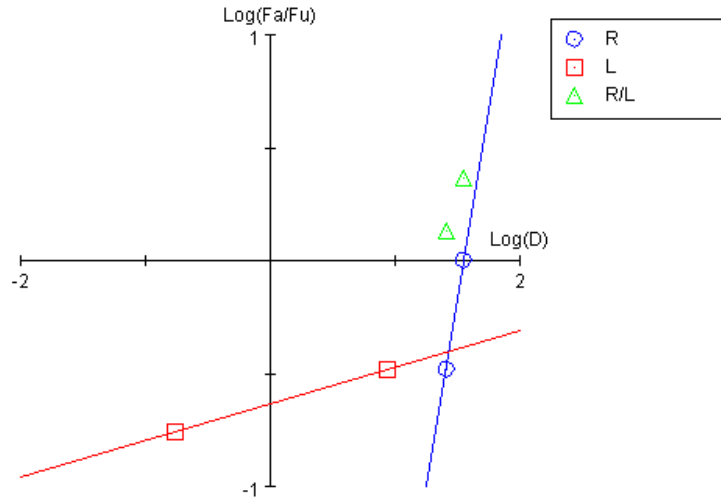


Figura 22. Gráfico del efecto medio de las combinaciones de CE_{50} y CE_{25} del antiviral comercial Ribavirina (círculos azules) y CE_{15} del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* (cuadros rojos). Las combinaciones están representadas por triángulos verdes.

En el isoblograma normalizado a radios no constantes se observa mejor esta actividad sinérgica, donde la combinación CE_{25} Ribavirina/ CE_{15} *C. limon* mostrada con un cuadro rojo en la **Figura 23** obtuvo un $IC = 0.66037$ siendo sinérgico y combinación CE_{50} Ribavirina/ CE_{15} *C. limon* mostrada con un círculo azul en la misma figura un $IC=0.77804$ siendo moderadamente sinérgico.

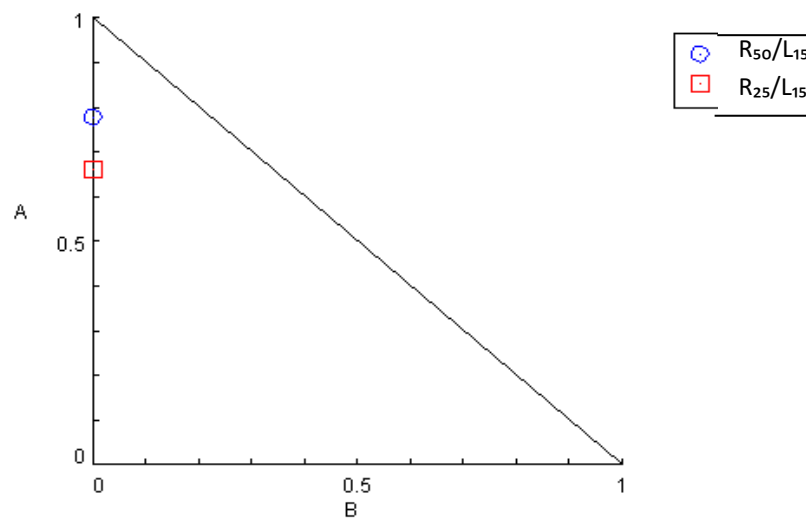


Figura 23. Isoblograma normalizado de las combinaciones CE_{15} del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* y CE_{50} y CE_{25} del antiviral comercial Ribavirina a radios no constantes. Cada punto representa una de las dos combinaciones cuyo IC fue calculado mediante el software Compusyn y es representada por figuras diferentes.

Tabla 8. Efecto combinado de las CE₅₀ y CE₂₅ de Ribavirina y la CE₁₅ del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cascara de *C. limon*

Combinación de compuestos	Índice combinacional (IC)	Descripción
R50/L15	0.77804	Sinergismo moderado
R25/L15	0.66037	Sinergismo

8. DISCUSIÓN

Los productos naturales han sido utilizados desde la antigüedad para el tratamiento de diversas enfermedades y padecimientos (Dias et al., 2012), habilitando el descubrimiento de recursos marinos y terrestres vastos en metabolitos secundarios bioactivos, como los polifenoles. Estos compuestos son producidos por productos y subproductos (desechos) naturales (Joshi et al., 2012) y poseen propiedades potenciales en la salud del organismo humano, entre ellas la actividad antiviral (Havsteen et al., 2002; Nair et al., 2002; Lee et al., 2012).

El sarampión continúa siendo una de las principales causas de muerte en niños pequeños en países subdesarrollados a pesar de la disponibilidad de una vacuna efectiva y en años recientes esta enfermedad continúa presentando un número importante de brotes a nivel mundial (WHO 2017). Actualmente existen alrededor de 90 fármacos antivirales aprobados por la FDA, sin embargo, estos van dirigidos contra un grupo limitado de enfermedades virales dentro de las cuales no se encuentra sarampión (Clercq 2016). El desarrollo de un agente antiviral derivado de compuestos polifenólicos a partir de subproductos naturales sería un recurso de bajo costo para la población pudiendo ser aprovechados en lugar de ser considerados como desechos siendo además un valioso elemento que trabaje en conjunto con la vacuna existente. Es por ello que en este trabajo decidimos evaluar la actividad anti-sarampión de extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de corteza de palo de Brasil (*H. brasiletto*), cáscara de limón (*C. limon*), cáscara de cidra (*C. medica*) y orujo seco y húmedo de uva (*V. vinífera*).

Existen antecedentes que demuestran la actividad antiviral de polifenoles derivados de subproductos naturales contra virus de DNA (Havsteen et al., 2002) como de RNA (Lee et al., 2012). Así que previo a la evaluación de extractos derivados de subproductos naturales como agentes con actividad anti-sarampión, se realizó una selección mediante la técnica de inhibición de sincicios. Todos los compuestos demostraron tener la capacidad de inhibir el virus, sin embargo, el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de corteza de *H. brasiletto* presentó una alta citotoxicidad a 10 µg/ml lisando por completo la monocapa celular. Se ha observado que altas concentraciones de neoflavonoides como la hematoxilina presente en los extractos de *H. brasiletto* son tóxicos (Armstrong 1992). Este extracto fue finalmente descartado para ensayos posteriores debido a su alta

citotoxicidad, siendo seleccionados los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de *C. limon*, *C. medica*, orujo húmedo y seco de *V. vinífera*.

Es importante establecer la concentración citotóxica *in vitro* de un producto para evaluar su actividad antiviral, ya que en una línea celular la aparente actividad antiviral de un compuesto puede deberse a la muerte celular tras su exposición a este. Además, el producto que está siendo investigado, aparte de tener actividad antiviral, debe poder administrarse a concentraciones que no causen efectos citotóxicos sobre las células. Para esto, las pruebas de citotoxicidad utilizan una serie de concentraciones crecientes del compuesto para determinar a qué concentración el producto causa la muerte del 50% de las células, lo que se conoce como concentración citotóxica media (CC₅₀) (FDA 2006). En este trabajo se encontró que los extractos hidroalcohólicos de orujo húmedo y seco de *V. vinífera* fueron altamente citotóxicos a 100 µg/ml, presentando una CC₅₀= 86.35 µg/ml y CC₅₀= 75.250 µg/ml respectivamente. Dicho efecto se había reportado ya anteriormente por Nirmala et al., quienes encontraron que los extractos polifenólicos derivados de subproductos de *V. vinífera* presentaban un efecto toxico dosis-respuesta en células A431 (Nirmala et al., 2017). Mihai et al., (2016) reportaron también en el año 2016 que *Vitis vinífera* tenía un efecto citotóxico sobre la línea celular Vero, lo cual concuerda con nuestros resultados, ya que utilizamos la misma línea celular. Yu y Ahmedna (2013) mencionan que el principal polifenol presente en el orujo de uva, específicamente la variedad roja, como la utilizada en este trabajo, son las antocianinas y existen antecedentes que demuestran su efecto citotóxico (Katsube et al., 2003; Meyers et al., 2003; Lazze et al., 2004). Los extractos derivados de *C. medica* y *C. limon* fueron los menos tóxicos alcanzando una CC₅₀= 108.77 µg/ml y 214.429 µg/ml respectivamente. Esta baja citotoxicidad había sido demostrada ya por Tang et al., (2012) quienes evaluaron el efecto citotóxico de extractos polifenólicos de diferentes especies del genero *Citrus*. González-Molina et al., (2010) han indicado que los principales polifenoles encontrados en estos productos son los flavonoides, específicamente glucósidos de flavanona (Ram y Singh, 2006) y Lyu et al., (2005) han indicado su baja citotoxicidad en células Vero.

La determinación de la concentración efectiva media (CE50%) es esencial para el entendimiento de las características farmacológicas y biológicas de un agente quimioterapéutico. Este valor mide la concentración en la cual la replicación viral es

inhibida mediante un 50% e idealmente se busca que sea considerablemente menor a la CC_{50} . De tal modo que el agente logre inhibir el patógeno sin dañar a las células. Dicha actividad antiviral se determina utilizando ensayos cuantitativos para medir la replicación del virus en presencia de concentraciones crecientes del candidato a fármaco comparado a la replicación en ausencia del mismo (Muller y Milton, 2012). En este trabajo, se evaluó la actividad antiviral de los extractos mediante la técnica de unidades formadoras de placas (UFP) y todos los extractos a excepción del orujo seco de *V. vinifera* mostraron que a $10\mu\text{g/ml}$ eran capaces de inhibir más del 50% de las UFP. El extracto hidroalcohólico de orujo húmedo de *V. vinifera* mostró una CE_{50} de $8.10\ \mu\text{g/ml}$ mientras que para el orujo seco, no se pudo obtener el valor de CE_{50} dado que este era superior a la máxima concentración probada ($10\mu\text{g/ml}$). Anqué no existen antecedentes que demuestren la actividad antiviral de *V. vinifera* contra el virus de sarampión, Orhan et al., (2009) han encontrado que la fracción clorofórmica rica en polifenoles de un extracto derivado de hojas de *Vitis vinifera* posee actividad antiviral contra el virus de parainfluenza el cual pertenece a la misma familia que el virus de sarampión, la familia Paramixoviridae. Los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de *C. medica* y *C. limon* también mostraron tener una buena actividad anti-sarampión presentando una CE_{50} de $8.94\ \mu\text{g/ml}$ y $8.68\ \mu\text{g/ml}$ respectivamente. Rezatofighi et al., habían demostrado en el 2014 la capacidad antiviral de *C. limon* contra otro virus perteneciente a la familia Paramixoviridae, el virus de Newcastle (Rezatofighi et al., 2014) mientras que Xu et al. (2014) encontraron que utilizando el pericarpio de *C. reticulata* rico en flavones polimetoxilados se podía inhibir otro miembro de esta familia, el virus respiratorio sincitial.

En base a las CC_{50} y CE_{50} obtenidas por los cuatro extractos se calculó el valor correspondiente a su índice terapéutico (IT) o de selectividad (IS). Este valor mide la eficiencia relativa de un fármaco respecto a la inhibición de la replicación viral en comparación con la inducción de la muerte celular y se obtiene comparando ambas concentraciones (CC_{50}/CE_{50}) (Muller y Milton, 2012). Es deseable tener un índice de selectividad elevado que proporcione la máxima actividad antiviral con mínima toxicidad celular (FDA 2006). Los resultados en este trabajo muestran que el menor índice de selectividad lo presentó el extracto derivado del orujo húmedo de *V. vinifera* con un valor de $IS= 10.66$. El índice de selectividad del extracto derivado de

orujo seco de *V. vinífera* no pudo ser calculado dado a que no se pudo determinar su CE_{50} . El extracto de *C. medica* mostro un valor $IS= 12.11$ y el extracto de *C. limon* presento el mayor índice de selectividad de los cuatro extractos con un valor de $IS= 24.70$. Nuestro equipo de investigación ha determinado previamente la actividad antiviral del fármaco Ribavirina contra el virus de sarampión, obteniendo un $IS= 11$ (Morán-Santibáñez et al., 2016). El IS del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de *C. limon* fue doblemente mayor a este, siendo altamente efectivo con baja citotoxicidad. Dado a que el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de *C. limon* obtuvo el mayor IS en comparación con el resto de los extractos fue seleccionado para ensayos posteriores. El efecto de este extracto sobre la carga viral del virus de sarampión fue evaluado mediante RT-qPCR concordando con los resultados obtenidos mediante UFP. Esta reducción en la cantidad de copias de RNA viral ha sido demostrada por Zandi et al., (2011) utilizando quercentina contra el virus del dengue y por Vázquez-Calvo et al., (2017) con cloruro de delfinidina y epigallocatequin galato (abundante en te verde) contra el virus del Este del Nilo, Zika y Dengue.

Posteriormente, para conocer a que nivel del ciclo viral del virus de sarampión actuaba el extracto de *C. limon*, se realizaron ensayos de tiempos de adición. El resultado de estos ensayos sugiere que *C. limon* actúa durante las primeras etapas del ciclo, con mayor influencia en la adsorción viral, como se observa en la Figura 17, donde se advierte que a 15 minutos post-infección existe una mayor reducción del porcentaje relativo de UFP. Friedman (2007) menciona que uno de los mecanismos de acción antiviral de los compuestos polifenólicos puede estar basado en su habilidad para prevenir la unión y penetración celular por parte de los virus. Esta capacidad puede deberse a que estos compuestos interactúen con los receptores celulares requeridos para el anclaje viral o a la desnaturalización de las moléculas de envoltura viral llevando a la inactivación irreversible de los viriones (efecto virucida) (Sydiskis et al., 1991). Con el fin de determinar si *C. limon* estaba actuando directamente sobre las partículas virales se realizaron ensayos de efecto virucida. En la Figura 18 se observa que exponiendo el virus a la CE_{25} de *C. limon* durante 3 y 6 horas se logra una inhibición viral de más del 95%, mientras que utilizando su CE_{50} durante el mismo tiempo se alcanza el 100% de inhibición mostrando así tener actividad virucida contra el virus de sarampión. Esto es ideal en un antiviral, ya que

la mayoría de estos presentan una alta toxicidad sobre la célula dado que los virus son parásitos intracelulares, de esta manera el compuesto logra actuar directamente sobre la partícula viral sin afectar la célula huésped. El efecto virucida de polifenoles derivados de productos naturales ya ha sido reportado anteriormente por otros investigadores contra virus de la familia Flaviviridae y Herpesviridae (Vázquez-Calvo et al., 2017; Zgorniak-Nowosielska et al., 1989). Y se han propuesto diferentes mecanismos de acción, por ejemplo, Calland et al., (2015) han observado el mecanismo virucida de epigallocatequina galato (EGCG) contra hepatitis C y creen que este mecanismo se deba probablemente a la interacción de estos compuestos con la función de proteínas virales en múltiples sitios de unión. Ismail y Jusoh (2016) han llevado a cabo estudios de simulación dinámica y acoplamiento molecular que predicen la unión de EGCG, baicalina y quercetina a la superficie de la proteína E del virus del dengue formando interacciones con esta proteína viral. Yamada et al., (2009) proponen un mecanismo diferente, ellos observaron que uno de los principales compuestos polifenólicos en *Olea eurolaea* presente en sus hojas presentaba un efecto virucida mediante la inducción de cambios morfológicos en la partícula viral del virus de influenza. En este trabajo se observó que el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de cáscara de *C. limon* actúa sobre el virus de sarampión, pero se desconoce el mecanismo mediante el cual interactúa el compuesto con la partícula viral por lo que se necesitan estudios posteriores para su determinación.

Se ha reportado que la combinación de agentes antivirales contra diferentes puntos blanco para la replicación viral, puede ofrecer ciertas ventajas en lugar de tratar solo con un agente antiviral como: incrementar su eficiencia, potencial, reducir su toxicidad y efectos secundarios y retrasar la emergencia de un virus resistente cuando interactúan de manera sinérgica (Wijesekara et al., 2011; Vlieghe et al., 2002). En este proyecto se realizaron combinaciones entre el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de *C. limon* con el fármaco antiviral Ribavirina utilizando sus respectivas CE_{50} y CE_{25} (Tabla 6) con el fin de evaluar si estas aumentaban la eficiencia antiviral del extracto mediante una interacción sinérgica entre los compuestos. Los resultados obtenidos muestran que utilizando la combinación de CE_{25} de Ribavirina con CE_{25} de *C. limon* se obtiene una inhibición de 41.01% y que la CE_{50} de Ribavirina con CE_{25} de *C. limon* inhibe solo el 36.04%. Las

combinaciones de CE₅₀ de Ribavirina con CE₅₀ de *C. limon* y de CE₂₅ de Ribavirina con CE₅₀ de *C. limon* presentaron una inhibición ligeramente mayor a las antes mencionadas con un 55.38% y 58.99% de inhibición respectivamente mostrando la misma inhibición viral que la obtenida por *C. limon* de manera individual (55.56% a 10µg/ml). Ninguna de estas combinaciones represento un aumento en la actividad antiviral de *C. limon*. Estos resultados fueron posteriormente analizados para la determinación de su índice combinacional (IC) por el método descrito por Chou (2006). Todas las combinaciones mostraron un efecto combinado antagonista, es decir, un IC>1 tal como se muestra en la Tabla 7. Se sabe que una interacción antagónica puede ser el resultado de la interacción directa entre dos compuestos que pudiera dar como resultado cambios en la conformación de su estructura molecular reduciendo su actividad inhibitoria (Mandalari et al., 2010). Además, Riou et al., (2002) han observado que los taninos derivados de las semillas de uva poseen la habilidad de agregarse de manera dependiente a la concentración. Para determinar si la concentración era el factor determinante del efecto antagónico obtenido, se realizaron nuevas combinaciones bajando la concentración de *C. limon* hasta CE₁₅. Los resultados muestran que utilizando la combinación CE₂₅ de Ribavirina y CE₁₅ de *C. limon* se obtuvo un IC=0.6603, representando un efecto sinérgico mientras que la combinación CE₅₀ de Ribavirina con CE₁₅ de *C. limon* mostro un IC=0.7780 entendiéndose como un efecto levemente sinérgico, con un 70% y 57.5% respectivamente. El efecto sinérgico de polifenoles derivados de *Geranium sanguineum* L. e inhibidores de proteasa ha sido demostrado contra el virus de influenza A (Serkedjieva et al., 2010). Respecto al virus de sarampión, nuestro equipo de investigación ha encontrado en años recientes que la combinación de otro tipo de compuestos como los polisacáridos sulfatados derivados de algas mexicanas y el fármaco antiviral Ribavirina también posee efecto sinérgico contra este virus (Moran-Santibáñez et al., 2016).

El extracto hidroalcohólico derivado de cáscara *C. limon* mostro una baja toxicidad a nivel *in vitro* y una alta efectividad contra el virus de sarampión, alcanzando un índice de selectividad mucho mayor a fármacos administrados como tratamiento de esta enfermedad como es la Ribavirina. Además, su nivel de acción mostro ser mediante un mecanismo virucida, actuando directamente sobre la partícula viral. Con bajas concentraciones del extracto en combinación con la Ribavirina se logró un

efecto combinado sinérgico, lo que podría permitir disminuir el efecto tóxico de la ribavirina con un mejor efecto antiviral. Debido a esto, este extracto o la combinación de este con ribavirina, podría ser un valioso candidato a fármaco antiviral que actúe en conjunto con la vacuna existente para el control del sarampión. De esta manera subproductos como la cascara de *C. limon* podrían ser aprovechados en lugar de ser considerados como desecho.

9. CONCLUSIONES

- I. El extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de corteza de *Haematoxylum brasiletto* se descartó en el proceso de selección ya que a pesar de presentar actividad antiviral fue altamente tóxico a bajas concentraciones (10µg/ml), siendo seleccionados los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de orujo seco y húmedo de *V. vinífera* y de cáscara de *C. medica* y *C. limon*.
- II. El extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon* mostro menor citotoxicidad ($CC_{50}=214.429 \mu\text{g/ml}$) que los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de cáscara de *C. medica* ($CC_{50}=108.77 \mu\text{g/ml}$) y de orujo seco ($CC_{50}=75.250 \mu\text{g/ml}$) y húmedo ($CC_{50}=86.35 \mu\text{g/ml}$) de *V. vinífera*.
- III. Los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de cáscara de *C. limon*, *C. medica* y orujo húmedo de *V. vinífera* fueron igualmente efectivos contra el virus de sarampión ($CE_{50}=8.68 \mu\text{g/ml}$, $CE_{50}= 8.94 \mu\text{g/ml}$ y $CE_{50}=8.10 \mu\text{g/ml}$ respectivamente). Pero debido a su baja citotoxicidad, el extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *Citrus limon* obtuvo el IS mas alto ($IS=24.70$).
- IV. La actividad antiviral del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon* actúa en las primeras etapas de infección (0-30 min post-infección) y fue demostrado su efecto directo sobre la partícula viral (efecto virucida).
- V. Las combinaciones CE_{15} del extracto hidroalcohólico rico en polifenoles derivado de la cáscara de *C. limon* y CE_{25} y CE_{50} de Ribavirina presentan un efecto de combinación sinérgico.

10.PERSPECTIVAS

Sería interesante realizar la caracterización y determinación de la capacidad antioxidante e inmunomoduladora de los extractos hidroalcohólicos ricos en polifenoles derivados de subproductos naturales y su posible relación a su actividad antiviral.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los extractos utilizados pueden ser potenciales antivirales contra otros virus envueltos de importancia médica por lo que evaluar su actividad antiviral y mecanismo de acción podría ser de gran importancia.

La realización de pruebas *in vivo* en un modelo animal proporcionaría datos importantes de los compuestos sobre su toxicidad, efectividad, biodisponibilidad y metabolismo.

11.BIBLIOGRAFIA

1. Álvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E, Sánchez-García V. 2010. Inhibitory effect of grapefruit juice on the genotoxic damage induced by ifosfamide in mouse. *Plant Foods for Human Nutrition* 65:369-373
2. Ameer B, Weintraub R, Johnson J, Yost R, Rouseff R. 1996. Flavanone absorption after naringin, hesperidin and citrus administration. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 60:34-40
3. Amoros M, Simoes C, Girre L, Sauvager F, Cormier M. 1992. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Product* 55: 1732–1740.
4. Argueta A, Cano A, Rodarate M, 1994. Atlas de las plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México, DF, pp. 1786.
5. Armstrong W. 1992. Logwood and Brazilwood: trees that spawned 2 nations. *Pacific Horticulture* 53: 38-43
6. Aruoma O, Landes B, Ramful-Baboolall, D. 2012. Functional benefits of Citrus fruits in the management of diabetes. *Preventive Medicine* 54: 12–16.
7. Assini J, Mulvihill E, Sutherland B. 2013. Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis in *Ldlr*/mice. *Journal of Lipid Research* 54: 711–724.
8. Ayala-Zavala J, Rosas-Domínguez C, Vega-Vega V, González-Aguilar G. 2010. Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own by-products: looking for integral exploitation. *Journal of Food Science* 75: R175–R181
9. Bagchi D, Bagchi M, Stohs S. 2002. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957: 260–270.
10. Bagchi D, Swaroop A, Preuss H, Bagchi M. 2014. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: An overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 768: 69–73.
11. Baldi A, Rosen R, Fukuda E, Ho C. 1995. Identification of nonvolatile components in lemon peel by high-performance liquid chromatography with

- confirmation by mass spectrometry and diode-array detection. *Journal of Chromatography A* 718: 89-97
12. Baldwin E. 1993. Citrus fruit. In: *Biochemistry of fruit ripening*. Seymour G, Taylor J and Tucker G (eds). Chapman and Hall: London, pp.107-149
 13. Balestrieri E, Pizzimenti F, Ferlazzo A, Giofre S, Iannazzo D, Piperno A, Romeo R, Chiacchio M, Mestino A, Macchi B. 2011. Antiviral activity of seed extract from *Citrus bergamia* towards human retroviruses. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 19:2084-2089.
 14. Bankamp B, Takeda M, Zhang Y, Xu W, Rota P. 2015. Genetic characterization of measles vaccine strains. *Journal of Infectious Diseases* 204: S533-S548.
 15. Bell J, Donovan J, Wong R, Waterhouse A, German J, Walzem R, Kasim-Karakas S. 2000. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *American Journal of Clinical Nutrition* 71:103–108
 16. Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin F, Ortuño A, Del Rio J. 1997. Uses and properties of Citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4505-4515
 17. Biskind M and Martin E. 1954. Use of Citrus flavonoids in respiratory infections. *American Journal of Digestive Diseases* 21:177
 18. Bocco A, Cuvelier M-E, Richard H, Berset C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of Citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:2123-2129
 19. Burin V, Ferreira-Lima N, Panceri C, Bordignon-Luiz M. 2014. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal* 114:155-163
 20. Calabrò M, Galtieri V, Cutroneo P, Tommasini S, Ficarra P, Ficarra R. 2004. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in *Citrus bergamia* juice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35: 349-363
 21. Calland N, Sahuc M-E, Belouzard S, Pène V, Bonnafous P, Mesalam A, Deloison G, Descamps V, Sahpaz S, Wychowski C, Lambert O, Brodin P, Duverlie G, Meuleman P, Rosenberg A, Dubuisson J, Rouillé Y, Séron K.

2015. Polyphenols inhibit hepatitis C virus entry by a new mechanism of action. *Journal of Virology* 89: 10053-10063.
22. Cantos E, Espín J, Tomás-Barberán F. 2002. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50: 5691–5696.
23. Campagna M and Rivas C. 2010. Antiviral activity of resveratrol. *Biochemical Society Transactions* 38: 50–53
24. Carvalho O, Botelho C, Ferreira C, Ferreira H, Santos M, Diaz M, Oliveira T, Soares-Martins J, Almeida M, Júnior A. 2013. *In vitro* inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolics acids: implications of structural differences for antiviral design. *Research in Veterinary Science* 95:717-724
25. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer N. 2012. Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology* 3:141.
26. CDC.2017. Measles Cases and Outbreaks. [En línea]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/measles/cases-outbreaks.html>
27. Cha J-Y, Cho Y-S, Kim I, Anno T, Rahman S, Yanagita T. 2001. Effect of hesperetin, a Citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 56: 349-358
28. Cheynier V, Comte G, Davies K, Lattanzio V, Martens S. 2013. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 72: 1–20.
29. Cheynier V. 2006. Flavonoids in wine. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*, Andersen O and Markham K (eds). CRC Press: Florida, pp. 263–318.
30. Cheynier, V. 2012. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews* 11: 153–177.
31. Chiang L, Ng L, Cheng P, Chiang W, Lin C. 2005. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 32:811-816.
32. Chiang L, Chiang W, Liu M, Lin C. 2003. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:194-198.

33. Chou T. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews* 58: 621–681.
34. Clercq De E, Li G. 2016. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews* 29:695-747.
35. Coelho R, Hermsdorff H, Bressan J. 2013. Anti-inflammatory properties of orange juice: posible favorable molecular and metabolic effects. *Plant Foods for Human Nutrition* 68:1-10
36. Creagh T, Ruckle J, Tolbert D, Giltner J, Eiznhamer D, Dutta B, Flavin M, Xu Z. 2001. Safety and pharmacokinetics of single doses of (+)-calanolide A, a novel, naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy, human immunodeficiency virus-negative human objects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:1379-1386
37. Critchfield J, Butera S, Folks T. 1996. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Research and Human Retroviruses* 12: 39– 46
38. Crozier A, Clifford M, Ashihara H. 2006. Plant secondary metabolites. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Occurrence, structure and role in the human diet. Alan Crozier, Indu B. Jaganath and Michael N. Clifford (eds) Blackwell publishing: Singapore, pp.1-2.
39. Crozier A, Jaganath I, Clifford. M. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Report* 26:965–1096.
40. De Ancos B, Colina-Coca C, Gonzalez-Peña D, Sánchez-Moreno C. 2015. Bioactive compounds from vegetable and fruit by-products. In: *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and applications*. Gupta V, Tuohy M, Lohani M and O'Donovan A (eds). John Wiley and Sons. Madrid: 3-29.
41. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer J, Tognolini M, Borges G, Crozier A. 2013. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling* 18: 1818–1892.
42. Deng J, Kelley J, Barchi J, Sanchez T, Dayam R, Pommier Y, Neamati N. 2006. Mining the NCI antiviral compounds for HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14: 3785-3792

43. Dias D, Urban S, Roessner U. 2012. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* 2: 303-336.
44. Djilas S, Canadanovic-Brunet J, Gordana C. 2009. By products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 15:191-202
45. Dugo P, Presti M, Ohman M, Fazio A, Dugo G, Mondello L. 2005. Determination of flavonoids in Citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS. *Journal of Separation Science* 28:1149-1156
46. Evers D, Chao C, Wang X, Zhang Z, Huong S, Huang E. 2005. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Research* 68:124-34
47. FAO. 2000. Citrus fruit, fresh and processed. Annual statistics 2000 [En linea] disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2001400147>
48. FAO. 2011. Global food losses and food waste. Food and Agriculture Organization of the United Nations [En linea]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf>
49. FDA. 2006. Guidance for industry: Antiviral product development-conducting and submitting virology studies to the agency. *Clinical Antimicrobial* pp:1-14
50. Flint J, Racaniello V, Rall G, Skalka A. 2015. Principles of virology. Volume I Molecular Biology. American Society for Microbiology: Washington, pp. 561-572.
51. Frankel E, Kanner J, German J, Parks E, Kinsella J. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341:454-457
52. Friedman M. 2014. Antibacterial, antiviral and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 6025-6042
53. Friedman M. 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition and Food Research* 51:116-134

54. Fulton B, Sachs D, Beaty S, Won S, Lee B, Palese P, Heaton N. 2015. Mutational analysis of measles virus suggests constraints on antigenic variation of the glycoproteins. *Cell Reports* 11: 1331-1338
55. Clercq E De. 2016. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clinical Microbiology Reviews*. 29: 695–747.
56. Gentili B and Horowitz R. 1964. Flavonoids of Citrus-VII. Limocitrol and isolimocitrol. *Tetrahedron* 20:2313-2318
57. Gegova G, Manolova N, Serkedzhieva I, Maksimova V, Uzunov S, Dzequze D, Indulen M. 1993. Combined effect of selected antiviral substances of natural and synthetic origin. II. Anti-influenza activity of a combination of polyphenolic complex isolated from *Geranium sanguineum L.* and rimantadine *in vivo*. *Acta Microbiologica Bulgarica* 30: 37-44
58. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh M. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22: 277-281
59. Goldberg D and Soleas G. 2011. Wine and health: a paradigm for alcohol and antioxidants. *Journal of Medical Biochemistry* 30: 93–102.
60. González-Aguilar G, Villegas-Ochoa M, Martínez-Téllez M, Gardea A, Ayala-Zavala J. 2007. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science* 72: 197-202.
61. González-Molina E, Domínguez-Perles R, García-Viguera C. 2010. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51:327-345
62. González-Molina E, Moreno D, García-Viguera C. 2008. Genotype and harvest influence the phytochemical quality of Fino lemon juice (*Citrus limon* (L) Burm. F.) for industrial use. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 56:1669-1675
63. Gorinstein, S, Martín-Belloso O, Park Y-S, Haruenkit R, Lojek A, Ciz M, Caspi A, Libman I, Trakhtenberg S. 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different Citrus fruits. *Food Chemistry* 74: 309–315.
64. Griffin D, Lin W-H, Pan C-H. 2012. Measles virus, immune control and persistence. *Microbiology Reviews* 36: 649–662.
65. Griffin D and Oldstone M. 2009. Measles: History and basic biology. Introduction. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 329:1

66. Guilford J and Pezzuto J. 2011. Wine and health: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 471–486.
67. Gustavsson J, Cederberg C, Sonesson U, Van Otterdijk R, Meybeck A. 2011. *Global food losses and food waste*. Roma: FAO.1–29.
68. Haidari M, Ali M, Ward C, Madjid M. 2009. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine* 16:1127-1136
69. Harborne J and Williams C. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481–504.
70. Havsteen B. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96: 67–202.
71. Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 572-584
72. Hernandez-Jimenez A, Gomez-Plaza E, Martinez-Cutillas A, Kennedy J. 2009. Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell x Syrah grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:10798–10803.
73. Ho H, Cheng M, Weng S, Leu Y, Chiu D. 2009. Antiviral effect of epigallocatechin gallate on enterovirus 71. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:6140-6147.
74. Huang D, Ou B, Prior R. 2005 The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841–1856.
75. Huang S, Shieh G, Lee L, Teng H, Kao S, Lin J. 1997. Inhibition effect of shengma-gegen-tang on measles virus in Vero cells and human peripheral blood mononuclear cells. *American Journal of Chinese Medicine* 25:89-96.
76. Huang W, Zhang X, Wang Y, Ye W, Ooi V, Chung H, Li Y. 2010. Antiviral biflavonoids from *Radix Wikstroemiae* (Liaogewanggen). *Chinese Medicine* 5:23.
77. Hussein G, Miyashiro H, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T, Kakiuchi N, Shimotohno K. 1999. Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. *Phytotherapy Research* 13: 31–36.
78. Hwang S, Shih P, Yen G. 2012. Neuroprotective effects of Citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 877–885.

79. Ibrahim M, Mattar Z, Abdel-Khalek H, Azzam Y. 2017. Evaluation of antibacterial efficacy of anise wastes against some multidrug resistant bacterial isolates. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 10:34-43
80. Ismail N and Jusoh S. 2017. Molecular docking and molecular dynamics simulation studies to predict flavonoid binding on the surface of DENV E protein. *Intradisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* 9: 499-511
81. Ito M, Iwasaki M, Takeda M, Nakamura T, Yanagi Y, Ohno S. 2013. Measles virus nonstructural C protein modulates viral RNA polymerase activity by interacting with host protein SHCBP1. *Journal of Virology* 87:9633-9642
82. Izquierdo L and Sendra J. 2003. Citrus fruits. Composition and characterization. In *Encyclopedia of food sciences and nutrition* Caballero L and Finglas P (Eds.) Academic Press: Oxford, pp. 6000
83. Jasna S, Brunet C, Aetkoviæ G. 2009. By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 15:191-202.
84. Joo P and Lee H. 2005. *In vitro* antiviral activity of aqueous extracts from Korean medicinal plants against influenza virus type A. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 924-929
85. Joshi V, Kumar A, Kumar V. 2012. Antimicrobial, antioxidant and phytochemicals from fruit and vegetable wastes: a review. *International Journal of Food and Fermentation Technology* 2: 123-136
86. Kabir F, Tow W, Hamauzu Y, Katayama S, Tanaka S, Nakamura S. 2015. Antioxidant and cytoprotective activities of extracts prepared from fruit and vegetable wastes and by-products. *Food Chemistry* 167:358-362
87. Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Yamaki K, Kobori M. 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:68-75.
88. Kaul T, Middleton E, Ogra P. 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology* 15: 71-79
89. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. 1999. Quantitation of flavonoid constituents in Citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:3565-3571

90. Kitamura K, Honda M, Yoshizaki H, Yamamoto S, Nakane H, Fukushima M, Ono K, Tokunaga T. 1998. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro*. *Antiviral Research* 37: 131–140.
91. Kumar S, Gupta A, Pandey A. 2013. Calotropis procera root extract has the capability to combat free radical mediated damage. *International Scholarly Research Notices: Pharmacology* 2013:1-8
92. Kuzuhara T, Iwai Y, Takahashi H, Hatakeyama D, Echigo N. 2009. Green tea catechins inhibit the endonuclease activity of influenza A virus RNA polymerase. *PLoS Curr* 1:RRN1052.
93. Kyselova. 2011. Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. *Interdisciplinary Toxicology* 4:173-183.
94. Lagha-Benamrouche S and Madani K. 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: peels and leaves. *Industrial Crops and Products* 50:723–730
95. Lallan R and Godara R. 2002. Changes in biochemical profiles in 'Kinnow' mandarin during fruit maturation and ripening. *Indian Journal Citriculture* 1:140-146.
96. Lazze M, Savio M, Pizzala R, Cazzalini O, Perucca P, Scovassi A, Stivala L, Bianchi L. 2004. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis* 25: 1427-1433.
97. Lee H, Lee Y, Youn H-N, Lee D, Kwak J, Seong B, Lee J, Park S, Choi I, Song C. 2012. Anti-influenza virus activity of green tea by-products *in vitro* and efficacy against influenza virus infection in chickens. *Poultry Science* 91:66-73
98. Lee J, Kim H, Lee Y. 2003. A new anti-HIV flavonoid glucuronide from *Chrysanthemum morifolium*. *Planta Medica* 69: 859–861.
99. Lenucci M, Durante M, Montefusco A, Dalessandro G, Piro G. 2013. Possible use of the carbohydrates present in tomato pomace and byproducts of the supercritical dioxide lycopene extraction process as biomass for bioethanol production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 3683–3692.

100. Leouifoudi I, Harnafi H, Abdelmajid Z. 2015. Olive mill waste extracts: polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities. *Advances in Pharmacological Sciences* 2015: 1-11
101. Li B, Fu T, Dongyan Y, Mikovits J, Ruscelli F, Wang J. 2000. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochemical Biophysical Research Communications* 276: 534–538.
102. Likhitwitayawuid K, Chaiwiriya S, Sritularaka B, Lipipunb V. 2006. Antiherpetic flavones from the heartwood of *Artocarpus gomezianus*. *Chemistry and Biodiversity* 3: 1138
103. Lin L-T, Chen T-Y, Lin S-C, Chung C-Y, Lin T-C, Wang G-H, Robert C-C, Richardson C. 2013. Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. *BMC Microbiology* 13:187.
104. Lin Y, Flavin M, Schure R, Chen F, Sidwell R, Barnard D, Huffman J, Kern E. 1999. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Medica* 65:120-125.
105. Li S, Wang H, Guo L, Zhao H, Ho C-T. 2014. Chemistry and bioactivity of nobiletin and its metabolites. *Journal of Functional Foods* 6:2-10
106. Low J, Wu K, Chen K, Ng M, Chu J. 2011. Narasin, a novel antiviral compound that blocks dengue virus protein expression. *Antiviral Therapy* 16:1203-1218.
107. Lyu S, Rhim J, Park W. 2005. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*. *Archives of Pharmaceutical Research* 28:1293-301.
108. Macheix J-J, Fleuriet A, Billot J. 1990. Fruit phenolics. CRC Press: Florida, pp. 1-382
109. Magiorkinis E, Beloukas A, Diamantis A. 2011. Scurvy: past, present and future. *European Journal of Internal Medicine* 22:147-152
110. Mahmood N, Pizza C, Aquino R, De Tommasi N, Piacente S, Colman S, Burke A, Hay A. 1993. Inhibition of HIV infection by flavonoids. *Antiviral Research* 22: 189– 199.
111. Makris D, Boskou G, Andrikopoulos N, Kefalas P. 2008. Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis*

- vinifera*) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 226:1075–1079.
112. Mandalari G, Bisignano C, D'Arrigo M, Ginestra G, Arena A, Tomaino A, Wickham M. 2010. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. *Letters in Applied Microbiology* 51: 83-89
 113. Manthey J and Grohmann K. 2001. Phenols in Citrus peel byproducts. Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in Citrus peel molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:3268-3273
 114. Marín F, Soler-Rivas C, Benavente-García O, Castillo J, Pérez-Alvarez, J. 2007. By-products from different Citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry* 100: 736–741
 115. Martínez-Luscher J, Torres N, Hilbert G, Richard T, Sanchez-Diaz M, Delrot S, Aguirreolea J, Pascual I, Gomes E. 2014. Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochemistry* 102: 106–114.
 116. Martino V, Lopez P, Martinez J, Sanromán M, Cuevas M, Santiago E, Lasarte J, Font M, Coussio J, Monge A. 2002. Inhibitory effect against polymerase and ribonuclease activities of HIV-reverse transcriptase of the aqueous leaf extract of *Terminalia triflora*. *Phytotherapy Research* 16: 778–780.
 117. Matias A, Serra, A, Silva A, Perdigo R, Ferreira T, Marcelino I, Silva S, Coelho A, Alves P, Duarte C. 2010. Portuguese winemaking residues as a potential source of natural anti-adenoviral agents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61: 357–368.
 118. Mazid M, Khan T, Mohammad F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 3: 232-249.
 119. Meiyanto E and Hermawan A. 2012. Natural products for cancer targeted therapy: Citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13: 427–436.
 120. Menéndez-Arias L and Gago F. 2013. Antiviral agents: structural basis of action and rational design. *Structure and physics of viruses: an integrated textbook*, Mateu M. (ed). Springer: Madrid, pp. 599-630.

121. Meyers K, Watkins C, Pritts M, Liu R. 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6887-6892.
122. Middleton E and Kandaswami C. 1994. Potential health-promoting properties of Citrus flavonoids. *Food Technology* 48:115-119
123. Mihai C-T, Vochita G, Gherghel D, Pasa R, Nechita B, Nechita A, Rotinberg P. 2016. Mechanism of action of some new cytostatic/cytotoxic polyphenolic extracts from *Vitis vinifera* sedes. *Analele Științifice ale Universității* 17: 107-112
124. Montanari A, Chen J, Widmer W. 1998. Citrus flavonoids: a review of past biological activity against disease. Discovery of new flavonoids from Dancy tangerine cold pressed peel oil solids and leaves. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 439:101-116
125. Morán-Santibañez K, Cruz-Suárez L, Ricque-Marie D, Robledo D, Freile-Pelegrín Y, Peña-Hernández M, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Avila L. 2016. Synergistic effects of sulfated polysaccharides from mexican seaweeds against Measles virus. *BioMed Research International* 2016: 1-11
126. Mouly P, Arzouyan C, Gaydou E, Estienne J. 1994. Differentiation of Citrus juice by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:70-79
127. Muller P and Milton M. 2012. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nature Reviews* 11: 751-761.
128. Mulvihill E and Huff M. 2012. Citrus flavonoids and the prevention of atherosclerosis. *Cardiovascular and Hematological Disorders Drug Targets* 12: 84–91.
129. Nair M, Kandaswami C, Mahajan S, Nair H, Chawda R, Shanahan T, Schwartz S. 2002. Grape seed extract proanthocyanidins downregulate HIV-1 entry coreceptors, CCR2b, CCR3 and CCR5 gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biological Research* 35: 421–431.
130. Naithani R, Huma L, Holland L, Shukla D, McCormick D, Mehta R, Moriarty R. 2008. Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 8: 1106-1133
131. Nirmala J, Akila S, Narendhirakannan R, Chatterjee S. 2017. *Vitis vinifera* peel polyphenols stabilized gold nanoparticles induce cytotoxicity

- and apoptotic cell death in A431 skin cancer cell lines. *Advanced Powder Technology* 28: 1170-1184.
132. Ohtake N, Nakai Y, Yamamoto M, Sakakibara I, Takeda S, Amagaya S, Aburada M. 2004. Separation and isolation methods for analysis of active principles of Sho-Saiko-To (SST) oriental medicine. *Journal of Chromatography* 812:135–148.
 133. OPS. 2017. Boletín semanal de sarampión/ rubéola. [En línea]. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=730&Itemid=39426&lang=es
 134. Orhan D, Orhan N, Özcelik B, Ergun F. 2009. Biological activities of *Vitis vinifera* L. leaves. *Turkish Journal of Biology* 33: 341-348
 135. Pak C. 2004. Medical management of urinary stone disease. *Nephron Clinical Practice* 98:49-53
 136. Parfitt J, Barthel M, Macnaughton S. 2010. Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365:3065–3081.
 137. Parker M, Chabot S, Ward B, Johns T. 2007. Traditional dietary additives of the Maasai are antiviral against the measles virus. *Journal of Ethnopharmacology* 114:146-152.
 138. Park E and Pezzuto J. 2012. Flavonoids in cancer prevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 12: 836–851.
 139. Pastrana-Bonilla E, Akoh C, Sellappan S, Krewer G. 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:5497–4503.
 140. Peterson J, Beecher G, Bhagwat S, Dwyer J, Gebhard S, Haytowitz D, Holden J. 2006. Flavanones in grapefruit, lemons and limes: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: S74-S80
 141. Phrutivorapongkul A, Lipipun V, Ruangrunsi N, Kirtikara K, Nishikawa K, Maruyama S, Watanabe T, Ishikawa T. 2003. Studies on the chemical constituents of stem bark of *Millettia leucantha*: isolation of new

- chalcones with cytotoxic anti-herpes simplex virus and anti-inflammatory activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokio)* 51:187-190
142. Pozo-Bayón M, Monagas M, Bartolomé B, Moreno-Arribas M. 2012. Wine features related to safety and consumer health: an integrated perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 31–54.
 143. Qian S, Fan W, Qian P, Zhang D, Wei Y, Chen H, Li X. 2015. Apigenin restricts FMDV infection and inhibits viral IRES driven translational activity. *Viruses* 7:1613–1626.
 144. Rafiq S, Kaul R, Sofi S, Bashir N, Nazir F, Nayik G. 2016. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 30:1-6
 145. Ram and Singh. 2006. Medicinal importance of Citrus products and by-products-a review. *The Agricultural History Review* 27: 170-180
 146. Reed L and Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27:493-497
 147. Rezatofighi S, Elham S, Ebrahimian, Lordifar, Mehravar N, Sirnejad. 2014. Antiviral activity of *Citrus limon*, *Matricaria recutia* L., *Allium ascalonicum* L. and *Rosa damascene* against Newcastle disease virus. *Journal of Veterinary Microbiology* 10:1-7
 148. Riou V, Vernhet A, Doco T, Moutounet M. 2002. Aggregation of grape seed tannins in model wine- effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 16:17-23.
 149. Romagnolo D and Selmi O. 2012. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics* 31: 206– 238.
 150. Santhosh C and Mishra P. 1996. Molecular electrostatic potential mapping and structure – activity relationship for 3-methoxyflavones. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 33:458-464
 151. Secretaría de Salud. 2017. Avisos Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/avisos-epidemiologicos-2017>

152. Serkedjieva J, Nikolova E, Kirilov N. 2010. Synergistic inhibition of influenza A virus replication by a plant polyphenol-rich extract and epsilon-aminocaproic acid *in vitro* and *in vivo*. *Acta Virologica* 54: 137-145
153. Shan Y. 2016. Functional components of Citrus peel. In: Comprehensive utilization of Citrus by-products. Shan Y (ed). Academic Press: London, pp. 1-10
154. Shrikhande A. 2000. Wine byproducts with health benefits. *Food Research International* 33:469–474.
155. Sica D. 2006. Interaction of grapefruit juice and calcium channel blockers. *American Journal of Hypertension* 17:768-773
156. Song J, Lee K, Seong B. 2005. Antiviral effects of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research* 68: 66-74
157. Sun B, Ricardo-da-Silva J, Spranger I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4267-4274
158. Swain T and Hillis W. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.- The quantitative analysis of phenolic constituents. *Science of Food and Agriculture* 10: 63-68.
159. Sydiskis R, Owen D, Lohr L, Rosler K, Blomster R. 1991. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother* 35:2463–2466
160. Takatsuki A, Tamura G, Arima K. 1969. Antiviral and antitumor antibiotics. Effects of ascochlorin and other respiration inhibitors on multiplication of newcastle disease virus in cultured cells. *Applied Microbiology* 17: 825 – 829
161. Tang L, Ling A, Koh R, Chye S, Voon K. 2012. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12: 1-10
162. Lou Z, Sun Y, Rao Z. 2014. Current progress in antiviral strategies. *Trends in Pharmacological Sciences* 35: 86–102.
163. Teichmann K, Kuliberda M, Schatzmayr G, Pacher T, Zitterl-Eglseer K, Joachim A, Hadacek F. 2016. *In vitro* inhibitory effects of plant-derived by-products against *Cryptosporidium parvum*. *Parasite* 23: 1-8

164. Tewtrakul S, Nakamura N, Hattori M, Fujiwara T, Supavita T. 2002. Flavanone and flavonol glycosides from the leaves of *Thevetia peruviana* and their HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase inhibitory activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50: 630–635.
165. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 669-675.
166. Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry* 104: 466-479
167. Vandercook C and Tisserat B. 1989. Flavonoid changes in developing lemons grow *in vivo* and *in vitro*. *Phytochemistry* 28: 799-803.
168. Vázquez-Calvo Á, de Oya N, Martín-Acebes M, Garcia-Moruno, Saiz J-C. 2017. Antiviral properties of the natural polyphenols delphinidin and epigallocatechin gallate against the flaviviruses West Nile virus, Zika virus, and Dengue virus. *Frontiers in Microbiology* 8: 1-8
169. Vlieghe P, Clerc T, Pannecouque C, Witvrouw M, De Clercq E, Salles J, Kraus J. 2002. Synthesis of new covalently bound kappa-carrageenan-AZT conjugates with improved anti-HIV activities. *Journal of Medical Chemistry* 45: 1275–1283.
170. Wang L, Wang J, Fang L, Zheng Z, Zhi D, Wang S, Li S, Ho C, Zhao H. 2014. Anticancer activities of Citrus peel polymethoxyflavones related to angiogenesis and others. *BioMed Research International* 2014:1-10
171. Wang Y-C, Chuang Y-C, Hsu H-W. 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of Citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry* 106: 277–284.
172. Wang Y, Chen M, Zhang J, Zhang X, Huang X, Wu X, Zhang Q, Li Y, Ye W. 2012. Flavone C-glycosides from the leaves of *Lophatherum gracile* and their *in vitro* antiviral activity. *Planta Medica* 78:46-51.
173. Wenzel U, Kuntz S, Daniel H. 2001. Flavonoids with epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase inhibitory activity stimulate PEPT1-mediated cefixime uptake into human intestinal epithelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299:351-357

174. WHO: Chan M, Frieden T, Lake A, McGovern G, Wirth T. 2012. WHO Library Cataloguing-in Publication Data: Global measles and rubella strategic plan: 2012-2020, [En línea]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44855/1/9789241503396_eng.pdf.
175. WHO: Han S. 1993. Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines, [Online]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2946e/1.html#Jh2946e.1>
176. WHO. 2017. Measles and Rubella Surveillance Data. [En línea]. Disponible en: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/active/measles_monthlydata/en/index1.html
177. Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S-K. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* 84: 14-21.
178. Wu C-C, Fang C-Y, Cheng Y-J, Hsu H-Y, Chou S-P, Huang S-Y, Tsai C-H, Chen J-Y. 2017. Inhibition of Epstein-Barr virus reactivation by the flavonoid apigenin. *Journal of Biomedical Science* 24: 1-13
179. Wu J, Wang X, Yi Y, Lee K. 2003. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 13: 1813–1815.
180. Wu X, Akatsu H, Okada H. 1995. Apoptosis of HIV-infected cells following treatment with Sho-Saiko-to and its components. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 48: 79–87.
181. Xu J-J, Wu X, Li M-M, Li G-Q, Yang Y-T, Lou H-J, Huang W-H, Chung H, Ye W-C, Wang G-C, Li Y-L. 2014. Antiviral activity of polymethoxylated flavones from “Guangchenpi”, the edible and medicinal pericarps of *Citrus reticulata* “Chachi”. *Journal of Agricultural and Food Medicine* 10: 2182-2189
182. Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia V, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. 2009. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Research* 83:35-44.

183. Yamaguchi K, Honda M, Ikigai H, Hara Y, Shimamura T. 2002. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research* 53: 19–34.
184. Yu J and Ahmedna M. 2013. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology* 48:221–237.
185. Zandi K, Teoh B, Sam S, Wong P, Mustafa M, Abubakar S. 2011. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology* 8:560.
186. Zandi K, Teoh B, Sam S, Wong P, Mustafa M, Abubakar S. 2012. Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12:214.
187. Zgorniak-Nowosielka I, Zawilinska B, Manolova N, Serkedjieva J. 1989. A study on the antiviral action of a polyphenolic complex isolated from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. VIII. Inhibitory effect on the reproduction of herpes simplex virus type 1. *Acta Microbiologica Bulgarica* 24: 3-8.
188. Zhang W, Qiao H, Lv Y, Wang J, Chen X, Hou Y, Tan R, Li E. 2014. Apigenin inhibits enterovirus-71 infection by disrupting viral RNA association with trans-acting factors. *PLoS One* 9: e110429
189. Zhang X, Rennick L, Duprex W, Rima B. 2013. Determination of spontaneous mutation frequencies in measles virus under nonselective conditions. *Journal of Virology* 87: 2686-2692
190. Zipprich J, Winter K, Hacker J, Xia D, Watt J, Harriman K. 2015. Measles outbreak-California, December 2014-february 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 64: 153-154

RESUMEN BIOGRÁFICO

Karen Jazmín Ledezma González

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Campo de estudio: Virología

Datos personales: Nacida en Monterrey N.L. el 6 de enero de 1994, hija de Oscar Ledezma López e Irma Raquel González Leal.

Educación:

- Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2015

Experiencia profesional:

- Tesista de licenciatura en la Unidad de Virología y Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL durante el periodo de 2014 a diciembre 2015
- Tesista de maestría en la Unidad de Virología y Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL durante el periodo de enero 2015 a diciembre 2017

Presentaciones en congresos:

- QBP. Karen Jazmín Ledezma González, Dr.C. Cristina Rodríguez Padilla, Dr. C. José Santos García, Dr. C. Jorge Esteban de J Dávila Aviña, Dr. C. Laura Trejo Ávila. 2017. Actividad citotóxica y antiviral de polifenoles derivados de subproductos naturales contra el virus de sarampión cepa Edmoston. **XXIX Congreso Nacional de Investigación en Medicina “Translational Medicine From Bench to Bedside”**

Presentaciones en encuentros:

- QBP. Karen Jazmín Ledezma González, M.C. Karla Selene Morán Santibáñez, Dra. L. Elizabeth Cruz Suarez. 2015. Actividad antiviral de algas mexicanas contra el virus de sarampión cepa Edmoston. **Tercer Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Nuevo León.**

Presentaciones en foros:

- QBP. Karen Jazmín Ledezma González, M.C. Karla Selene Morán Santibáñez, Dra. L. Elizabeth Cruz Suarez, Dra. María Cristina Rodríguez-Padilla, Dra. Laura María Trejo-Ávila. 2015. Actividad antiviral de algas mexicanas contra el virus de sarampión cepa Edmoston. **11° Foro Internacional en SIDA, Enfermedades Emergentes y Re-emergentes.**