

## Uso de arbutina de *Arctostaphylos pungens* como prebiótico

A. Velázquez-Ledezma<sup>1</sup>, G. Ramírez-García<sup>2</sup>, M. A. García-Revilla,<sup>3</sup> E. Díaz-Cervantes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Alimentos, Centro Interdisciplinario del Noreste (CINUG), Universidad de Guanajuato, 37975 Tierra Blanca, Guanajuato, México. <sup>2</sup>Cátedras CONACyT-Centro de Investigaciones en Química Aplicada, COITTEC, Saltillo, Coahuila, 25294, México. <sup>3</sup>Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, C. P. 36050 Guanajuato, Gto., Mexico [e.diaz@ugto.mx](mailto:e.diaz@ugto.mx)

**RESUMEN:** Las Bifidobacterias probióticas en combinación con carbohidratos prebióticos han sido documentados con efectos positivos en la salud humana, relacionados con trastornos gastrointestinales. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, empleando métodos computacionales, explican la interacción entre fructanos encontrados en el agave (1-cestosa, bifurcosa y neocestosa) y el polisacárido carboximetil celulosa con una proteína de transporte, denominada BIG16BP, la cual se expresa en *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Con base a dichos estudios, en el presente trabajo se realizó un estudio computacional de la interacción entre la misma proteína transportadora, BIG16BP y la arbutina (4-hidroxifenil- $\beta$ -D-glucopiranosido), glicósido de la p-hidroquinona presente en las hojas y frutos de la pingüica (*Arctostaphylos pungens*). Destacando que esta última, es utilizada en la medicina tradicional para tratar problemas estomacales, y funge como diurético para problemas del tracto urinario, como cálculos renales e infecciones de la vejiga. Los resultados obtenidos, nos muestran que en comparación con los fructanos y la carboximetil celulosa, la interacción entre la proteína seleccionada como blanco y la arbutina es más favorable, pudiendo proponer esta última como prebiótico.

**Palabras clave:** Prebiotico, arbutina, *docking*.

**ABSTRACT:** Probiotics as *Bifidobacterium* combined with some prebiotic carbohydrates have been reported with positive effects in the human health, specifically related to gastrointestinal diseases. Previous works performed by our research group, through computational approaches, explain the interaction between some agave fructans (1-kestose, bifurcose and neokestose), the polysaccharide carboxyl methyl cellulose with a transporter protein expressed in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, so-called BIG16BP. Based on the obtained results, in the present study has been performed a computational study of the comparative interaction between the BIG16BP target and the arbutin, the last as glycoside present in the pingüica (*Arctostaphylos pungens*). Note that, the last is a plant used in folk medicine for the treatment of some stomach diseases, being this a diuretic auxiliary in renal pathologies. The results of the present work show that in comparison with fructans and CMC, the arbutin presents a better interaction with the selected target, therefore the arbutin can be proposed as a prebiotic.

**Keywords:** Prebiotic, arbutin, *docking*.

**Area:** Nutrición y nutraceuticos

### INTRODUCCIÓN

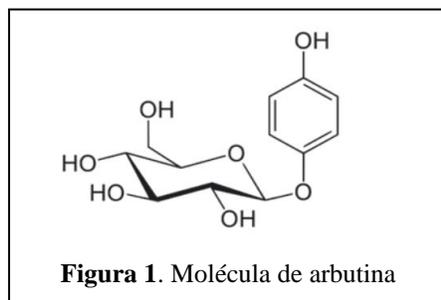
Los prebióticos son sustancias de la dieta que fundamentalmente consisten en polisacáridos y oligosacáridos (no almidón). Dichos prebióticos, no pueden ser digeridos por el cuerpo humano o huésped, pero benefician la salud del individuo gracias a su influencia positiva sobre el microbiota intestinal, estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifáticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales. (Cagigas, A., & Anesto, J., 2002) En otras palabras, la administración o el uso de prebióticos busca influir sobre el ambiente intestinal dominado por trillones de microorganismos comensales, para beneficiar la salud humana (Guarner, F. et, al 2017).

Por otra parte, los fructanos son polímeros de fructosa derivados de la molécula de sacarosa, la cual es un disacárido (fructosa y glucosa). Estas moléculas tienen diferentes estructuras, longitudes y grado de polimerización (Armando Ulloa, et al 2007). En algunos estudios recientes, realizados de manera *in silico* por nuestro grupo de investigación, se probaron las interacciones entre tres fructanos (1-cestosa,

bifurcosa y neocestosa) que se encuentran en el agave y la proteína de transporte BG16BP, expresada en *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. En este estudio, se observó que la proteína BIG16BP puede coadyuvar en el transporte y captación de fructanos como son la 1-cestosa, la bifurcosa y la neocestosa, siendo esta un primer blanco biológico en el metabolismo de este tipo de polisacáridos.

De igual manera, la carboximetil celulosa, debido a su estructura similar a los fructanos, se estudió con el mismo método, para revisar si esta podía fungir como prebiótico, al interactuar con dicha proteína, resultando sus fuerzas de interacción menores (Vázquez-Hernández, *et al* 2019).

Por otra parte, se sabe que la arbutina (4-hidroxifenil- $\beta$ -D-glucopiranosido), ver **Figura 1**, es un glicósido de la p-hidroquinona, aislado por primera vez a partir de fuentes naturales e identificadas en 1881 por Schiff y Michael en 1982 (<biblio>). Este compuesto, se encuentra presente en las hojas y frutos de la pingüica, *Arctostaphy pungens* (Soito, 2003). Cuando es ingerida la arbutina, se absorbe en el tracto gastrointestinal y es hidrolizado por la flora intestinal para liberar el aglucón, hidroquinona (Rafiee, S., 2012). Sus ésteres de glucuronato y sulfato se excretan en la orina (Schindler et al, 2002, en Rafie Seyed 2012).



En el presente estudio, se pretende evaluar las interacciones de diversas moléculas con el transportador BG16BP, expresado en *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. Dichas moléculas o ligandos a evaluar, son: los fructanos estudiados previamente en nuestro grupo de investigación (1-cestosa, bifurcosa y neocestosa), así como carboximetilcelulosa y arbutina.

Lo anterior se pretende realizar para comparar la actividad prebiótica de la arbutina, comparada con moléculas previamente estudiadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ligandos fueron modelados y optimizados a nivel PM6 (Stewart, 2007) y utilizando el formalismo de la teoría de funcionales de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés), específicamente empleando el funcional meta GGA (PBE), formulado por Perdew, Burke y Ernzerhof (Perdew, Burke, & Ernzerhof, 1996), a través del paquete computacional (G09) Gaussian 09 (Frisch et al., 2009), el cual, se reporta en la literatura como un método apropiado para obtener ángulos, distancias de enlace, energías y propiedades electrónicas similares a las experimentales (Díaz-Cervantes, 2015). De igual manera, uno de los objetivos de este trabajo es elucidar un posible blanco biológico involucrado en la ruta metabólica de los ligandos seleccionados (CMC y fructanos), para lo cual y debido a la amplia gama de proteínas presentes en *B. animalis* subsp. *Lactis*, en este estudio debemos enfocarnos en una proteína en específico, la cuál debe ser caracterizada y corregida a través de los datos cristalográficos obtenidos del estado del arte. La proteína seleccionada fue la BIG16BP (Ejby et al., 2016), cuyos datos cristalográficos se descargaron de la base de datos Protein Data Bank (código PDB: 4ZZE), para poder realizar el modelado molecular correspondiente, a través de metodologías basadas en la fisicoquímica teórica-computacional, empleando los softwares que se mencionarán a continuación. Dicho modelado comenzó con las correcciones de solventes y pH a través del paquete computacional Chimera (UCSF, 2004). La interacción entre los prebióticos seleccionados, carboximetilcelulosa, arbutina y la

BIG16BP, se llevó a cabo con el software (MVD) Molegro Virtual Docker (Thomsen & Christensen, 2006) a través de la función de scoring MoldockScore (Yang & Chen, 2004). Finalmente, el análisis de interacciones no covalentes, entre los ligandos y proteína seleccionada, se llevó a cabo con el software MVD.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos una vez realizado el estudio computacional de las principales interacciones moleculares no covalentes entre BIG16BP y la arbutina, fructanos y CMC con la proteína son mostrados en la **Tabla 1**. En dicha tabla se puede observar que la arbutina es la molécula que presenta mejor interacción blanco-ligando, al obtener una eficiencia del ligando (LE) más negativa que las demás moléculas.

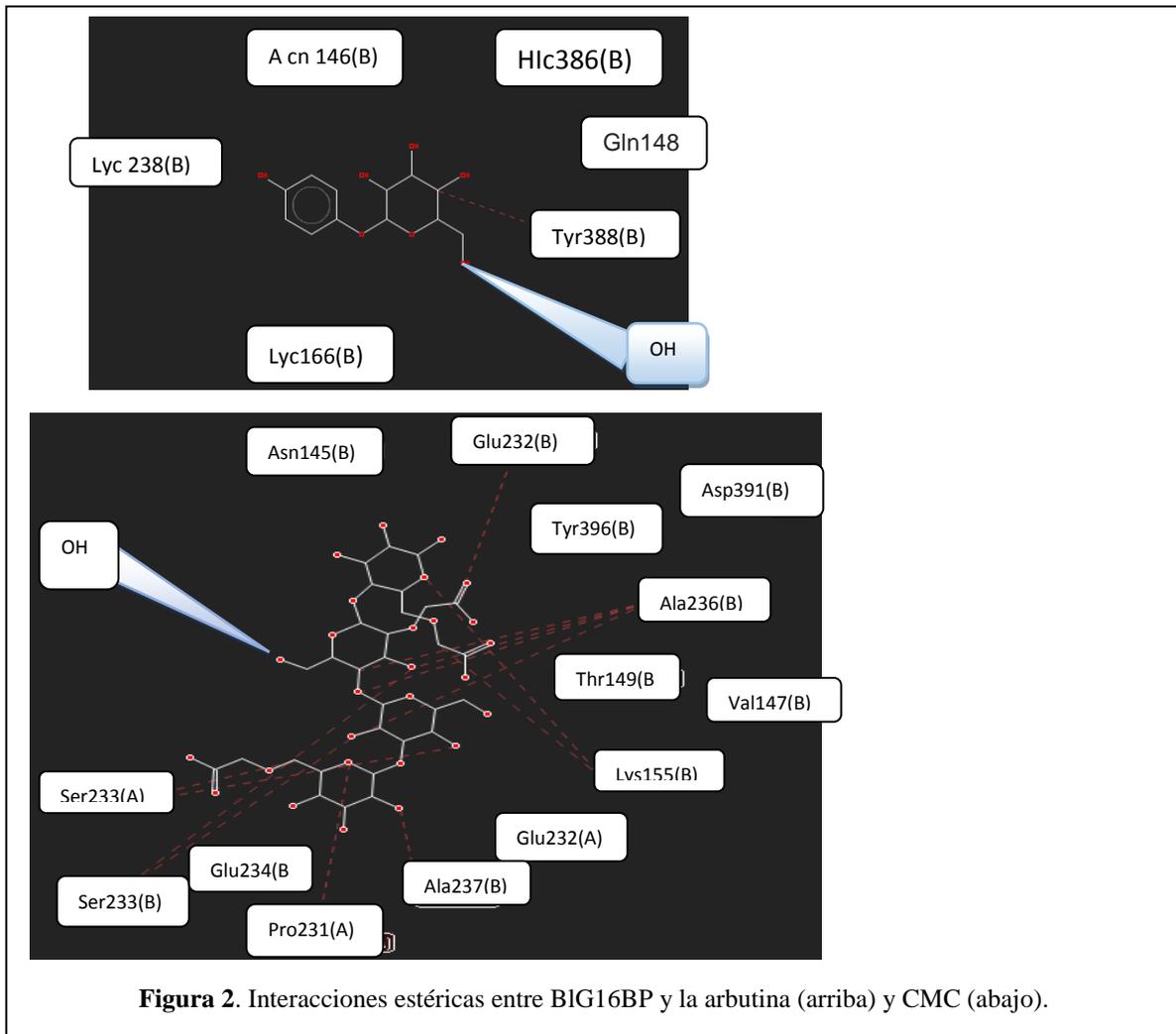
El acomodo de los ligandos con mejor interacción quedaría como sigue Arbutina > Neocestosa > 1-cestosa > Bifurcosa > CMC, notando nuevamente que la molécula con menor interacción es la CMC y en este caso los fructanos presentan la misma tendencia reportada en trabajo anteriores.

**Tabla 1.** Principales energías de interacción, en kcal/mol, entre BIG16BP y los ligandos estudiados

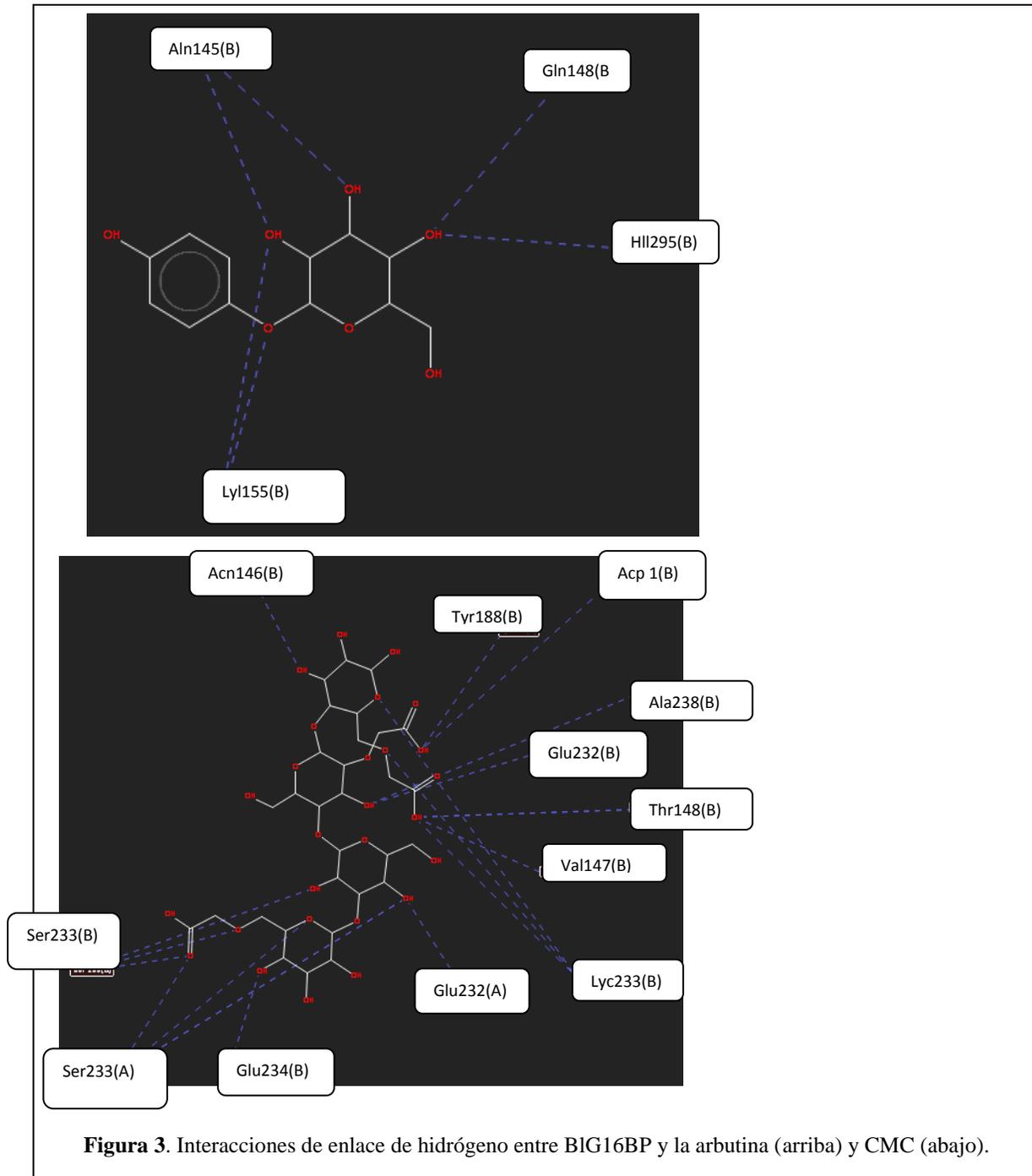
Molécula	E	LE	Hbond	VdW	Electrost
Neocestosa	-123.52	-3.63	-22.11	-37.93	3.86
Arbutina	-85.56	-4.50	-13.25	-28.35	-1.67
1-Cestosa	-99.69	-2.93	-15.08	5.19	-2.50
Bifurcosa	-117.98	-2.62	-17.56	-42.36	-0.45
CMC	-125.39	-2.20	-18.92	13.27	-0.86

E = Energía total de interacción ligando-receptor; LE= eficiencia del ligando; Hbond= Interacciones de enlaces de hidrógeno; VdW = Interacciones de Van der Waals y Electrost = Interacciones electrostáticas.

A partir de los resultados anteriores, podemos decir que la arbutina presenta una mejor interacción con el blanco seleccionado, significando que puede ser considerada como posible prebiótico, teniendo una mejor interacción incluso que los fructanos del agave (LE = -3.63, -2.93 y -2.62) y la CMC (LE = -2.20). Aparentemente, esto es debido a la presencia de interacciones electrostáticas atractivas y a la baja cantidad de interacciones estéricas, ver **Figura 2**.



La **Figura 2** nos muestra las interacciones estéricas blanco-ligando para la arbutina y la CMC, siendo clara la cantidad mayor de interacciones estéricas en esta última, comparada con las presentes en la arbutina (una interacción notoria y 5 muy bajas), lo cual nos da pauta a considerar que este tipo de interacciones son las culpables de favorable LE en el caso de la arbutina y un LE menos negativo en el caso de la CMC.



En forma contrastante con lo discutido anteriormente, es notorio que, aunque la CMC presenta una gran cantidad de enlaces de hidrógeno, ver **Figura 3**, no aportan la suficiente energía para contrastar la gran cantidad de interacciones estéricas presentes en la **Figura 2**.

Finalmente, analizando los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos decir que la arbutina puede proponerse como prebiótico, debido a que se une de una manera favorable a la proteína de transporte seleccionada y presente en *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, pudiendo dicha molécula

estar presente en las rutas metabólicas de la bacteria seleccionada, aportando diversos beneficios a la salud.

### BIBLIOGRAFÍA

- Cagigas, A., Anesto, J., (2002). Prebióticos y Probióticos , Una relación beneficiosa. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Revista Cubana Aliment Nutr* 2002;16(1):63-8.
- Díaz -Cervantes, E., Islas-Jácome, A., Rentería-Gómez, A., Robles, J., y Gámez-Montaño, R. (2015). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25, 1580.
- Ejby, M., Fredslund, F., Andersen, J. M., Žagar, A. V., Henriksen, J. R., Andersen, T. L., . Hachem, M. A. (2016). An ATP Binding Cassette Transporter Mediates the Uptake of  $\alpha$ -(1,6)-Linked Dietary Oligosaccharides in *Bifidobacterium* and Correlates with Competitive Growth on These Substrates. *J. Biol. Chem.*, 29(38), 20220-2023.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J.R., . . . Fox, D. J. (2009). *Gaussian 09 (Version C.01)*: Wallingford CT.
- Guarner, F., Sanders, M. E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A., Kim, N., De Paula, J. A., Ramakrishna, B., Shanahan F., Szajewska H., Thomson, A., Le M. A.,(2017). *Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. Organización Mundial de la Salud.*, 1, 4-8.
- Perdew, J. P., Burke, K., & Ernzerhof, M. (1996). *Phys. Rev. Lett.*, 77, 3865-3868.
- Rafiee, S. A.,(2012). Determinación de arbutina en las especies de *Ilex*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano.,5, 26-28.
- Soito, L.(2003). *Native Plants Class: Arctostaphylos pungens. Northern Arizona University.Bio414:20*
- Stewart, J. J. P. (2007). *J. Mol. Mod.*, 13, 1173-1213.
- Thomsen, R., & Christensen, M. (2006). *J. Med. Chem.*, 49, 3315-3321.
- Vázquez-Hernández, M. N., Abraham-Juárez, M.R., Ozuna-López C., Díaz-Cervantes, E. (2019). Importancia de BIG16BP en el transporte/absorción de fructanos en *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*: un estudio in silico.. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Guanajuato.*
- Yang, J., & Chen, C. (2004). *Proteins*, 55, 288-304.