

Diseño de un nutraceutico antihipertensivo, a través de moléculas activas de *Turnera diffusa*

R. Reséndiz-Casas¹, C. Ozuna-López², M. R. Abraham-Juárez², E. Díaz-Cervantes^{1*}

1 Departamento de Alimentos, Centro Interdisciplinario del Noreste (CINUG), Universidad de Guanajuato, 37975 Tierra Blanca, Guanajuato, México. **2** Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Irapuato, México. e.diaz@ugto.mx

RESUMEN: La *Turnera diffusa* es una planta conocida comúnmente como Damiana, tiene una amplia aplicación a la medicina tradicional debido a sus múltiples efectos como: afrodisiaco, hipertensión, reumatismo, diabetes, entre otras, debidos a moléculas activas como la Apigenina. Por otra parte, los nutraceuticos son sustancias biológicas activas, extraídas de fuentes naturales. A partir de lo anterior, se pretende elaborar un producto alimenticio, gomitas, que presenten un efecto terapéutico contra la hipertensión, debido a que es una golosina muy consumida y fácil de desplazar a cualquier lugar, así mismo tiene una vida de anaquel relativamente amplia. En el presente estudio, se realizaron extractos de la Damiana, tanto de hoja como de tallo para determinar la presencia de Apigenina, dicha planta fue obtenida en el Noreste de Guanajuato. A la par y a partir de metodologías basadas en la química teórica y computacional, específicamente el *Docking* molecular, obtuvimos que la molécula que mejor se acopla con una proteína involucrada en patologías del sistema circulatorio, endotelina B, fue el Anetol (metabolito presente en la Damiana), con una eficiencia del ligando de -7.630 Kcal/mol, mientras que la Apigenina no presento un acoplamiento tan eficiente, mostrando una eficiencia del ligando de -5.439 Kcal/mol. A partir de lo anterior, se concluyó que la proteína seleccionada prefiere acoplarse con ligandos de tamaño pequeño, al mismo tiempo que se corroboró la existencia de Apigenina en el extracto realizado a la planta, pudiendo así tener una base sólida para elaborar un nutraceutico antihipertensivo.

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

ABSTRACT: *Turnera diffusa* is a plant commonly known as Damiana, it has a wide application to traditional medicine due its multiple effects such as: aphrodisiac, hypertension, rheumatism, diabetes, among others, due to active molecules such as Apigenin. On the other hand, nutraceuticals are biological substances extracted from natural sources. Considering above, it is intended to produce a food product such as gummies, which presents a therapeutic effect against hypertension, which because it is a very consumed and easy to transport to any place food, it also has a relatively broad shelf life. In the present study, extracts of Damiana has been made, both leaf and stem to determine the presence of Apigenina, note that this plant was obtained in the Northeast of Guanajuato. At the same time and from methodologies based on theoretical and computational chemistry such as molecular Docking, we obtained that the molecule with the best matches with the protein involved in pathologies of the circulatory system, endothelin B, was Anethole (metabolite present in Damiana), with a ligand efficiency of -7,630 Kcal/mol, while Apigenin did not present such an efficient coupling, showing a ligand efficiency of -5,439 Kcal/mol. From the above, it was concluded that the selected protein prefers to be coupled with ligands of small size, at the same time that the existence of Apigenin was corroborated in the plant extracts, having with this a solid knowledge to perform an antihypertension nutraceutical.

Keywords: Apigenin, molecular Docking, nutraceutical.

Área: Nutrición y nutraceutico

INTRODUCCIÓN

Los productos de confitería entre los que se encuentran las gomitas están elaborados por azúcares, principalmente de sacarosa. La elaboración tradicional de gomitas incluye sacarosa, jarabe de glucosa, agente gelificante, junto con ácidos, aromas y colorantes (Irma Aranda-González *et al.*, 2015).

Por otra parte, los nutraceuticos son sustancias biológicas extraídas de fuentes naturales. La clasificación a nivel internacional de nutraceuticos comprende tres categorías principales: nutrientes,

herbales y suplementos de la dieta, cabe mencionar que los nutraceuticos herbales son productos procesados en forma de concentrados o extractos (Sara Rojas Jiménez *et al.*, 2015).

Para el presente trabajo, es importante mencionar que la *Turnera diffusa* es un pequeño arbusto silvestre, conocido por su nombre común, Damiana. Se encuentra en climas cálidos y tropicales, principalmente en ciertas partes de América y África. La *Turnera diffusa* tiene una amplia aplicación a la medicina tradicional debido a sus múltiples efectos como: estimulante, afrodisiaco, auxiliar en dolores estomacales, enfermedades relacionadas al abuso del tabaco, infecciones, hipertensión, reumatismo, diabetes, entre otras (Estrada-Reyes, Ortiz-López, Gutiérrez-Ortiza, & Martínez-Mota, 2009; Szewczyk & Zidorn, 2014).

Las hojas secas y los extractos de la *Turnera diffusa* son muy aromáticos debido a los aceites esenciales que contienen (Alcaraz-Melendez, *et al.*, 2007). Sin embargo sus efectos medicinales dependen de las condiciones ambientales con las cuales ha crecido la planta (Urbizu-González, Castillo-Ruiz, Martínez-Ávila, & Torres-Castillo, 2017), es por ello que dicha planta es usada para enfermedades específicas en cada lugar en el cual crece (Szewczyk & Zidorn, 2014).

Hay reportes en la literatura, en los cuales se detectó que, ciertos principios activos como el flavonoide apigenina, presente en la *Turnera diffusa*, tienen actividad ansiolítica; dicho compuesto ha sido obtenido a partir del extracto metanólico de *Turnera diffusa* y se ha probado en modelo murino, en una dosis de 2mg/kg (Szewczyk & Zidorn, 2014). Otros reportes, demuestran que los flavonoides de la *Turnera diffusa*, tomados de manera oral, funcionan como antiinflamatorios (Peters *et al.*, 1996), promoviendo también la vasodilatación (Estrada-Reyes *et al.*, 2009).

Considerando como punto clave la hipertensión, que implica el proceso de vasoconstricción-vasodilatación, se sabe que el receptor de endotelina tipo B está relacionado en dichas enfermedades del sistema circulatorio (Shihoya *et al.*, 2017). Siendo la hipertensión la enfermedad que se pretende combatir a través de un producto alimenticio que funja como nutraceutico, es importante también destacar que es una enfermedad frecuente en la población mundial y que se presenta principalmente en personas mayores de 20 años (Margarita Fernández López, 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

Etapa *in silico*

Considerando la amplia gama de plantas medicinales encontradas en el Noreste de Guanajuato, se seleccionó la *Turnera diffusa*, debido a su abundancia y extendida utilización en medicina tradicional.

De igual manera, se seleccionó como blanco biológico el receptor de endotelina tipo B, por estar implicado en enfermedades del sistema circulatorio, así como 55 moléculas presentes en la *Turnera diffusa*, para ser considerados como ligandos. 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 blanco biológico seleccionado y los ligando modelados, 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, se realizó el análisis de interacciones no covalentes, entre los ligandos y proteína seleccionada, se llevaron a cabo con el software MVD.

Caracterización espectroscópica

Por otra parte, se realizaron extractos de la *Turnera diffusa* tanto de tallo como de hojas, para determinar la presencia de Apigenina, esto a través de un espectrofotómetro UV/Vis Jenway 7305, realizando un barrido general de 100 a 900 nm para identificar los componentes de los extractos de *Turnera diffusa*. El espectro obtenido se comparó con el calculado a partir de la Teoría de Funcionales de la Densidad dependiente del tiempo (TD-DFT), con el método M06-2x/6-31G(d,p), empleando el paquete computacional G09.

Formulación del nutracéutico

Una vez habiendo caracterizado las interacciones blanco-ligando, deliberando cuales son los principales principios activos que pueden interactuar con la endotelina tipo B y desencadenan un efecto terapéutico relacionado con enfermedades del sistema circulatorio, la siguiente etapa es la elaboración de un nutracéutico, utilizando como vehículo gomitas.

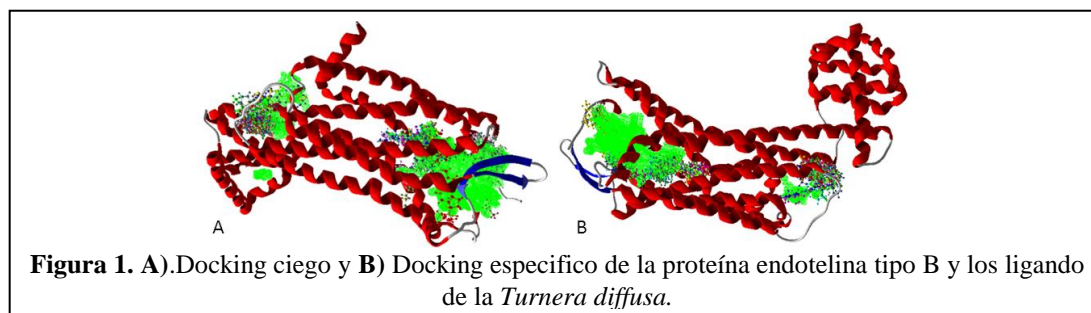
Dichas gomitas fueron formuladas de la siguiente manera: en la formulación 1 se agregó una cantidad determinada de azúcar, gretina y agua, para la segunda formulación se aumentó la cantidad de azúcar y gretina, para obtener una consistencia más dura, mientras que para la tercera formulación se conservó la inicial solo agregando chamoy.

Cabe destacar, que debido a la falta de patrón de referencia de apigenina, el cual está en proceso de síntesis por algunos de nuestros colaboradores, consideramos una dosis mínima para la formulación (1mL de extracto por cada 100g de producto), para saber las propiedades organolépticas que pudiera conferir dicho extracto.

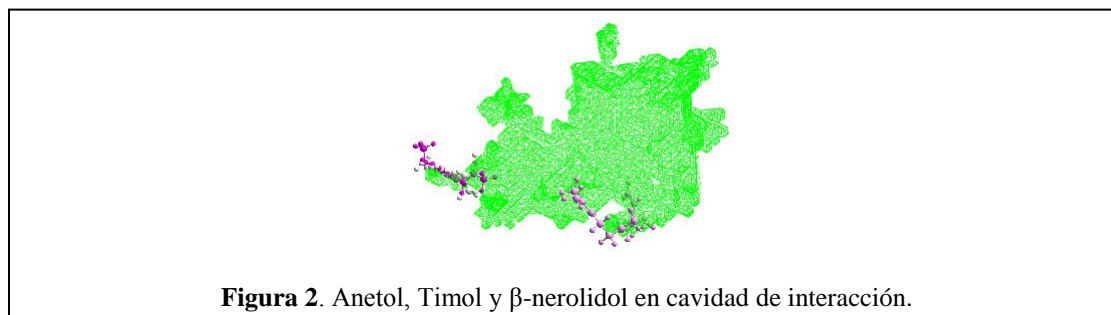
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa *in silico*. Con base a la metodología propuesta se modelaron y optimizaron las 55 moléculas presentes en la *Turnera diffusa*, las cuales fueron tomadas como ligandos; así mismo se preparó la endotelina B, por estar implicada en problemas de hipertensión.

Se procedió a realizar un escaneo en toda la superficie de la proteína seleccionada, denominado *Docking* ciego, ver **Figura 1A**. A su vez, en la misma figura se muestran las cavidades de mayor volumen, ilustradas en color verde y los ligandos modelados y presentes en *Turnera diffusa*.



Los ligandos Anetol, timol y β -nerolidol interactuaron dentro de la cavidad más grande (130.15 \AA^3), **Figura 2**, siendo estos los tres ligandos que obtuvieron mayor energía entre los ligandos que se pusieron a interactuar con la proteína, sin embargo, la interacción de los dos ligandos (Anetol, timol), se dio en una misma pequeña fracción de la cavidad debido a que poseen una estructura similar, mientras que el ligando β -nerolidol interactuó en la misma cavidad pero en diferente fracción.

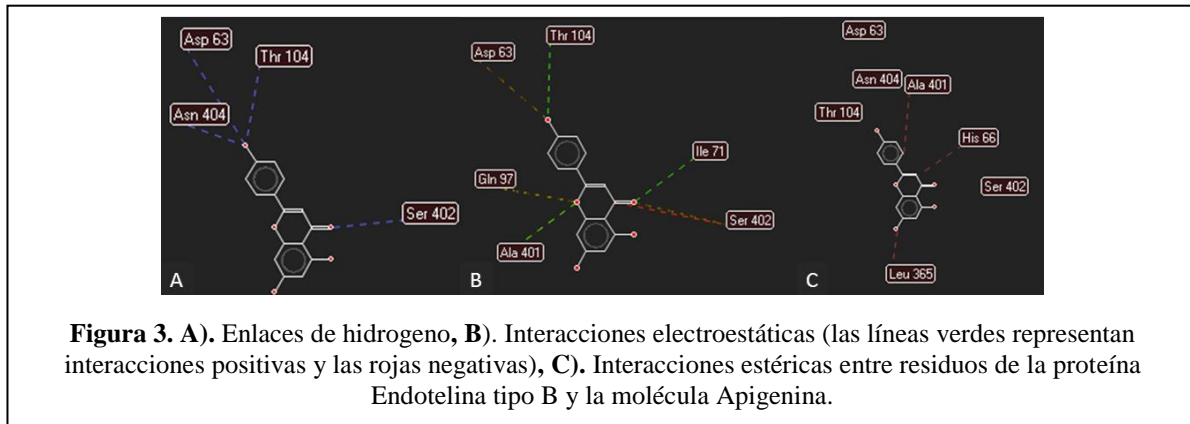


Por otra parte, al analizar las energías de interacciones de los ligandos, se observó que el ligando Anetol obtuvo una mayor eficiencia del ligando (-7.630 kcal/mol), siendo esta una de las moléculas más pequeñas, mientras que las moléculas más grandes como el sitosterol3-O-β-D-glucósido obtuvieron una eficiencia de ligando de -2.800 kcal/mol.

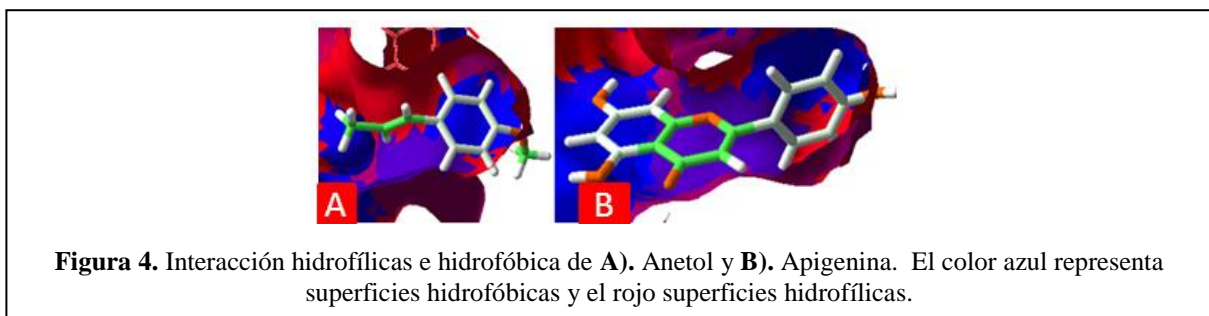
Finalmente, en la **Tabla I**, tenemos los mejores tres ligando y al igual que la apigenina, pudiendo observar que Anetol tiene una mayor eficiencia de ligando (-7.63 kcal/mol), mientras que el Timol presenta menor eficiencia (-6.44 kcal/mol), sin embargo la apigenina solo obtuvo una eficiencia de ligando de (-5.49kcal/mol), lo que quiere decir que presentó un menor acoplamiento dentro del sitio activo, debido a la menor interacción de enlaces de hidrogeno.

LIGANDO	EL1	HBond	Electro	E-Total	VdW (LJ12-6)
Anetol	-7.630	-0.753	4.274	-83.929	-25.808
β-nerolidol	-6.854	-1.593	1.228	-109.663	-28.184
Timol	-6.444	-2.500	0.515	-70.879	-25.781
Apigenina	-5.439	-2.948	-2.960	-108.779	-38.873

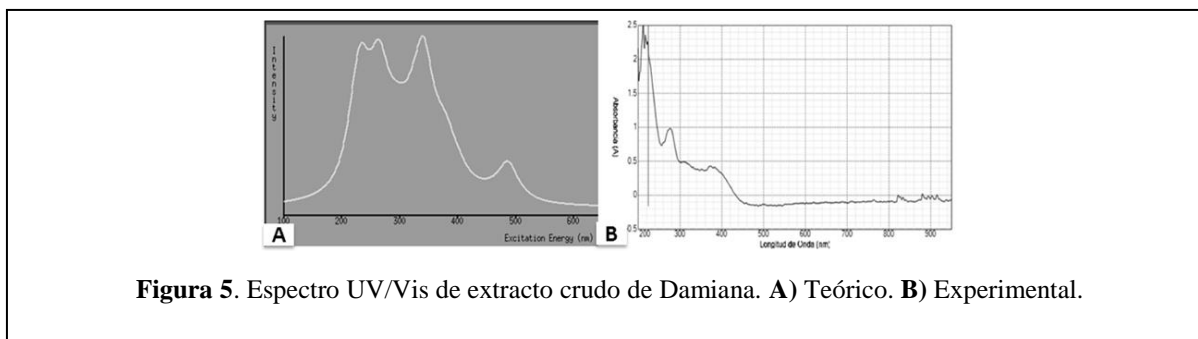
En la **figura 3** se muestran las interacciones de la Apigenina, siendo la molécula seleccionada para tener un buen acoplamiento con la proteína endotelina B, sin embargo, presenta bastantes interacciones estéricas y electrostáticas de repulsión lo cual impide una buena interacción con el sitio activo de la proteína.



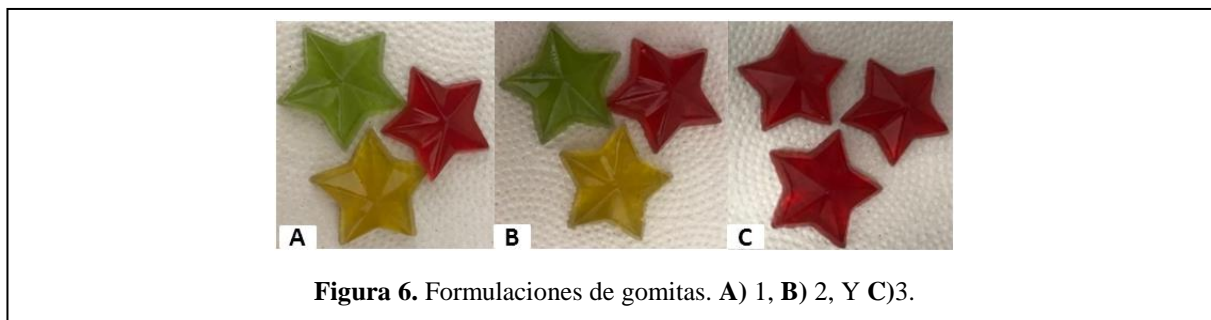
Como se aprecia en la **figura 4**, se muestran las interacciones de las dos moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, como se observan en las estructuras de los ligandos, su color verde representa zonas hidrofóbicas, el color naranja son hidrofílicas mientras que el color blanco son neutras. Los dos ligando interactuaron en una misma cavidad, como se observa interactúan tanto con zonas hidrofílicas como con zonas hidrofóbicas, esto nos indica que son moléculas que pueden ser disueltas ya sea con agua o aceite.



Caracterización espectroscópica. Con base a la metodología se realizaron extractos de la *Turnera diffusa* recolectada en el Noreste de Guanajuato, al analizar los espectros obtenidos, se comparó el espectro teórico de la Apigenina, ver **figura 5A**, con el experimental, observando picos de absorbancia similares, corroborando la existencia de Apigenina en el extracto crudo de Damiana.



Formulación del nutraceutico. Se obtubieron tres distintas formulaciones de gomitas con diferentes proporciones de los ingredientes seleccionados, presentando características organolepticas distintas, debido a que la formulacion 2, con respecto a la formulacion 1 es mas dulce, debido a la cantidad de azúcar entre una y otra; de igual manera presentan una diferencia de texturas, siendo una más suave que la otra, debido a las cantidades distintas de grenetina adicionada. La formulacion 3 presenta un sabor diferente a las anteriores, más ácido, debido a la precencia de chamoy.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcaraz-Melendez, L., S. Real-Cosio, V. Suchý y E. Svajdlenka. 2007. Differences in essential oil production and leaf structure in phenotypes of damiana (*Turnera diffusa* Willd.). *J Plant Biol.* 50:378-382.
- Aranda-González, I., Tamayo-Dzul, Óscar., Barbosa-Martín, Enrique., Segura-Campos, Maira., Moguel-Ordoñez, Yolanda. Y Betancur-Ancona, David. Desarrollo de una golosina tipo “gomita” reducida en calorías mediante la sustitución de azúcares con *Stevia rebaudiana* B. *Nutr Hosp.* 2015; 31(1):334-340
- Estrada-Reyes, R., Ortiz-López, P., Gutiérrez-Ortiza, J., & Martínez-Mota, L. (2009). *Turnera diffusa* Wild (Turneraceae) recovers sexual behavior in sexually exhausted males. *J. Ethnopharmacol.*, 123, 423-429.
- Flores N. (2013). Endotelina-1: vasoconstrictor intrínseco del endotelio vascular. *Med*, 21 (2): 64-78.
- Peters, N. K., Frost, J. W., & Long, S. R. (1996). A plant flavone luteolin induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 273, 977-980.
- Rojas S, Lopera JS, Uribe A, Correa S, Perilla N, Marín JS. Consumo de nutraceuticos, una alternativa en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. *Revista Biosalud* 2015; 14(2): 91-103. DOI: 10.17151/biosa.2015.14.2.9
- Shihoya, W., Nishizawa, T., Yamashita, K., Inoue, A., Hirata, K., Kadji, F. M. N., . . . Nureki, O. (2017). X-ray structures of endothelin ETB receptor bound to clinical antagonist bosentan and its analog. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 24, 758-764.
- Szewczyk, K., & Zidorn, C. (2014). Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana—*Turnera diffusa*. *J. Ethnopharmacol.*, 152, 424-443.

- Urbizu-González, A. L., Castillo-Ruiz, O., Martínez-Ávila, G. C. G., & Torres-Castillo, J. A. (2017). Natural variability of essential oil and antioxidants in the medicinal plant *Turnera diffusa*. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, *10*, 121-125.
- Yang, J., & Chen, C. (2004). *Proteins*, *55*, 288-304.