

Elaboración de una pastilla analgésica a través de moléculas activas de *Heliopsis longipes* (Chilcuague)

E. García-García,¹ C. J. Cortés-García,² E. Díaz-Cervantes¹

¹Departamento de Alimentos, Centro Interdisciplinario del Noreste (CINUG), Universidad de Guanajuato, Guanajuato México. ²Departamento de Química, Facultad de Farmacia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. e.diaz@ugto.mx

RESUMEN: El Chilcuague (*Heliopsis longipes*) es una planta que crece en el norte de Guanajuato, se utiliza en la medicina tradicional como anestésico local, desparasitante, condimento de alimentos y fungicida. Entre los principales compuestos presentes en las raíces de esta planta, está la afinina, responsable de los efectos farmacológicos observados, entre los que se pueden considerar la acción de anestésico local, así como la actividad insecticida y bactericida. Por otra parte se sabe que los nutraceuticos son productos de origen natural con propiedades biológicas activas benéficas para la salud, que aportan de manera benéfica para la salud. Considerando lo anterior, se decidió realizar extractos de *Heliopsis longipes*, para elaborar un caramelo con efecto analgésico-local, auxiliar en el tratamiento de la faringitis. Para poder dar un soporte científico a lo anterior, se realizó un estudio computacional para determinar la interacción de las moléculas activas de *Heliopsis Longipes* con la proteína citocromo P450. Los resultados que se obtuvieron basados en la química teórica-computacional, mediante *Docking* molecular, mostraron que la apigenina presenta una eficiencia del ligando de -8.179 kcal/mol, siendo el mejor ligando estudiado. Finalmente, se obtuvieron tres diferentes formulaciones de pastillas, con una dosis mínima del activo.

Palabras clave: Afinina, *Docking molecular*, nutraceutico.

ABSTRACT: *Heliopsis longipes* is a plant which grows in the north of Guanajuato, it is used in folk medicine as a local anesthetic, deworming, food seasoning and fungicide. About the several compounds present in the roots of this plant, afinin is the main responsible for its observed pharmaceutical effects, responsible of the local anesthetic behavior. On the other hand, it is known that nutraceuticals are some products of natural origin with several health beneficial properties. However, extracts of *Heliopsis longipes* were obtained to make a caramel with an analgesic effect, auxiliary in the treatment of pharyngitis. Also, a computational study was also carried out to determine the interaction of the active molecules of *Heliopsis Longipes* with the cytochrome P450 protein used as a biological target. Moreover, the results obtained based on the theoretical and computational chemistry approaches, specifically using molecular *Docking*, shows an afinin with the best ligand efficiency, -8,179 kcal/mol, confirming the higher interactions for this ligand. Finally, have been obtained three different formulations for the caramel with a minimal doses of the active extract.

Palabras clave: Afinin, molecular *Docking*, nutraceutical.

Área: Nutrición y nutraceutico

INTRODUCCIÓN

El Chilcuague (*Heliopsis longipes*) es una planta que crece en el norte de Guanajuato, se utiliza en la medicina tradicional como anestésico local, desparasitante, condimento de alimentos y fungicida (González-Morales, Flores-López, Benavidez-Mendoza, & Flores-Olivas, 2011). Esta planta puede ejercer diversos efectos biológicos en bacterias, hongos, insectos y seres humanos, gracias a los compuestos bioactivos que posee, entre los que destacan los flavonoides. Estos últimos pertenecen a la familia de los polifenoles y pueden llegar a tener potentes beneficios para los seres humanos. Entre los principales compuestos presentes en las raíces de esta planta, está la afinina, principal responsable de sus principales efectos biológicos observados, entre los que se pueden considerar la acción de anestésico local, el estímulo organoléptico, así como la actividad insecticida y bactericida. Esta molécula, formada por un ácido graso de cadena alifática de 10 carbonos, contiene tres insaturaciones, el cual está unido a una isobutilamida (Hernández-Morales *et al.*, 2012).

Cabe destacar también que la afinina pertenece al grupo de las alcanidas olefinicas, siendo el compuesto mayoritario que presenta hasta el 90% del total de los metabolitos presentes en las raíces (Molina-Torres, Salazar-Cabrera, Armenta-Salinas, & Ramírez-Chávez, 2004). Una de las ventajas de obtener sustancias tales como la afinina, producidas por biosíntesis de plantas, es que no tiene efectos secundarios en el ecosistema, dado que puede ser metabolizada por uno u otro organismo a, diferencia de otras sustancias químicas aplicadas exógenas. *Heliopsis longipes*, también conocida como chilcuague, cuenta con diversas aplicaciones, así como una larga tradición herbolaria indígena. El género de *Heliopsis* incluye 14 especies, la mayoría endémicas de México y aun no todas totalmente definidas. Unas de ellas, *Heliopsis longipes*, utilizada en la medicina tradicional se ha caracterizado por el alto contenido de alcanidas en sus raíces. El estudio de tales metabolitos ha derivado en una serie de investigaciones sobre su presencia en otras representantes del género *Heliopsis* de México (Cilia-Lopez, Aguirre-Rivera, Reyes-Agüero, & Juárez-Flores, 2008).

En las regiones de Guanajuato y Querétaro se iniciaron plantíos de chilcuague de forma limitada en las orillas de las tierras de cultivo, aunque en la actualidad ya es posible observar plantíos dedicados a esta especie. En algunas investigaciones se han documentado los efectos de los extractos crudos obtenidos a partir de las raíces de *Heliopsis longipes*, gracias al descubrimiento de la afinina en las raíces de *Heliopsis longipes*, un compuesto insecticida, la cual despertó interés por su notoria actividad (Hernández-Morales *et al.*, 2012). El extracto obtenido a partir de otras plantas de la familia de *Heliopsis longipes* también ha presentado resultados favorables en el tratamiento de algunas micosis (pie de atleta) y de infecciones provocadas por virus, como el Herpes simple y herpes zoster, así como interacciones con el complejo proteico p450 (Molina-Torres *et al.*, 2004; Rodeiro *et al.*, 2009).

Para el presente trabajo de investigación se utilizó como blanco biológico al citocromo p450, descargado de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB), con el código 1W0E. Y la afinina presente en *Heliopsis longipes* fue seleccionada como ligando, además se seleccionaron algunas otras moléculas las cuales se obtuvieron a partir de las investigaciones realizadas por (Rodeiro, I., Donato, M. T., Jimenez, N., Garrido, G., Molina-Torres, J., Menendez, R., . . . Gómez-Lechón, M. J. 2009) estas moléculas presentaron alta eficiencia de ligando al interactuar con la proteína citocromo p450. De igual manera se plantearon nuevas propuestas de ligandos y blancos biológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se comenzó seleccionando como blanco biológico la proteína asociada a membrana del citocromo p450, descargada de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB), con el código 1W0E. Dicho blanco fue seleccionado debido a los reportes en la literatura que describen la interacción entre la afinina y dicha proteína. A la proteína que se seleccionó se les aplicaron correcciones de solventes y pH a través del paquete computacional Chimera (UCSF, 2004).

Se procedió a seleccionar 60 moléculas presentes en *Heliopsis Longipes*, *turnera difusa* y *jatropha dioica* para ser modeladas y considerados como ligandos al interactuar con las proteínas ya antes mencionadas. Los ligandos modelados fueron optimizados a nivel PM6 (Stewart, 2007), a través del paquete computacional (G09) Gaussian 09 (Frisch *et al.*, 2009). La interacción entre el citocromo p450, la proteínas 3fj6 y la afinina 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). Y finalmente, el análisis de interacciones no covalentes, entre los ligandos y proteína seleccionada, se llevaron a cabo con el software MVD. A partir del software MDV se procedió a realizar un escaneo de la proteína para detectar las posibles cavidades presentes en cada proteína, se comenzó realizando la calibración de la proteína, después se importaron los 60 ligandos seleccionados a la proteína para después proceder con un escaneo en toda la superficie de la proteína denominado docking ciego, mediante este escaneo se determina la pose de interacción entre el ligando y la proteína. Finalmente se realizó un Doking específico en cada una de las cavidades, observándose la interacción de los ligandos con el blanco seleccionado, con el fin de obtener las energías de interacción de cada ligando.

Después se procedió a realizar extractos de la raíz de *Heliopsis Longipes* para corroborar la presencia de la afinina. La planta fue recolectada en el municipio de Santa Catarina, después de haber sido

recolectada, secada y cortada, se procedió a preparar las muestras en tubos cónicos, cada una con 5g de raíz y con diferentes concentraciones de alcohol y agua: muestra 1(100% etanol), muestra 2 (75% etanol y 25% agua), muestra 3 (50% etanol y 50% agua), muestra 4 (25% etanol y 75% agua), muestra 5 (100% agua), para obtener sus principales compuestos activos, las muestras se dejaron en un ambiente seco y oscuro durante tres semanas. Posteriormente, se proceder a hacer un barrido en el rango Ultra violeta / Visible ($\lambda= 100-900\text{nm}$) en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin-Elmer Lambda Bio, obteniendo las gráficas de absorbancia vs longitud de onda, correspondientes a cada muestra. El espectro obtenido experimentalmente fue comparado con el espectro calculado a partir del formalismo de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés), considerando la dependencia del tiempo (TD-DFT) y a partir del método M06-2X/6-31+(d,p), utilizando el software Gaussian 09 (Frisch et al., 2009). Lo anterior se realizó para poder corroborar la presencia del ácido elágico en los extractos de sangregado, sin necesidad de purificar la muestra. Finalmente, a partir de los resultados obtenidos, se optó por elaborar un nutraceutico, utilizando como vehículo una pastilla de caramelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base a la metodología planteada se comenzó el análisis realizando un escaneo en toda la superficie de la proteína p450, denominado Docking ciego, ver Figura 1A. A su vez, en la misma figura se exponen las 5 cavidades de mayor volumen, ilustradas en color verde y los 60 ligandos modelados y presentes en *Heliopsis longipes*. Es claro que los 60 ligandos interactúan solamente en dos cavidades de la proteína, 59 de ellos quedaron dentro de la cavidad 1, que tiene el mayor volumen (598.53 \AA^3) y únicamente una interactuó con la cavidad 2 (583.68 \AA^3).

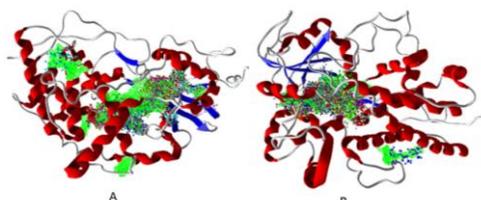


Figura 1. Docking ciego (A) y docking específico (B) de p450 con los ligandos presentes en *Heliopsis longipes*.

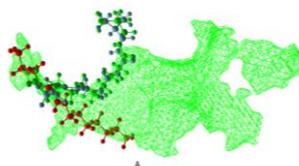


Figura 2. Cavidad 1 con los tres ligandos de mejor interacción (N-isobutyl-2E-decanamide, N-isobutyl-decanamide y afinina).

En la **Figura 2** se observan las poses de los tres ligandos con mayor eficiencia de ligando (N-isobutyl-2E-decanamide, N-isobutyl-decanamide y afinina). Se observa una variación en las poses de los ligandos, pero en la parte central de las tres moléculas hay una aparente similitud, debido a su posicionamiento final y más estable.

Tabla I. Principales energías de interacción blanco-ligando

Ligando	E-Total	HBond	Electro	VdW (LJ12-6)	LE1
(N-isobutyl-2E-decanamide	-115.615	-1.858	-0.942	-32.424	-7.226
N-isobutyl-decanamide	-120.868	-0.825	0.335	-36.855	-7.554
Afinina	-115.889	-32.424	-1.183	-30.400	-8.179

La **Tabla 1**, nos muestra que el ejemplo 1 (N-isobutyl-2E-decanamide) obtuvo una energía debida a los enlaces de hidrogeno de -1.86 kcal/mol y una eficiencia del ligando de -7.226 kcal/mol. El ejemplo 2 (N-isobutyl-decanamide) obtuvo -0.825 kcal/mol en las interacciones debidas a enlaces de hidrogeno y una eficiencia del ligando de -7.554 kcal/mol.

Finalmente, la afinina obtuvo -2.004 kcal/mol debida a interacciones de enlaces de hidrogeno y una eficiencia del ligando de -8.179 kcal/mol, siendo esta la más alta.



Figura 3. Interacciones, estéricas, electrostáticas y enlaces de hidrogeno de la proteína citocromo y el ligando afinina.

En la **figura 3** se presentan las interacciones del ligando afinina con la proteína citocromo P450. En las interacciones de enlaces de hidrogeno **fig. 3A** se presenta al grupo amino interactuar únicamente con el residuo Arg 82. En las interacciones electrostáticas **fig. 3B** de atracción se presenta al oxígeno carbonilo con residuos como Lle 96 y Arg 82. En el grupo amino se presenta una interacción de atracción con Arg 81 y de repulsión con Arg 82. En las interacciones estéricas **fig. 3C** se presentan entre un alqueno y el residuo Phe 84, de igual manera se presenta en el grupo amino, pero con menor fuerza de atracción y repulsión al residuo Arg 82.

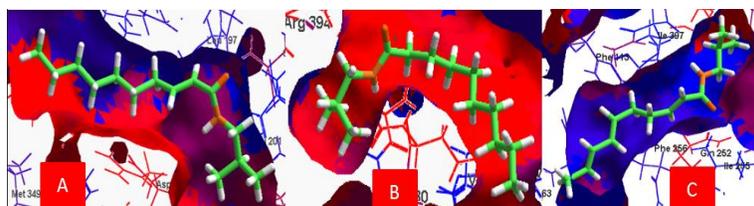


Figura 4. Hidrofobisidad de N-isobutyl-2E-decanamide, N-isobutyl-decanamide y afinina.

En la **figura 4**. Se observan las interacciones de hidrofobicidad de la proteína Citocromo P540 con los ligandos (N-isobutyl-2E-decanamide, N-isobutyl-decanamide y afinina). El color azul representa la superficie hidrofóbica y el rojo superficie hidrofílicas, y el color morado es intermedio, En el caso del ligando afinina **fig. 4C** podemos ver que la mayor parte de la estructura de la molécula se concentra en

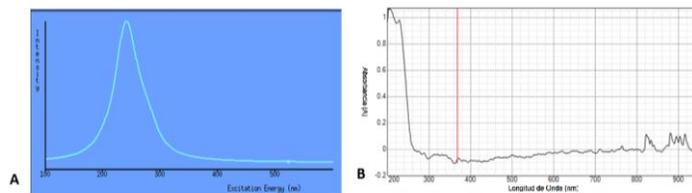


Figura 5. Espectro de absorbancia en el rango UV/Vis de extractos de Chilcuague A) teórico B) experimental.

una parte que es hidrofóbica lo que nos indica que este ligando es repelente al agua y para poder hacer una disolución se necesita otro tipo de solvente.

Así mismo se con base a la metodología planteada se realizaron extractos de la chilcuague para la determinación de la molécula (afinina), recolectada en el Noreste de Guanajuato, al analizar los espectros obtenidos, se comparó el espectro teórico de la afinina, ver **figura 5A**, con el experimental, observando picos de absorbancia similares, corroborando la existencia de afinina en el extracto crudo de *Heliopsis longipes*.

Se obtuvieron tres diferentes formulaciones para elaborar las pastillas analgésicas, como se muestra en la **figura 6**. Para dichas formulaciones se implementaron diferentes cantidades de ingredientes, la **figura 6A**, formulación 1, obtuvo un caramelo duro de una apariencia diferente a lo convencional debido al color es muy oscuro y en cuanto al sabor se percibe un sabor muy acaramelado; en la formulación 2 **figura 6B** obtuvo un caramelo opaco con una textura granulada que resulta tener una consistencia rugosa, sin embargo, el sabor es agradable. La formulación 3 **figura 6C** muestra un caramelo de apariencia agradable, debido a que es más traslucido y tiene una consistencia y textura sólida; este último obtuvo un sabor agradable debido a que tiene un sabor menos dulce.

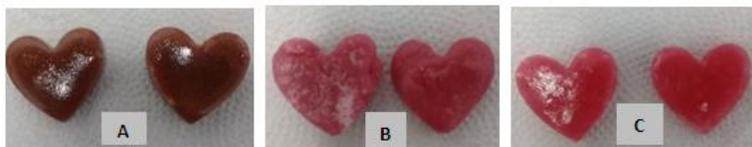


Figura 6. Formulación 1A, 2A, Y 3A, de las pastillas analgésicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. R. (2012). (Maqui (*Aristotelia chilensis*): a Chilean nutraceutical of medicinal relevance). *Sociedad de Farmacología de Chile*, 6.
- Cilia-Lopez, V. G., Aguirre-Rivera, J. R., Reyes-Agüero, J. A., & Juárez-Flores, B. I. (2008). Etnobotánica de *Heliopsis longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Bol. Soc. Bot. Méx.*, 83, 1-8.
- De Valle Prieto M.B. 2018. Desarrollo de un nutraceutico de aceite de oliva virgen extra enriquecida en luteína y zeaxantina. Validacion "in vitro e in vivo" de sus propiedades bioactivas. Universidad de Extramadura.
- 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.
- González-Morales, S., Flores-López, M. L., Benavidez-Mendoza, A., & Flores-Olivas, A. (2011). Actividad Inhibitoria del Extracto de *Heliopsis longipes* Sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 29, 146-153.
- Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J. L., Luna, B. E. G. m.-, Ramírez-Chávez, E., Abraham-Juárez, M. R., Soto, G. M. n.-, & Molina-Torres, J. (2012). DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD

- INSECTICIDA DE *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, UNA PLANTA ENDÉMICA DEL ESTADO DE GUANAJUATO. *Ra Ximhai*, 8, 111-118.
- Molina-Torres, J., Salazar-Cabrera, C. J., Armenta-Salinas, C., & Ramírez-Chávez, E. (2004). Fungistatic and Bacteriostatic Activities of Alkamides from *Heliopsis longipes* Roots: Affinin and Reduced Amides. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4700-4704.
- Ozuna, C., Cerón García, A., Gómez Salazar, J. A., & Salazar Solís, E. (2016). Potencial de productos alimenticios originarios de la zona noreste de Guanajuato. *Acta Universitaria*, 11.
- Rodeiro, I., Donato, M. T., Jimenez, N., Garrido, G., Molina-Torres, J., Menendez, R., . . . Gómez-Lechón, M. J. (2009). Inhibition of Human P450 Enzymes by Natural Extracts Used in Traditional Medicine. *Phytother. Res.*, 23, 279-282.
- Stewart, J. J. P. (2007). *J. Mol. Mod.*, 13, 1173-1213.
- Thomsen, R., & Christensen, M. (2006). *J. Med. Chem.*, 49, 3315-3321.
- Yang, J., & Chen, C. (2004). *Proteins*, 55, 288-304.