



**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**Simulaciones de dinámica molecular en metabolitos secundarios presentes en *Punica granatum L.* con propiedades inhibitorias contra SARS-CoV-2**

**INFORME FINAL DE TESIS**

**Presentado por:**

**Amanda Damaris Hernández Tzorín**

**Estudiante de la carrera de Química**

**Guatemala, mayo de 2022**



**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**Simulaciones de dinámica molecular en metabolitos secundarios presentes en *Punica granatum L.* con propiedades inhibitorias contra SARS-CoV-2**

**INFORME FINAL DE TESIS**

**Presentado por:**

**Amanda Damaris Hernández Tzorín**

**Estudiante de la carrera de Química**

**Guatemala, mayo de 2022**

**JUNTA DIRECTIVA**

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria Académica
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Carmen Amalia Rodríguez Ortiz .	Vocal IV
Br. Paola Margarita Gaitán Valladares	Vocal V

## DEDICATORIA

A mi mamá,  
por su esfuerzo, lucha y amor incondicional. Por apoyarme a soñar alto y a enseñarme que si lucho por ellos, estos pueden ser una realidad. Gracias por ser mi ejemplo de fuerza, perseverancia, integridad y fortaleza. La amo con todo mi corazón.

A mis hermanas, Cindy, Karla y Fernanda; y a mi papá,  
por su paciencia y por siempre estar conmigo, a pesar de la distancia. Y porque indirectamente han hecho de mi una mejor persona y de alguna u otra forma siempre me han acompañado en mis sueños y metas. Los amo infinitamente.

A Javier y Fernanda,  
por todo su apoyo en todas mis metas, por inspirarme siempre a seguir adelante y luchar por mis sueños. Gracias por su paciencia, amor, compañía y siempre escucharme. Los amo mucho y los admiro, son una parte muy importante de mi.

A Pablo y Karen,  
Por ser unos grandes amigos. Pablito, que más que mi primo ha sido mi hermano y mi ángel guardián. Y Karen, con quien he vivido y aprendido tanto de la vida. Gracias por ser parte de mi, los amo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,

Por ser mi *alma mater*, por permitirme crecer y desarrollarme como profesional y científica.

Y por brindarme conocimiento, cuyo gran valor no puede ser medido.

A mis tutores, Javier Vallejo y Rony Letona,

Por compartir sus conocimientos e instruirme en la química computacional. Gracias por motivarme y a enseñarme a desarrollar nuevas formas de pensamiento.

A Charlie Torres y Gabriela Ponce,

Por tomarme en cuenta para ser parte de su grupo de investigación, lo cual fue pieza clave para el desarrollo de este proyecto. Gracias por todo su apoyo.

A la Unidad de Química Computacional

Por brindarme herramientas que fueron una pieza importante para el desarrollo de mi tesis.

A mi asesor, mis revisores y mis demás catedráticos,

Gracias por inspirarme, ser muchas veces mi ejemplo y alentarme siempre a seguir adelante. No hay regalo más grande para un ser humano que la educación.

A todos mis amigos de promoción y de universidad,

Gracias por los momentos de alegría en los laboratorios, en las clases y por siempre apoyarnos a pesar del estrés y los malos días. Y a mis demás amigos que conocí a lo largo de la carrera, en especial a Julissa y Anajansy. Atesoro cada momento vivido.

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>11</b>
	A. Coronavirus 2 (SARS-Cov-2)	11
	B. Tratamiento del coronavirus (COVID-19)	13
	1. Tratamientos iniciales	13
	2. Vacunas para la prevención del COVID-19	14
	3. Retos a considerar en las vacunas actuales	15
	C. Plantas Medicinales: una luz para el tratamiento del coronavirus	16
	1. Inhibidores de entrada viral	17
	2. Inhibidores de la replicación viral	18
	3. Plantas Medicinales de Guatemala con actividad inhibitoria	19
	4. Estudios sobre actividad inhibitoria de Punica granatum L.	19
	D. Estudios in silico sobre metabolitos secundarios con potencial inhibitorio contra SARS-CoV-2	20
	1. Estudios en países asiáticos	21
	2. Estudios en países americanos	22
	E. Predicciones in silico ADME/Tox	23
	1. Toxicidad	24
	2. ADME	24
	F. Simulaciones en Química Computacional	25
	1. Dinámica Molecular	25
<b>III.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
	A. Objetivo general:	29
	B. Objetivos específicos:	29
<b>V.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>VI.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
	A. Enfoque de investigación	31

B. Tipo de investigación	31
C. Universo	31
1. Población:	31
2. Muestra:	31
D. Materiales	35
1. Hardware:	35
2. Software:	35
E. Métodos:	36
1. Obtención de las enzimas y preparación de los ligandos	36
2. Interacción molecular con el sitio activo:	36
3. Realización de Docking:	37
4. Estudio ADME Tox:	37
5. Dinámica Molecular:	38
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>X. RECOMENDACIONES</b>	<b>66</b>
<b>XI. REFERENCIAS</b>	<b>67</b>
<b>XII. ANEXOS</b>	<b>77</b>

## I. RESUMEN

En diciembre de 2019 se tuvo el conocimiento de un nuevo coronavirus, denominado síndrome respiratorio agudo severo del coronavirus 2 (SARS-CoV-2), causante de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). Esta enfermedad se convirtió rápidamente en una pandemia, y se empezaron a realizar muchas investigaciones enfocadas en el tratamiento y prevención de dicha afección. Fueron desarrolladas diferentes tipos de vacunas contra el virus del SARS-CoV-2, y varios países empezaron a realizar programas de vacunación urgente. A pesar de la existencia de vacunas, la optimización de las mismas, así como la investigación y el desarrollo de nuevas alternativas farmacológicas, sigue siendo de vital importancia para el tratamiento de esta enfermedad. Considerando que esta continúa y continuará evolucionando a lo largo del tiempo.

Se ha demostrado que la utilización de plantas medicinales es una buena alternativa para el tratamiento de enfermedades virales (Angamuthu, et al., 2019; Arunkumar y Rajarajan, 2018). Y existen varios estudios que evalúan la actividad antiviral de metabolitos secundarios de plantas utilizando métodos *in silico* sobre diferentes enzimas del virus SARS-CoV-2 (Bouchentouf y Noureddine, 2020). Por ello, en la presente investigación se evaluó el potencial de inhibición de 44 metabolitos secundarios presentes en *Punica Granatum L.*, frente a dos enzimas principales del SARS-CoV-2 (7BTF y 6LU7) y una enzima control, esto por medio de simulaciones de acoplamiento molecular. De ello se obtuvieron excelentes resultados, en donde 34 metabolitos tienen una energía de acoplamiento molecular menor a -7 KJ/mol, y de ellos, 6 poseen una energía menor a -10 KCal/mol con la enzima 7BTF.

A todos los metabolitos se les realizó un estudio de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME/Tox) con la finalidad de evaluar si son seguros para el consumo humano. Por medio de la predicción de descriptores físicos significativos y propiedades farmacéuticas relevantes. En donde la mayoría de los metabolitos presentan

buenos resultados ADME y son considerados como no tóxicos. De ello, se lograron clasificar tres candidatos que poseen los mejores resultados para ADME/Tox y acoplamiento molecular, y a ellos se les realizaron simulaciones de dinámica molecular. Para ello se calculó la desviación cuadrática media (RMSD) entre la proteína-ligando, la función de distribución radial (FDR) entre el complejo-agua y proteína-ligando; y el número de enlaces de hidrógeno entre la proteína-ligando. Esto con la finalidad de evaluar la estabilidad y cambios de conformación en los complejos. Finalmente se obtuvo que la molécula que presentó mejores resultados de estabilidad, e inhibición segura contra el SARS-CoV-2, fue Punicacortein D, en complejo con la proteína 7BTF.

## II. INTRODUCCIÓN

Un nuevo coronavirus, denominado formalmente como coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) ha causado la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) en todo el mundo, y es la última pandemia de la serie de otras enfermedades infecciosas (Muralidharan, et al., 2020). Esta ha tenido no solamente un impacto grave en la salud a nivel mundial, sino también en la economía y en la calidad de vida de las personas. Actualmente, a pesar de la existencia de vacunas para el tratamiento del virus, las investigaciones sobre nuevos tratamientos siguen siendo importantes para la resolución de este problema.

Guatemala al ser un país en vías de desarrollo ha sido fuertemente golpeado por dicha pandemia, hasta el 5 de julio de 2021 se tenían registrados 307785 casos y de los cuales se espera que estos sigan en aumento. Por otro lado, debido al porcentaje de pobreza en el país y al poco acceso a la medicina, las plantas medicinales son utilizadas como alternativas para el tratamiento de diversas enfermedades. A nivel mundial se ha estimado que el 70-80% de las personas en los países en desarrollo dependen totalmente de los medicamentos a base de hierbas para su atención primaria de salud. Desde el surgimiento del virus, se han llevado a cabo muchos estudios basados en el uso de plantas medicinales, muchas de las cuales han demostrado una potente actividad inhibitoria contra el SARS-CoV-2 (Tahir ul Qamar, et al., 2019). Estas han atraído mucho la atención debido a que sus metabolitos secundarios podrían usarse para desarrollar un medicamento formal con efectos secundarios mínimos o nulos.

En Guatemala existe una gran cantidad de plantas medicinales, las cuales se utilizan comúnmente como remedios caseros, siendo para el país un recurso indispensable para la atención médica diaria (Kufer, et al., 2005). Dentro de ellas se encuentra *Punica granatum L.* a la cual se le ha encontrado actividad anti-influenza contra el virus de la influenza A, así como contra el virus del herpes simple - 2 (HSV-2), entre otros (Moradi, et al., 2019; Arunkumar y Rajarajan, 2018; Angamuthu, et al., 2019). Por lo que se plantea como una opción favorable el estudio de los metabolitos presentes en dicha planta para evaluar su

actividad antiviral contra el SARS-CoV-2 y los aspectos teóricos que guían su comportamiento.

Esta investigación tuvo como objetivo principal realizar un análisis de acoplamiento molecular de metabolitos secundarios presentes en *Punica granatum L* frente a dos enzimas principales del virus, así como estudiar y obtener las simulaciones de dinámica molecular en dichas moléculas y enzimas. Esto con la finalidad de identificar la estabilidad y las interacciones de unión de los fitoquímicos antivirales. A dichos compuestos, se les evaluó la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de manera computacional para determinar si son seguros o no para el uso humano, logrando elegir a los mejores metabolitos secundarios que son capaces y seguros de inhibir a algunas enzimas principales del virus. Por último, a los mejores compuestos, se les realizó simulaciones de dinámica molecular, permitiendo elegir al mejor candidato a ser utilizado como tratamiento potencial o para estudios próximos del desarrollo de nuevos fármacos enfocados al tratamiento del coronavirus.

### III. ANTECEDENTES

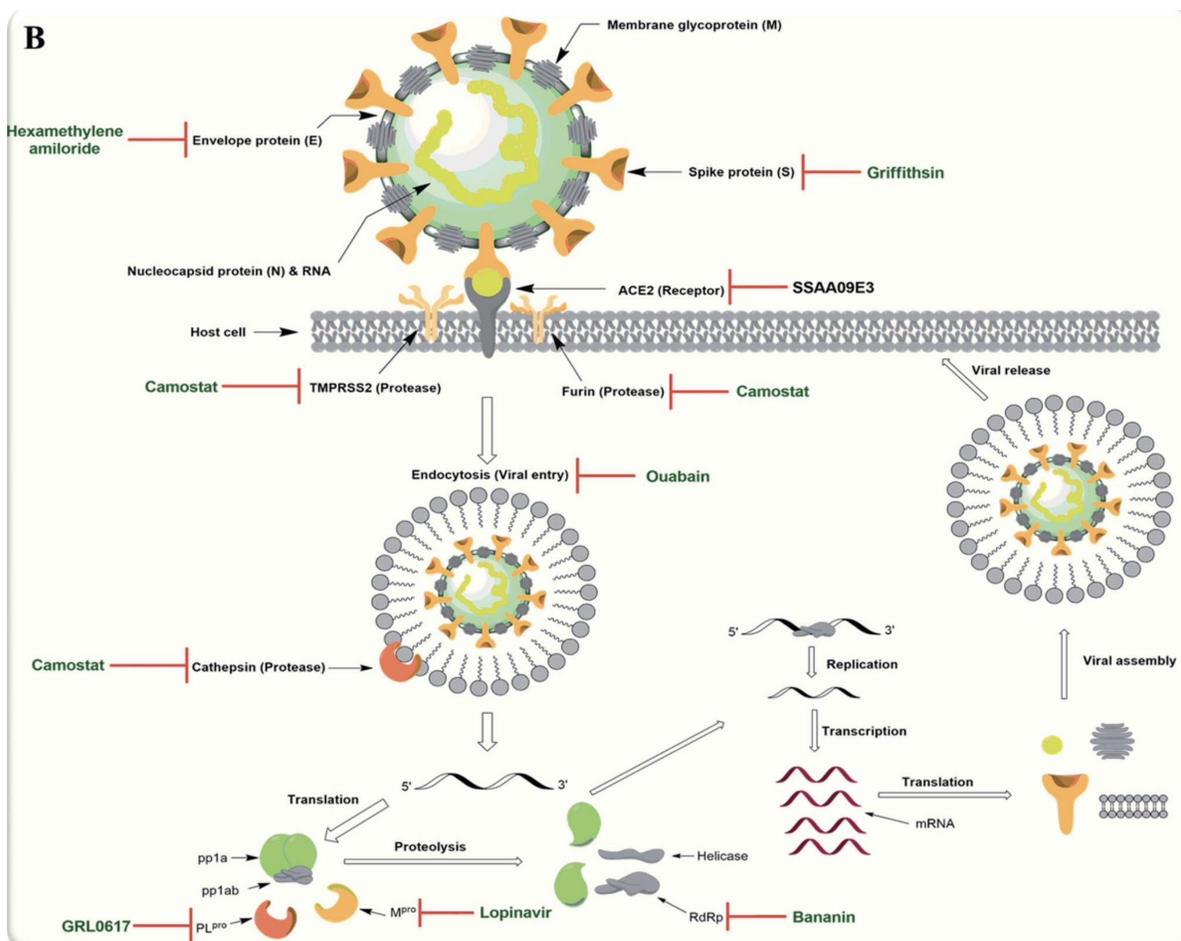
#### A. Coronavirus 2 (SARS-Cov-2)

El brote en curso de COVID-19 causado por un nuevo coronavirus, el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), en la ciudad china de Wuhan (provincia de Hubei) y su transmisión alarmantemente rápida a otros países en todo el mundo resultaron en que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declarara una emergencia de salud global en 30 de enero de 2020 (Ahmed, et al., 2020). El SARS-CoV-2 es un betacoronavirus que pertenece a la familia Coronaviridae y al orden Nidovirales (Richman, 2016). Hasta la fecha, se han identificado seis especies de coronavirus para infectar a los humanos y causar enfermedades, estos son virus de ARN monocatenario de sentido positivo, los cuales infectan principalmente a animales, incluidos pájaros y mamíferos (Ahmed, et al., 2020). Entre ellas, las infecciones 229E, OC43, NL63 y HKU1 son con frecuencia leves, causadas principalmente por síntomas de resfriado común. Las otras dos especies, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV), pueden causar enfermedades fatales (Xu, et al., 2020). El SARS-CoV-2 es el séptimo miembro de los coronavirus que infecta a los humanos (Zhu, et al., 2020). Los pacientes infectados presentan predominantemente fiebre, tos y opacidades radiológicas pulmonares (vidrio esmerilado), que se asemejan a las infecciones por SARS-CoV y MERS-CoV (Xu, et al., 2020).

Al igual que el SARS-CoV y el MERS-CoV, el reciente SARS-CoV-2 pertenece al género Betacoronavirus (Lu, et al., 2020). Tiene un tamaño genómico de  $\sim 30$  kilobases que, al igual que otros coronavirus, codifica múltiples proteínas estructurales y no estructurales. Las proteínas estructurales incluyen la proteína de la espiga (S), la proteína de la envoltura (E), la proteína de la membrana (M) y la proteína de la nucleocápside (N). Estas proteínas funcionan durante la entrada de la célula huésped y morfogénesis viral y liberación de S-glucoproteína en la superficie del virus, que es responsable de la unión del virus a un receptor huésped llamado ACE-II (Ahmed, et al., 2020), tal como se observa en la imagen

1. Con el SARS-CoV-2 descubierto recientemente, actualmente hay una falta de información inmunológica disponible sobre el virus (por ejemplo, información sobre epítomos inmunogénicos que provocan anticuerpos o respuestas de células T). Los estudios preliminares sugieren que el SARS-CoV-2 es bastante similar al SARS-CoV basado en el análisis filogenético del genoma completo, y en el mecanismo de entrada de células y el uso de receptores de células humanos (Ahmed, et al., 2020).

**Imagen 1:** Estructura del coronavirus y su ciclo de vida, que ilustra los principales objetivos moleculares y sus inhibidores.



Fuente: (Ahmed, et al., 2020).

## **B. Tratamiento del coronavirus (COVID-19)**

A raíz del surgimiento del SARS-CoV-2 se han dirigido una gran cantidad de estudios y de recursos con la finalidad de erradicar o controlar el incremento del virus. El desarrollo de vacunas contra el virus ha avanzado a una velocidad sin precedentes, para el 1 de junio de 2020 se estaban desarrollando 124 vacunas candidatas para el tratamiento del virus, de estos, 10 candidatos a vacunas habían entrado en ensayos clínicos humanos de fase 1, fase 1/2 combinada o fase 2 en adultos (Ita, 2021). Para finales de 2021 la Organización Mundial de la Salud dio luz verde para la inclusión de la primera vacuna como uso de emergencia, por lo que se pusieron en marcha los programas de vacunación colectiva y para el 15 de febrero de 2021 ya se había administrado 175.3 millones de dosis; mientras que hasta la fecha se están utilizando siete vacunas distintas a través de tres plataformas (OMS, 2021). El avance demasiado rápido en las vacunas para combatir a la enfermedad tiene una historia sin precedentes ya que ninguna vacuna se había desarrollado tan rápidamente en la historia. Se han invertido miles de millones de dólares comprometidos con lo mismo y la fabricación de las vacunas avanza día a día sin saber sin embargo, si alguna tendrá éxito en su totalidad (Lurie, et al., 2020).

### **1. Tratamientos iniciales**

Inicialmente no se había identificado medicamentos específicos con posibles aplicaciones terapéuticas para COVID-19. Por lo que una estrategia terapéutica económica fue reutilizar los medicamentos existentes como lopinavir / ritonavir (400/100 mg por vía oral cada 12 horas). Sin embargo, un ensayo aleatorizado, controlado y abierto no demostró ningún beneficio con el tratamiento con lopinavir / ritonavir en comparación con la atención estándar (Cao, et al., 2020). La cloroquina (500 mg cada 12 horas) y la hidroxicloroquina (200 mg cada 12 horas) se propusieron como terapia inmunomoduladora (Casella, et al., 2020). Además de su actividad antiviral, la cloroquina tiene una actividad inmunomoduladora, que puede mejorar sinérgicamente su efecto antiviral in vivo (Wang, et al., 2020). En particular, estos medicamentos pueden inducir la regulación negativa de las

moléculas de adhesión de la superficie celular, reduciendo la producción de citocinas proinflamatorias, estimulando la fagocitosis por los macrófagos alveolares e inhibiendo la activación y movilización de neutrófilos . Sin embargo, se debe prestar atención con el uso concomitante de hidroxicloroquina con azitromicina, ya que la asociación puede conducir a un mayor riesgo de prolongación del intervalo QT y arritmias cardíacas, la cloroquina también puede inducir la prolongación del intervalo QT (Casella, et al., 2020). Por lo que su uso dejó de ser recomendado.

Por otro lado, la oxigenoterapia representa el primer paso para abordar la insuficiencia respiratoria. La ventilación mecánica no invasiva (NIV) e invasiva (IMV) pueden ser necesaria en casos de insuficiencia respiratoria refractaria a la oxigenoterapia. Sin embargo, se necesitan cuidados intensivos para tratar formas complicadas de la enfermedad (Casella, et al., 2020).

## **2. Vacunas para la prevención del COVID-19**

Recientemente se han probado y se siguen desarrollando múltiples enfoques de tratamiento e intervenciones farmacológicas para mitigar los riesgos de contagio por el virus. Hasta la fecha, se ha aprobado en muchos países la utilización de vacunas producidas por la industria farmacéutica. Como en el caso de la FDA de Estados Unidos, que aprobó las vacunas BNT162 y mRNA-1273 desarrolladas por Pfizer / BioNTech y Moderna Inc. e inició su vacunación de emergencia (Chilamakuri y Agarwal, 2021). Ambas vacunas se han presentado como las pioneras y ambas requieren 2 dosis con eficacias reportadas del 90% (Paltiel, et al., 2021).

Dentro de las vacunas que se están produciendo y utilizando a nivel mundial se ha observado satisfactoriamente que tienen efectos adversos en un bajo porcentaje de personas vacunadas. Como en el caso de la vacuna producida por Moderna Inc. para la que se registró en enero de 2021 la vacunación de 4041396 primeras dosis en Estados Unidos, de

las cuales se registraron efectos adversos en un 0.03% de los pacientes vacunados (Chilamakuri y Agarwal, 2021).

Aparte de las mencionadas anteriormente varias empresas también han anunciado y comenzado la producción masiva de dosis de vacunas, como en el caso de AstraZeneca con su vacuna SARS-CoV-2 vectorizada por adenovirus de chimpancé, y así como Sinovac y Johnson & Johnson. Para el caso de la vacuna de AstraZeneca se ha reportado actualmente como el único candidato que ha informado eficacia y tiene características susceptibles de uso generalizado (Kim, et al., 2021). Por otro lado, también hay otros candidatos a vacunas adicionales que aún se encuentran en etapas de desarrollo y que prometen una dosis única, requisitos de almacenamiento más simples y una inmunidad más rápida después de la vacunación (Zhou, et al., 2021).

### **3. Retos a considerar en las vacunas actuales**

A pesar de la existencia en el mercado de vacunas con buenos porcentajes de eficacia, hay algunos retos a considerar. Dentro de ellos se puede mencionar los datos limitados que se tienen sobre la seguridad a largo plazo, la eficacia en grupos demográficos de alto riesgo, la magnitud de la protección y la duración de la inmunidad de la vacuna (Mattoli, 2021). Otros factores que también complican el uso de las vacunas del COVID-19 es el uso potencial de múltiples vacunas diferentes y la falta de sustitución de una por otra, así como los requisitos de transporte fríos y exigentes, especialmente para las vacunas de ARN mensajero, que requieren un almacenamiento de  $-20^{\circ}\text{C}$  para la vacuna de Moderna y un almacenamiento de  $-70^{\circ}\text{C}$  para la de Pfizer (Kim, et al., 2021).

También se debe de considerar que lograr la cobertura de vacunación necesaria a nivel mundial puede llevar años. En estudios se ha estimado que al menos 5 mil millones de personas en todo el mundo (incluidos casi 200 millones de estadounidenses) necesitan vacunarse para lograr la protección de la comunidad y poner fin a la pandemia (Bloom, et al., 2020). En donde las personas de alto riesgo pueden presentar hasta el 30% de esta

población. Según estimaciones del Instituto Robert Koch de Alemania incluso si hubiera suficientes recursos de atención médica y las instalaciones adecuadas para permitir vacunar a 100000 personas al día, después de 180 días (6 meses) solo 18 millones de personas habrían recibido una dosis única de una de las vacunas potencialmente disponibles, considerando además que la mayoría de vacunas disponibles en el mercado requieren de dos dosis para lograr una protección adecuada (Mayer-Kuckuk, 2020).

Por otro lado, se deben de considerar aquellos países en vías de desarrollo y con poco acceso a la medicina, como en el caso de Guatemala. En donde la insuficiencia de suministros presenta importantes desafíos adicionales para lograr una cobertura de vacunación que al menos sea suficiente para lograr erradicar la pandemia a nivel mundial en menos de 2 o 3 años (Bloom, et al., 2020). Eso sin considerar las deficiencias que se tienen por parte de los gobiernos al implementar planes de vacunación eficaces y congruentes, lo cual también atrasaría significativamente la implementación de las vacunas en todo el mundo.

Por lo que a pesar de que las vacunas son una herramienta importante, deben manejarse de manera efectiva y usarse junto con otras medidas de salud pública. Así mismo se debe de necesitar la optimización de vacunas así como la implementación de nuevas (Kim, et al., 2021). Por lo cual la investigación en torno al SARS-CoV-2 aún tiene un largo camino por delante y debe haber una implementación sistemática de estudios basados en la comprensión y el tratamiento del virus.

### **C. Plantas Medicinales: una luz para el tratamiento del coronavirus**

Las plantas medicinales son valiosas fuentes de medicamentos utilizados a nivel mundial como medicinas alternativas, se ha estimado que el 70-80% de las personas en los países en desarrollo dependen totalmente de los medicamentos a base de hierbas para su atención primaria de salud. Actualmente se han llevado a cabo muchos estudios basados en el uso de plantas medicinales, muchas de las cuales han demostrado tener una potente actividad

inhibitoria contra el SARS-CoV-2. Estas han atraído mucho la atención porque incluyen compuestos bioactivos que podrían usarse para desarrollar medicamentos formales contra varias enfermedades con efectos secundarios mínimos o nulos (Tahir ul Qamar, et al., 2019).

Las plantas medicinales tradicionales con una fuerte actividad antiviral se han utilizado durante mucho tiempo para tratar la infección viral. Los efectos medicinales beneficiosos de los productos vegetales generalmente resultan de los metabolitos secundarios presentes en las plantas. Se ha identificado una variedad de fitoquímicos derivados de la planta como alcaloides, esteroides, lactonas diterpenoides, alifáticos y glucósidos, los cuales han demostrado inducir efectos antivirales en humanos (Pandit, 2020). El mundo ha comenzado a explorar las medicinas tradicionales para el tratamiento de enfermedades virales, que son comparativamente más económicas, fácilmente disponibles y tienen menos posibilidades de efectos secundarios y toxicidad. Algunos aceites esenciales volátiles de hierbas culinarias, especias y tés de hierbas comúnmente utilizados también han exhibido un alto nivel de actividad antiviral. Sin embargo, dadas las pocas clases de compuestos investigados, la mayoría de la farmacopea de compuestos en plantas medicinales con actividad antiviral aún se desconoce. Varios de estos fitoquímicos tienen mecanismos de acción complementarios y superpuestos, que incluyen efectos antivirales al inhibir la formación de ADN o ARN viral o al inhibir la actividad de reproducción viral (Jassim y Naji, 2003).

### **1. Inhibidores de entrada viral**

Estos compuestos se consideran agentes terapéuticos naturales que se dirigen a la entrada viral. Una clase importante de terapias antivirales debido a su potencial para bloquear el primer paso de infección viral y, por lo tanto, evitando su propagación y capacidad de evolucionar y adquirir resistencia a las drogas (Sayed, et al., 2020).

## **2. Inhibidores de la replicación viral**

Estos inhibidores son uno de los objetivos moleculares más prominentes en COVID-19, los inhibidores de Mpro y PLpro fueron seleccionados para el desarrollo de potenciales terapias CoV anti-SARS. Se han desarrollado varias moléculas pequeñas durante y después de la primera y segunda ondas de propagación de CoV. Entre los cuales, muchos productos naturales derivados de plantas comestibles y sus derivados sintéticos relacionados han ofrecido varios inhibidores potenciales interesantes con seguridad y eficacia bien probadas (Sayed, et al., 2020).

Una de las primeras plantas medicinales que se ha reportado que posee actividad antiviral contra el SARS-CoV-2 es la *Isatis indigotica* (Sayed, et al., 2020), y el listado ha ido aumentando, en donde varios estudios se centran en plantas medicinales de china o de países africanos (Aanouz, et al., 2020; Tahir ul Qamar, et al., 2020).

## **3. Plantas Medicinales de Guatemala con actividad inhibitoria**

Guatemala a pesar de tener una gran variedad de estudios antropológicos, las ricas tradiciones etnobotánicas del país se han estudiado con mucho menos detalle en comparación con los grupos indígenas en el país vecino, México. En un país tan diverso geográficamente, biológicamente y culturalmente como Guatemala, la flora local, los nombres y usos de las plantas a menudo varían considerablemente, incluso en distancias geográficas cortas (Kufer, et al., 2005).

La documentación de los usos locales de las diversas plantas medicinales no es solo de interés académico. La población rural, especialmente en los países en desarrollo como Guatemala, depende de las plantas medicinales como un recurso vital para el cuidado diario de su salud. Si bien las formas tradicionales, principalmente orales, de transmisión del conocimiento se están desmoronando ampliamente, surge la necesidad de documentación y transferencia a medios nuevos pero culturalmente apropiados para la difusión (Kufer, et al., 2005). En el país lastimosamente existe muy poca documentación sobre el uso adecuado de

las plantas e incluso los estudios reportados sobre actividad antiviral son realizados en su mayoría por países extranjeros.

El conocimiento de plantas con actividad antiviral presentes en el país, está basado en otros estudios realizados fuera del país. Muchos de estos especímenes solamente son cultivados en el país, por lo que también se encuentran en otras partes del mundo. Han existido estudios tales como el realizado por Bedoya y colaboradores en donde evaluaron tres extractos de plantas guatemaltecas de *Justicia reptans*, *Neurolaena lobata* y *Pouteria viridis* con un ensayo antiviral clásico, en donde se observó que inhiben la replicación del VIH (Bedoya, et al., 2008). Así mismo Abad y colaboradores, desarrollaron un estudio en el que probaron los extractos de 12 plantas para determinar la actividad antiviral contra el herpes simple tipo I, cuyas plantas investigadas son endémicas de la Península Ibérica y Guatemala, en donde las presentaron inhibición potente fueron *Eugenia jambos*, *Cistus populifolius*, *Lippia alba*, *Chiranthodendron pentadactylon* y *Tuberaria* (Abad, et al., 1997). Así mismo se ha demostrado que otras plantas como *Quercus persica* L. cuyo extracto hidroalcohólico es potencialmente una medicina herbaria antiherpética apropiada y prometedora para el tratamiento del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-I) (Rafeian-kopaei, et al., 2013).

#### **4. Estudios sobre actividad inhibitoria de *Punica granatum* L.**

Dentro de las plantas presentes en territorio guatemalteco y que son usadas con fines medicinales, se encuentra a *Punica granatum* L.. La fruta de esta planta es rica en compuestos bioactivos importantes con propiedades antimicrobianas potenciales (Duman, et al., 2009), además los extractos de sus frutos han sido utilizados en la medicina tradicional cubana como fármacos muy eficaces para el tratamiento de enfermedades respiratorias (Sanchez-Lamar, et al., 2008). Por tal razón existen varios estudios que giran en torno a comprobar si también poseen actividad antiviral frente a varios tipos de virus.

Dentro de ellos se puede mencionar al estudio realizado por Arunkumar y Rajarajan, en el

que evaluaron la eficacia en contra del virus del herpes simple - 2 (HSV-2) de extractos liofilizados y compuestos bioactivos aislados de la cáscara de la fruta de *Punica granatum L.* En el cual encontraron que dentro de los 13 compuestos estudiados, punicalagina mostró un 100% de actividad anti-HSV-2. Y además apoyaron la evidencia por medio de estudios ADMET *in silico*, en el que los compuestos presentaron fuertes interacciones con proteínas seleccionadas dianas de HSV-2 (Arunkumar y Rajarajan, 2018). Agamathu y colaboradores también evaluaron el potencial antiviral *in vitro* de la planta contra el virus del herpes humano 3 (HHV-3) aislado de la varicela y zoster. En donde encontraron que los extractos acuosos de las hojas de *Punica granatum L.* exhibieron actividad antiviral potencial contra el virus, y además por medio de acoplamiento *in silico* encontraron que los fitoquímicos interactúan con el sitio activo de la proteasa HHV-3 (Angamuthu, et al., 2019).

De igual forma Moradi y colaboradores evaluaron la actividad contra el virus de la influenza A *in vitro*, en extractos y fracciones de la piel de granada. En donde encontraron que el extracto crudo y sus fracciones tuvieron buenos resultados de efecto inhibitorio contra el virus de la influenza A, y así mismo mostraron que la producción del virus se redujo significativamente de manera dependiente de las dosis (Moradi, et al., 2019). Además, también existen estudios de revisión de literatura en donde se sugiere la utilización de esta planta ya que presenta valor medicinal que puede llegar a ser prometedor para la inhibición del SARS-Cov-2 (Mani, et al., 2020; Divya, et al., 2020). O que gracias a su fácil acceso a la dieta diaria puede llegar a fortalecer el sistema inmunológico y protegerse contra la infección por el virus (Yang, et al., 2020).

#### **D. Estudios *in silico* sobre metabolitos secundarios con potencial inhibitorio contra SARS-CoV-2**

El rápido desarrollo del diseño de medicamentos asistido por computadora (CADD) utilizado para el modelado molecular *in silico* junto con las crecientes bibliotecas de moléculas pequeñas derivadas, con ayuda de la química combinatoria han mejorado dramáticamente el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos (Sayed, et al., 2020). Se ha observado que durante las últimas ondas de coronavirus, estos enfoques

basados en computadora han contribuido a encontrar una amplia gama de nuevos y potentes candidatos a fármacos tanto para el tratamiento de estas como de otras enfermedades.

Los enfoques de bioinformática y biología de sistemas pueden ayudar grandemente a estudiar el potencial terapéutico de las plantas medicinales tradicionales, haciendo que el desarrollo de fármacos sea más rápido, más barato y más seguro (Jin, et al., 2020). Los receptores y enzimas involucrados en varias etapas en el ciclo de vida del SARS-CoV – 2 se están utilizando como medicamento objetivo. En donde las proteasas virales han demostrado ser objetivos efectivos para las terapias antivirales, como se ve en el caso de las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis C (VHC). Las proteasas resultan ser potenciales para la inhibición de la replicación viral, uno de los fármacos mejor caracterizados objetivos entre coronavirus es la proteasa principal (Pandit, 2020). Se ha encontrado que las secuencias del SARS-CoV – 2 Mpro y el SARS-CoV Mpro muestran una identidad del 96% por lo que muchos de los inhibidores de la proteasa se están utilizando en el tratamiento de COVID-19, por ejemplo, combinaciones de lopinavir-ritonavir (Pandit, 2020).

Dada las ventajas de trabajar con modelos computacionales, se han desarrollado estudios que tienen como objetivo emplear enfoques computacionales basados en el acoplamiento molecular para detectar fitoquímicos de las plantas medicinales que se dirigen a las proteínas del SARS-CoV-2 como inhibidores potenciales, con la finalidad de identificar terapias antivirales.

### **1. Estudios en países asiáticos**

Pandi y Latha recientemente publicaron un estudio en donde se centraron en tres proteínas diana importantes en el ciclo de vida del SARS-CoV-2, en donde reportan que de los 30 fitoquímicos vegetales seleccionados, Silybin, un componente activo que se encuentra en *Silybum marianum* exhibió una mayor afinidad de unión con los objetivos en SARS-CoV-2 en comparación con los medicamentos utilizados actualmente contra dicho virus

(Pandit, 2020). De la misma forma Khaerunnisa y colaboradores realizaron un estudio *in silico* en Indonesia, en el que utilizaron las proteínas principales 6LU7 y 2GTB del SARS-CoV-2. Ellos encontraron que los metabolitos secundarios luteolin-7-glucósido, demetoxicurcumina, apigenina-7-glucósido, oleuropeína, curcumina, catequina y epicatequina-galato parecen tener el mejor potencial para actuar como inhibidores de Mpro COVID-19 (Khaerunnisa, et al., 2020).

Tahir ul Qmar y colaboradores también reportaron que a partir de un análisis de la secuencia 3CLpro, construyeron un modelo por homología 3D y lo seleccionaron frente a una biblioteca de plantas medicinales que contiene 32,297 potenciales fitoquímicos antivirales de compuestos medicinales tradicionales chinos. A partir de su análisis asistido por computadora revelaron nueve primeros resultados, tal como el compuesto Myricitrin, los cuales podrían ser valiosos para explorar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos anti COVID-19 en un futuro (Tahir ul Qamar, et al., 2020). Así mismo Chandel y colaboradores en una investigación en India, a partir de un enfoque bioinformático y una biblioteca de compuestos antivirales aprobados por la FDA y los fitoquímicos activos, examinaron los compuestos utilizando la herramienta de detección virtual PyRx que condujo a 19 resultados basado en su mayor afinidad de unión. En el que identificaron a nelfinavir con una afinidad de unión más alta frente a las principales proteasas del SARS-CoV-2 (Chandel, et al., 2020).

## **2. Estudios en países americanos**

Islam y colaboradores seleccionaron 40 fitoquímicos antivirales con a finalidad de descubrir los mejores candidatos que pueden actuar como inhibidores potentes contra la proteasa principal del SARS-CoV-2. Utilizaron acoplamiento molecular para determinar las afinidades e interacciones de unión entre los fitoquímicos y la proteasa principal. Seleccionaron candidatos que interactúan fuertemente con los residuos clave Cys145 e His41. Y para validar las interacciones de acoplamiento, realizan simulaciones de dinámica molecular (DM) de 100ns en los cinco inhibidores mejor clasificados, los cuales eran

hipericina, cianidina 3-glucósido, baicalina, glabridina y a-cetoamida-11r. Ellos revelaron que la baicalina, la cianidina 3-glucósido y la a-cetoamida-11r tienen similitud estructural con la forma apo de la proteasa principal. Estos hallazgos fueron respaldados por la desviación cuadrática media (RMSD), la fluctuación cuadrática media (RMSF), el radio de giro (Rg) y las investigaciones de área de superficie accesible al solvente (SASA) (Islam, et al., 2020).

Thuy y colaboradores reportaron 18 sustancias activas encontradas en el aceite esencial de ajo, los cuales utilizaron la técnica de acoplamiento molecular frente a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) y la proteína principal 6LU7 del SARS-CoV-2. Los resultados muestran que los 17 compuestos organosulfurados, que representan el 99.4% del contenido del aceite esencial de ajo, tienen fuertes interacciones con los aminoácidos de las proteínas. Por lo que sugieren que el aceite esencial de ajo es una valiosa fuente de antiviral natural, que contribuye a prevenir la invasión del coronavirus en el cuerpo humano (Thuy, et al., 2020).

#### **E. Predicciones *in silico* ADME/Tox**

Los rápidos avances en la química computacional han logrado que los métodos *in silico* ofrezcan beneficios significativos no solo para los requisitos de las evaluaciones regulatorias, sino como para evaluar el perfil de seguridad de un químico en la industria farmacéutica (Banerjee, et al., 2018). Así mismo, se han obtenido progresos muy significativos para la detección de alto rendimiento de absorción, propiedades de distribución, metabolismo y excreción, y toxicidad (ADME/Tox) por medio de predicciones *in silico*, facilitando la selección apropiada de fármacos candidatos por compañías farmacéuticas, y evitando costosos ensayos clínicos y la experimentación animal (Alqahtani, 2017).

## 1. Toxicidad

El objetivo principal de los modelos y programas para predecir la toxicidad *in silico* es complementar los métodos de toxicidad *in vitro* existentes para lograr predecir los efectos de toxicidad en diferentes moléculas (Banerjee, et al., 2018). Esta predicción usa recursos computacionales como algoritmos, softwares y datos, y modelos como árbol de decisión basados en alertas estructurales, o por modelos de aprendizaje automático para la predicción de varios puntos finales de toxicidad (Huang, et al., 2016). Se han reportado estudios que han logrado predecir la actividad cancerígena de moléculas así como riesgos de toxicidad en diferentes alcaloides presentes en plantas (Yeni, et al., 2018; Rosales, et al., 2019).

## 2. ADME

En el desarrollo de fármacos es importante identificar a los candidatos débiles en la etapa más temprana posible, y es por ello que muchos compuestos químicos no logran llegar a la etapa clínica. Una de las principales razones por las cuales se termina el proceso de desarrollo de candidatos a fármacos es por las malas propiedades farmacocinéticas, así como problemas de toxicidad (Vankatesh y Lipper, 2000). Sin embargo estas propiedades ADME-Tox como solubilidad, pKa, permeabilidad, biodisponibilidad oral, penetración de BBB, permeación de la piel, metabolismo y vías metabólicas, volumen de distribución, unión a proteínas, transportadores y aclaramiento, no solo pueden predecirse de forma efectiva y exitosa usando diversos modelos disponibles en distintos softwares. Sino que también existen métodos que permiten predecir descriptores físicamente significativos y propiedades farmacéuticamente relevantes, tales como la regla de Lipinski (Shrodinger, 2015).

Actualmente es muy común la experimentación computacional previo a la experimentación *in vivo* de compuestos con propiedades farmacológicas. Tal como un estudio realizado por Chatterjee y colaboradores, en la que estudian la inhibición del complejo CDK5/p25 como una diana viable para numerosas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de

Alzheimer. En la investigación se clasificaron nueve compuestos a los que se le calcularon propiedades fisicoquímicas y ADME con la finalidad de evaluar su capacidad como fármacos, y posteriormente identificar al mejor compuesto y estudiar de forma experimental su actividad bioquímica (Chatterjee, et al., 2009).

## **F. Simulaciones en Química Computacional**

### **1. Dinámica Molecular**

La dinámica molecular (MD por sus siglas en inglés) es otro enfoque para la investigación de la ubicación del átomo en el espacio. Este es un modelo físico que permite estudiar la interacción y el movimiento de los átomos y moléculas de acuerdo a la física de Newton, por lo que en las simulaciones computacionales por medio de diferentes softwares, básicamente lo que se realiza es la solución numérica de las ecuaciones dinámicas newtonianas clásicas. En ellas se utiliza un campo de fuerza para estimar las fuerzas entre los átomos que interactúan entre sí y calcular así la energía total del sistema. Durante las simulaciones de MD, se obtiene la integración de las leyes de movimiento de Newton lo que genera configuraciones sucesivas del sistema conforme evoluciona, proporcionando así trayectorias que permiten especificar las posiciones y velocidades de las partículas a lo largo del tiempo. Y este conjunto de posibles ubicaciones de átomos proporciona, por ejemplo, un perfil de diferentes conformaciones para una molécula dada. Y además, MD también puede proporcionar información sobre las propiedades termodinámicas como la energía libre, medidas cinéticas de las moléculas, así como otras cantidades macroscópicas que se pueden comparar con los datos experimentales observables (De Vivo, et al., 20176; Brown, et al., 2010).

Las simulaciones de dinámica molecular son herramientas importantes para comprender la base física de la estructura y función de las macromoléculas biológicas. La visión inicial de las proteínas como estructuras relativamente rígidas ha sido reemplazada por un modelo dinámico en el que los movimientos internos y los cambios conformacionales resultantes juegan un papel esencial en su función. El aumento en el número de estudios que utilizan la

dinámica molecular para simular las propiedades de las macromoléculas biológicas ha sido impulsado por la disponibilidad general de programas y el poder de cómputo requerido para estudios significativos. Se han desarrollado métodos nuevos y originales los cuales han contribuido al desarrollo y la aplicación de simulaciones de energía libre o al estudio de las reacciones enzimáticas mediante métodos mixtos de mecánica cuántica / mecánica molecular (QM / MM) (Karplus y McCammon, 2002).

Algunos estudios se han basado en explorar e identificar las afinidades e interacciones de unión de fitoquímicos antivirales contra las enzimas principales del SARS-CoV-2 utilizando herramientas computacionales y estadísticas. Por lo cual el acoplamiento molecular, la dinámica molecular, el análisis de componentes principales (PCA) y las relaciones cuantitativas de estructura-actividad (QSAR) se realizan para evaluar el rendimiento de estos fitoquímicos. Las simulaciones de dinámica molecular permiten obtener más información sobre la proteína y los complejos acoplados en condiciones biológicas (Islam, et al., 2020). De la misma forma Muralidhaan y colaboradores publicaron una investigación en la que trataban de comprender el mecanismo de los medicamentos propuestos para COVID-19. Esto por medio de simulaciones de acoplamiento molecular y dinámica molecular (MD), para comprender la interacción entre el ligando y la proteína, considerando las interacciones simultáneas entre tres fármacos y la proteína (Muralidharan, et al., 2020).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La infección COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2, ha sido declarada una pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) provocando consecuencias negativas tanto para el país como para el mundo entero. Guatemala hasta el 5 de julio de 2021 se tenían registrados 307785 casos, y se espera que esta cantidad siga creciendo si no se logran medidas rápidas de prevención sanitaria (inmunización). Actualmente existen en el mercado vacunas con buenos porcentajes de eficacia y otros candidatos que se encuentran en etapas de desarrollo (Zhou, et al., 2021).

A pesar de la existencia de planes de vacunación que se siguen en varios países, se deben considerar algunos retos. Dentro de los que se puede mencionar: la eficacia, la magnitud de la protección y la duración de la inmunidad de la vacuna (Mattoli, 2021). Para países en vías de desarrollo como Guatemala se presentan desafíos adicionales, en la que se garantice la cobertura de vacunación. Por lo cual sigue siendo necesario la optimización de las vacunas y la implementación de otras formas de tratamiento para el COVID-19.

La utilización de las plantas medicinales de la región se muestra como una buena alternativa para el tratamiento del COVID-19, debido a que presentan una opción económicamente accesible, con alta disponibilidad y aceptación para las poblaciones de áreas rurales y urbanas del país. Existen varios estudios que evalúan la actividad antiviral de metabolitos secundarios de plantas utilizando métodos *in silico* sobre diferentes enzimas del virus SARS-CoV-2 (Bouchentouf y Nouredine, 2020).

Guatemala, aparte de ser diverso geográficamente, biológicamente y culturalmente cuenta con una vegetación local extensa, en donde muchas de las plantas se usan con fines curativos (Kufer, et al., 2005), como *Punica granatum L.*, usada en algunas regiones para el tratamiento de enfermedades respiratorias y se ha demostrado su actividad antiviral mediante varios estudios *in vitro* e *in silico* de sus componentes bioactivos (Angamuthu, et al., 2019; Arunkumar y Rajarajan, 2018).

Por lo cual, este estudio permitió seguir estudiando la actividad antiviral de 44 metabolitos secundarios presentes en *Punica granatum L* con la finalidad de proponer candidatos como alternativas accesibles para el tratamiento de COVID-19 en la población guatemalteca, ya que evaluó por estudios *in silico* la actividad antiviral contra el SARS-CoV-2 de dichos metabolitos. Además, se planteó un estudio teórico complementario, a través de métodos computacionales en el que se predijeron propiedades moleculares, ADME y Toxicidad de las moléculas. Y cálculos aplicando la dinámica molecular, permitiendo obtener información de las proteínas y metabolitos acoplados en condiciones biológicas; generando propuestas para nuevos estudios.

## V. OBJETIVOS

### A. Objetivo general:

Establecer las simulaciones de dinámica molecular en metabolitos secundarios presentes en *Punica granatum L.* con propiedades inhibitorias contra SARS-CoV-2 y con buenos resultados ADME-Tox.

### B. Objetivos específicos:

1. Evaluar las interacciones químicas de los metabolitos secundarios presentes en *Punica granatum L.* en 2 enzimas principales del SARS-CoV-2 y en una control mediante acoplamiento molecular.
2. Predecir las propiedades moleculares, la absorción, distribución y toxicidad de los derivados con potencial de inhibición contra SARS-CoV-2.
3. Modelar los aspectos dinámicos en los sistemas complejos proteína-ligando de los candidatos, por medio de simulaciones de dinámica molecular.

## VI. HIPÓTESIS

- Los metabolitos secundarios de *Punica Granatum L.* poseen una energía de acoplamiento molecular con las enzimas menor a  $-7$  KJ/mol.
- Los metabolitos secundarios de *Punica Granatum L.* con potencial de inhibición contra SARS-CoV-2 presentan una baja absorción humana oral y un resultado no tóxico.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Enfoque de investigación

Cuantitativo

### B. Tipo de investigación

Se trata de una investigación descriptiva ya que mide y evalúa diversos aspectos, dimensiones o componentes del fenómeno a investigar. Sin embargo, también es una investigación básica y explicativa debido a que permite profundizar en el conocimiento y su interés se centra en explicar por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se da éste, o por qué dos o más variables están relacionadas (Hernandez, et al., 1991).

### C. Universo

#### 1. Población:

Metabolitos secundarios de *Punica granatum L.* con actividad antiviral reportada.

#### 2. Muestra:

- a) 44 metabolitos secundarios de *Punica granatum L.* con actividad antiviral

**Tabla 1:** Metabolitos secundarios de *Punica granatum L.* a modelar

No.	Planta	Metabolito	PubChem CID
1	<i>Punica granatum L.</i>	Luteolin	5280445
2	<i>Punica granatum L.</i>	Naringin	442428
3	<i>Punica granatum L.</i>	Pelletierine	92987

4	<i>Punica granatum L.</i>	Pseudopelletierine	6602484
5	<i>Punica granatum L.</i>	Chlorogenic acid	1794427
6	<i>Punica granatum L.</i>	Pseudopelletierine	11096
7	<i>Punica granatum L.</i>	Chrysanthemin	441667
8	<i>Punica granatum L.</i>	Pelargonin	441772
9	<i>Punica granatum L.</i>	Coumestrol	5281707
10	<i>Punica granatum L.</i>	Nasutin B	ND
11	<i>Punica granatum L.</i>	Corilagin	73568
12	<i>Punica granatum L.</i>	Pedunculagin	442688
13	<i>Punica granatum L.</i>	Ursolic acid	64945
14	<i>Punica granatum L.</i>	Kaempferol	5280863
15	<i>Punica granatum L.</i>	Cyanidin	128861
16	<i>Punica granatum L.</i>	Myrtillin	165558
17	<i>Punica granatum L.</i>	Delphin	10100906
18	<i>Punica granatum L.</i>	Petunin	71587075
19	<i>Punica granatum L.</i>	Pelargonidin	440832
20	<i>Punica granatum L.</i>	Ellagic acid	5281855

21	<i>Punica granatum L.</i>	Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1->6)-glucoside	44259697
22	<i>Punica granatum L.</i>	Isosakuranetin 7-alpha-L-arabinofuranosyl-(1->6)-glucoside	42607954
23	<i>Punica granatum L.</i>	5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanone 7-alpha-L-arabinofuranosyl-(1->6)-glucoside	42607979
24	<i>Punica granatum L.</i>	Norhygrine	15250836
25	<i>Punica granatum L.</i>	Maslinic acid	73659
26	<i>Punica granatum L.</i>	Methyl gallate	7428
27	<i>Punica granatum L.</i>	Oleanolic acid	10494
28	<i>Punica granatum L.</i>	Icariside D1	13893575
29	<i>Punica granatum L.</i>	Punicanolic acid	25132490
30	<i>Punica granatum L.</i>	Quinic acid	6508
31	<i>Punica granatum L.</i>	Punicalagin	44584733
32	<i>Punica granatum L.</i>	2-O-Galloylpunicalin	101136622
33	<i>Punica granatum L.</i>	5-O-Galloylpunicacortein D	101219413

34	<i>Punica granatum L.</i>	Punicacortein A	14035447
35	<i>Punica granatum L.</i>	Punicacortein B	20056239
36	<i>Punica granatum L.</i>	Punicacortein C	44567110
37	<i>Punica granatum L.</i>	Punicacortein D	101219414
38	<i>Punica granatum L.</i>	Punicalin	5388496
39	<i>Punica granatum L.</i>	Cyanidin 3,5-di-O-glucoside	441688
40	<i>Punica granatum L.</i>	Delphinidin 3-O-glucoside	443650
41	<i>Punica granatum L.</i>	Punicafolin	5320800
42	<i>Punica granatum L.</i>	Tercatain	14411426
43	<i>Punica granatum L.</i>	Pregnenolone	8955
44	<i>Punica granatum L.</i>	N-Methylpelletierine	1548928

Fuente: (PubChem, 2020)

b) 2 enzimas de SARS-Cov-2 y una control

**Tabla 2:** Enzimas a modelar

<b>No.</b>	<b>Enzima</b>	<b>Organismo</b>	<b>Protein Data Bank ID</b>
1	Proteasa principal COVID-19	Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2, construcción sintética	6LU7

2	SARS-CoV-2 ARN polimerasa dependiente de ARN	Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2	7BTF
3	Dominio ApaG de FBxo3	Homo sapiens	5HDW

Fuente: (PDB, 2020)

## D. Materiales

### 1. Hardware:

- a) Computadoras de alto rendimiento con procesador AMD FX-8350 8-Core 4.0GHz, 8GB de RAM. Tarjeta de video NVIDIA GTX 770 1536CC, y tarjeta madre ASUS SABERTOOTH R2.0 AM3+AMD.
- b) Computadora HP Pavilion Gaming Laptop 15, con procesador Intel Core i7-10750H, 8GB de RAM, 250GB SSDS, 1TB disco sólido. Tarjeta de video NVIDIA GeForce GTX 1650.

### 2. Software:

- a) Avogadro 1.2.0
- b) Open Babel 3.0.0
- c) UCSF Chimera 1.14
- d) AutoDock Vina 1.1.2
- e) Knime 4.1.0
- f) VMD 1.9.3
- g) OriginLab 2018
- h) Discovery Studio v16.1.0.15350
- i) Python 3.7.1
- j) NAMD 2.14

- k) Laboratorio virtual ProTox-II
- l) CHARMM-GUI
- m) QikProp, Schrödinger Suite

## **E. Métodos:**

### **1. Obtención de las enzimas y preparación de los ligandos**

- a) Se buscaron las proteínas elegidas para ser modeladas, por ID en la página de Protein Data Bank, se descargaron en formato pdb y se guardaron.
- b) Se descargaron y guardaron las moléculas o metabolitos secundarios a trabajar en formato sdf de la página de PubChem.
- c) Por medio del programa Open Babel, se convirtieron las moléculas de formato sdf a mol2.
- d) Se prepararon estructuralmente los ligandos a ser modelados de forma más cercana a sus condiciones naturales, por medio del programa Avogadro. Para ello se ajustaron los estados de protonación en un rango de pH seleccionado y se realizó su minimización energética (Kuenemann, et al., 2018).

### **2. Interacción molecular con el sitio activo:**

- a) Las enzimas se prepararon en el programa Auto Dock Vina y UCSF Chimera, se eliminaron los residuos no estándares como moléculas de agua, moléculas complejas no relacionadas, y se agregaron hidrógenos y cargas de Kollman (Muralidharan, et al., 2020).
- b) Por medio del programa UCSF Chimera, se identificó el sitio activo de la proteína mediante interacciones moleculares exploratorias. Y a partir de ello se obtuvieron las dimensiones

de caja para cada enzima, la cual comprende al sitio activo de la misma (Ponce, 2019).

- c) Se guardaron las enzimas en formato PDBQT.

### **3. Realización de Docking:**

- a) Por medio de Auto Dock Vina, se calculó el acoplamiento molecular en el sitio activo de las enzimas con las moléculas previamente preparadas. Para ello se añadieron y cambiaron las características por cada enzima modelada, tales como el número de corridas de algoritmo y tamaño de la caja.
- b) Se compararon y clasificaron las energías de enlace de los metabolitos analizados de *Punica granatum L.*
- c) A los mejores metabolitos se les realizó una representación 2D de las interacciones presentes en el complejo proteína-ligando, a través del programa Discovery Estudio

### **4. Estudio ADME Tox:**

- a) Se predijeron las propiedades moleculares, la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los 44 metabolitos por medio de QikProp de Schrödinger Suite (QikProp, 2015). Los metabolitos fueron ingresados por lote al programa, en formato pdb. Y se obtuvieron los resultados en un documento con formato csv para posteriormente ser analizados. De ellos se eligió el peso molecular, el coeficiente de reparto agua/octanol, el porcentaje humano de absorción oral, la regla de 5 y la regla de 3 como propiedades significativas, las cuales fueron representadas.
- b) Se predijeron las propiedades de toxicidad por medio del laboratorio virtual ProTox-II (Banerjee, et al 2018). Para ello

los metabolitos fueron convertidos a formato mol, para ser ingresados al predictor. Se obtuvieron resultados de hepatotoxicidad, carcinogenicidad, clase de toxicidad y LD50, los cuales fueron analizados y representados.

## **5. Dinámica Molecular:**

- a) Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de los tres mejores complejos, seleccionados a partir de los resultados de acoplamiento molecular, ADME y toxicidad. Para ayudar a obtener más información sobre la proteína y los complejos acoplados en condiciones biológicas (Islam, et al., 2020).
- b) Se crearon los complejos en archivo pdb, uniendo las dimensiones moleculares de la proteína y el ligando.
- c) Se prepararon los archivos de entrada para las simulaciones, por medio de la plataforma web CHARMM-GUI (Brooks, et al., 1983). Para ello se generaron cajas de agua para los complejos, se crearon archivos de parámetros y topología. Y se protonó el complejo agregando iones de cloruro de potasio para que la carga total fuera de cero (Muralidharan, et al., 2020). Finalmente se eligió CHAMM36mm como campo de fuerza para los archivos de entrada para el simulador NAMD y se eligió una temperatura de 303.15 K para modelar el sistema.
- d) Por medio del programa NAMD y VMD se corrieron las simulaciones de dinámica molecular, realizadas a 10000 pasos de minimización y 10000 corridas cada 1 nanosegundo. Se guardaron las instantáneas según los pasos en la trayectoria de MD para su posterior análisis.
- e) Se analizaron las instantáneas por medio del programa VMD, se obtuvieron y graficaron las desviaciones cuadráticas

medias (RMSD) de los sistemas proteína-ligando, la función de distribución radial (FDR) entre los sistemas proteína-ligando y agua y los sistemas proteína y ligando. Y el número de enlaces de hidrógeno en los complejos proteína-ligando.

## VIII. RESULTADOS

Se analizó la energía de acoplamiento molecular de 44 metabolitos secundarios presentes en *Punica granatum L* con el sitio activo de las enzimas: proteasa principal COVID-19 en complejo con un inhibidor N3 (6LU7), ARN polimerasa dependiente del SARS-CoV-2 en complejo con cofactores en condición reducida (7BTF). Y en una enzima control, Dominio ApaG de FBx035 (5HDW) ya que esta proteína juega un papel muy crítico en la respuesta inmune del cuerpo humano, y actúa en condiciones en las que es necesaria una respuesta inflamatoria del sistema inmunitario, tal como una infección causada por virus (Krzysiak, et al., 2016).

Los resultados de las energías de acoplamiento molecular se presentan en la tabla 1, en donde se encontró que aproximadamente el 77% de los metabolitos analizados tienen una buena energía de acoplamiento ( $< -7$  KCal/mol) con las tres enzimas estudiadas. En donde Punicalagin, 2-O-Galloylpunicalin, 5-O-Galloylpunicacortein D, Punicacortein C, Punicacortein D y Punicalin4 presentaron una energía menor a  $-10$  KCal/mol en acoplamiento con la enzima 7BTF.

**Tabla 1.** Energías de acoplamiento molecular (docking) de ligandos con el sitio activo de las enzimas 6LU7, 5HDW y 7BTF

No.	Planta	Metabolito	Energía* 6LU7	Energía 5HDW	Energía 7BTF
1	<i>Punica granatum L.</i>	Luteolin	-7.4	-6.5	-7.2
2	<i>Punica granatum L.</i>	Naringin	-8.1	-7.1	-8.6
3	<i>Punica granatum L.</i>	pelletierine	-4.3	-4.5	-4.2
4	<i>Punica granatum L.</i>	Pseudopelletierine	-4.7	-5.2	-4.5
5	<i>Punica granatum L.</i>	Chlorogenic acid	-7.4	-7.1	-6.9
6	<i>Punica granatum L.</i>	Pseudopelletierine	-5.2	-5.2	-4.7
7	<i>Punica granatum L.</i>	Chrysanthemin	-9	-7.2	-7.6
8	<i>Punica granatum L.</i>	Pelargonin	-8.6	-6.7	-7.8

9	<i>Punica granatum L.</i>	Coumestrol	-7.7	-6.5	-6.7
10	<i>Punica granatum L.</i>	Nasutin B	-7.1	-6.6	-6.6
11	<i>Punica granatum L.</i>	Corilagin	-9.3	-7.3	-9.2
12	<i>Punica granatum L.</i>	Pedunculagin	-8	-7.2	-9.4
13	<i>Punica granatum L.</i>	Ursolic acid	-7.6	-6.7	-7.9
14	<i>Punica granatum L.</i>	Kaempferol	-7.4	-6.4	-6.4
15	<i>Punica granatum L.</i>	Cyanidin	-7.4	-6.3	-6.6
16	<i>Punica granatum L.</i>	Myrtilin	-9	-7	-7.5
17	<i>Punica granatum L.</i>	Delphin	-8.6	-6.5	-8
18	<i>Punica granatum L.</i>	Petunin	-9.	-6.5	-7.8
19	<i>Punica granatum L.</i>	Pelargonidin	-7.2	-6.3	-6.2
20	<i>Punica granatum L.</i>	Ellagic acid	-7.5	-6.9	-7.2
21	<i>Punica granatum L.</i>	Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl- (1->6)-glucoside	-8.5	-7.7	-7.9
22	<i>Punica granatum L.</i>	Isosakuranetin 7-alpha-L-arabinofuranosyl-( 1->6)-glucoside	-8.6	-7.4	-8.5
23	<i>Punica granatum L.</i>	5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavano ne-7-alpha-L-arabinofuranos yl-(1->6)-glucoside	-8.4	-7.5	-8.6
24	<i>Punica granatum L.</i>	Norhygrine	-4.2	-4.5	-4.3
25	<i>Punica granatum L.</i>	Maslinic acid	-7.8	-6.7	-8
26	<i>Punica granatum L.</i>	Methyl gallate	-5.3	-4.9	-5.2
27	<i>Punica granatum L.</i>	Oleanolic acid	-7.4	-6.5	-7.8
28	<i>Punica granatum L.</i>	Icariside D1	-7.6	-6.7	-7.1
29	<i>Punica granatum L.</i>	Punicanolic acid	-7.5	-6	-8
30	<i>Punica granatum L.</i>	Quinic acid	-5.3	-5.3	-5.5
31	<i>Punica granatum L.</i>	Punicalagin	-5.2	-7.3	-10.5
32	<i>Punica granatum L.</i>	2-O-Galloylpunicalin	-8.3	-7.2	-10.6

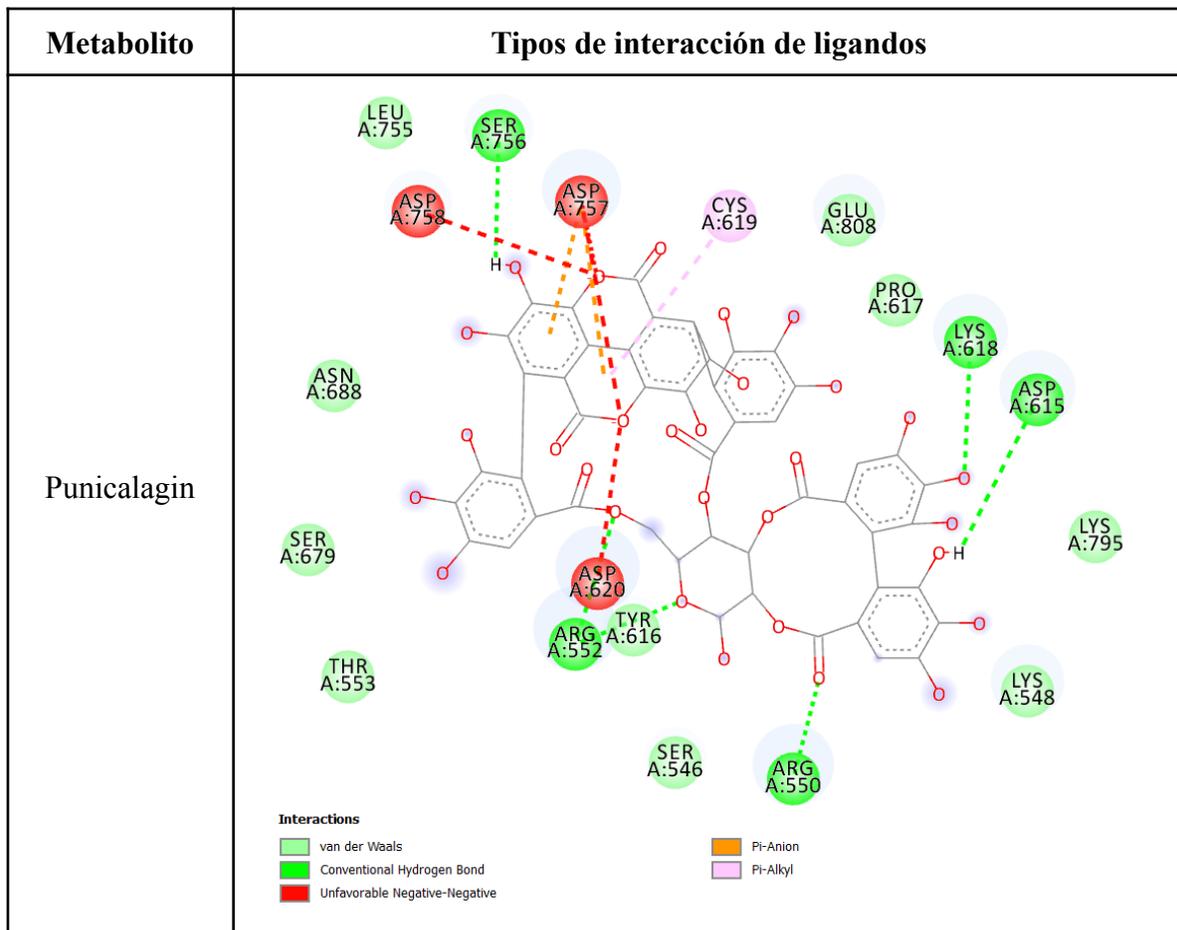
33	<i>Punica granatum L.</i>	5-O-Galloylpunicacortein D	-9.5	-7.1	-11.5
34	<i>Punica granatum L.</i>	Puicacortein A	-9	-6.1	-8.4
35	<i>Punica granatum L.</i>	Punicacortein B	-8.1	-6.8	-8.8
36	<i>Punica granatum L.</i>	Punicacortein C	-6.9	-7.1	-10.8
37	<i>Punica granatum L.</i>	Punicacortein D	-7.4	-7.8	-11.8
38	<i>Punica granatum L.</i>	Punicalin	-8.9	-7	-10.2
39	<i>Punica granatum L.</i>	Cyanidin 3,5-di-O-glucoside	-8.7	-6.6	-8.1
40	<i>Punica granatum L.</i>	Delphinidin 3-O-glucoside	-8.9	-7	-7.5
41	<i>Punica granatum L.</i>	Punicafolin	-9.2	-6.4	-9.4
42	<i>Punica granatum L.</i>	Tercatain	-8	-6.6	-9.1
43	<i>Punica granatum L.</i>	Pregnenolone	-6.9	-6.6	-6.5
44	<i>Punica granatum L.</i>	N-Methylpelletierine	-4.1	-4.9	-4.4

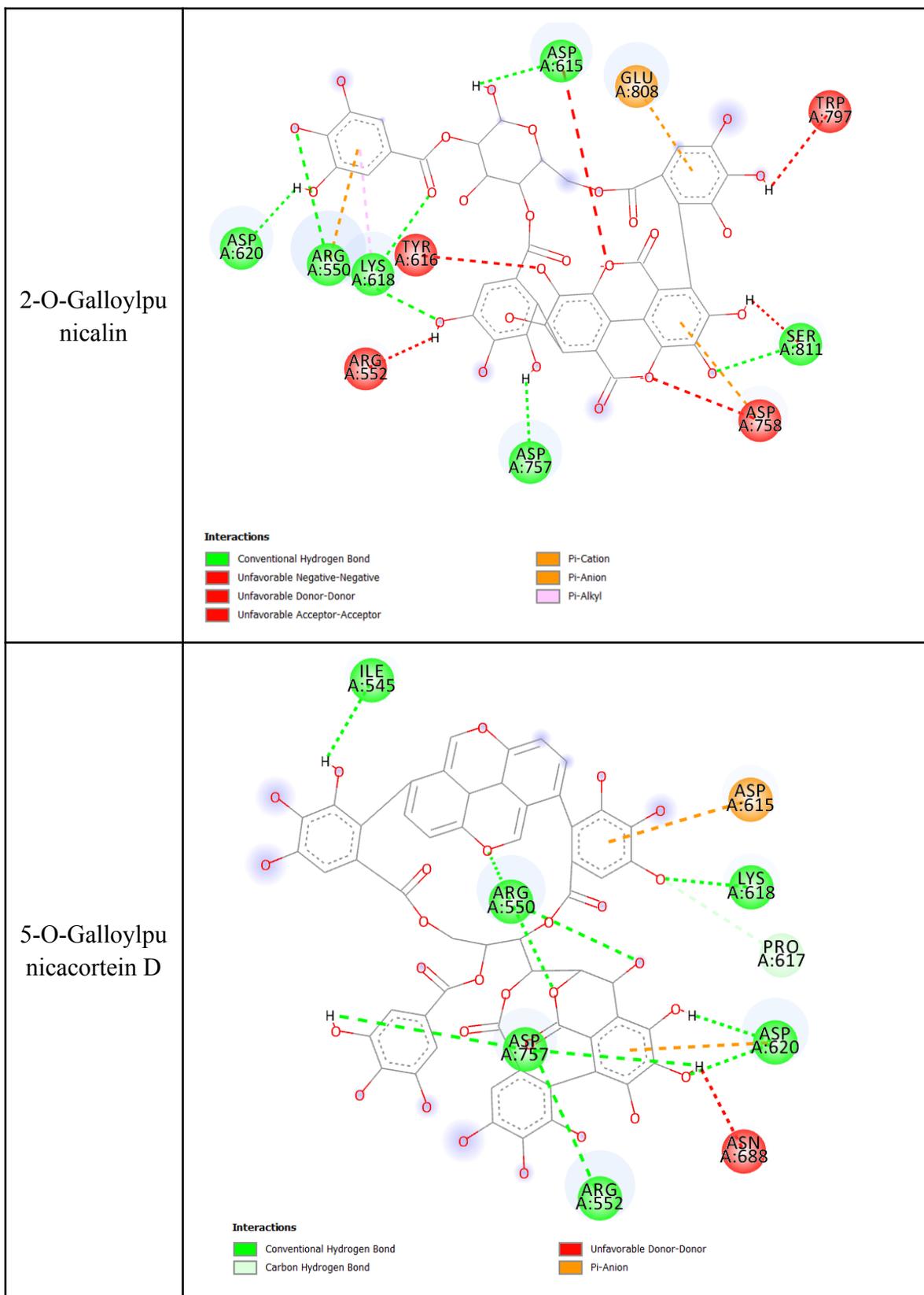
\* Energía de acoplamiento molecular representada en KCal/mol

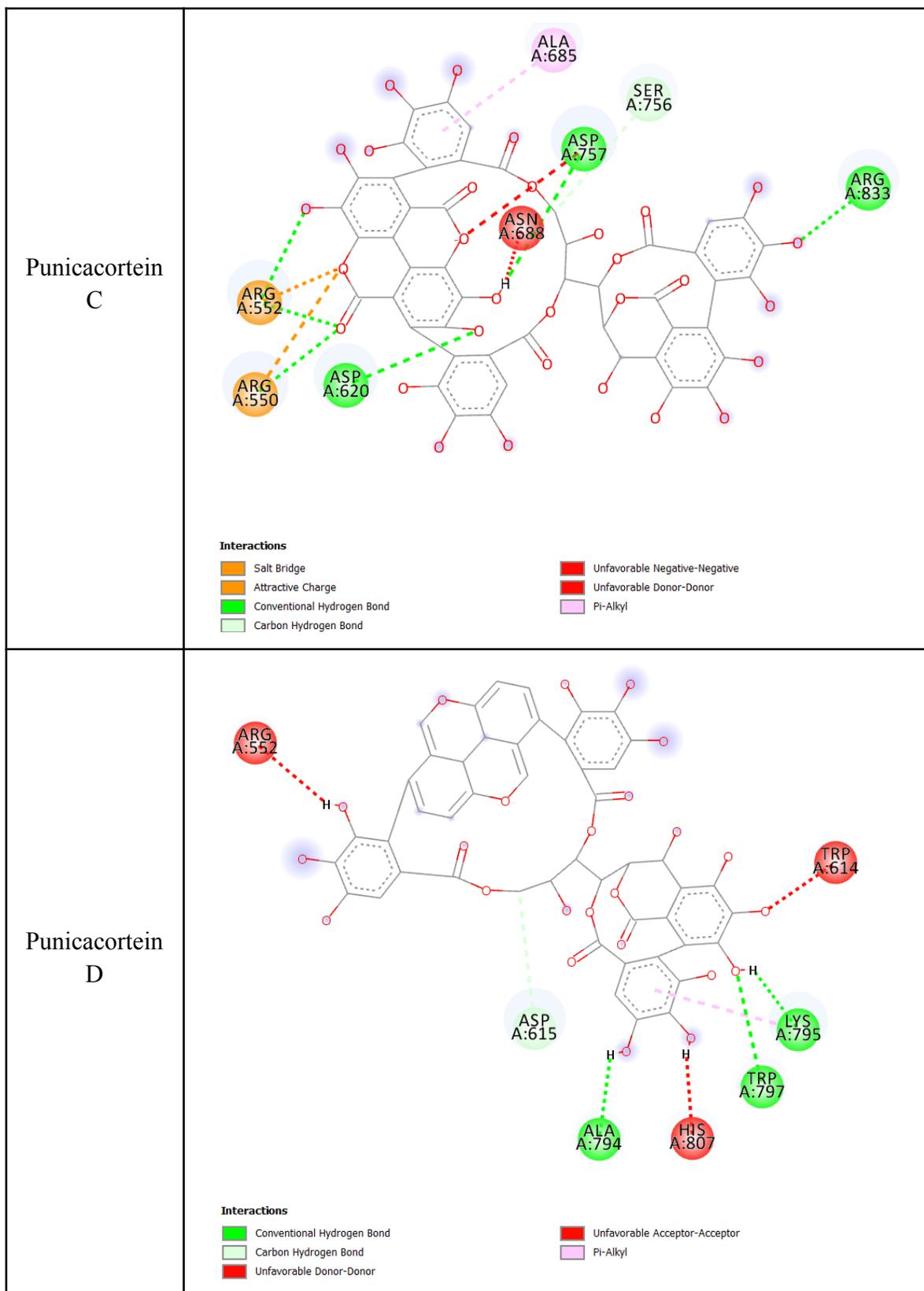
**Fuente:** Datos obtenidos en la Unidad de Química Computacional, edificio T10, USAC.

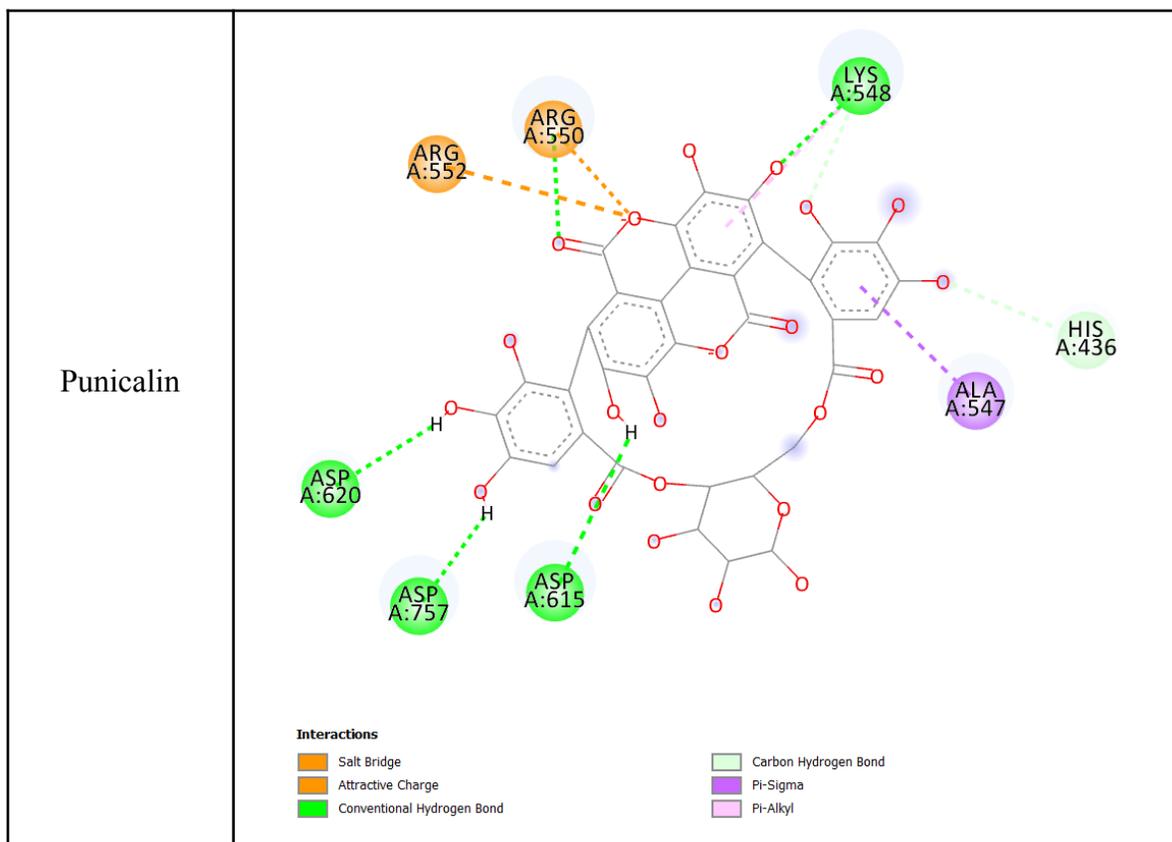
A través de los resultados de acoplamiento molecular, se clasificaron los 6 metabolitos con energía de acoplamiento menor a -10 KCal/mol con la enzima 7BTF. A los mismos, se les realizó un análisis para determinar los tipos de interacción que presentan con los aminoácidos de la proteasa, como se demuestra en la tabla 2. Se encontró que las interacciones se dieron específicamente con la cadena A de la enzima, siendo las interacciones más relevantes y mayoritarias, las provocadas por enlaces de hidrógeno convencionales y por fuerzas de Van der Waals. Estas interacciones se realizaron principalmente en los aminoácidos LYS618, ASP757 y ASP620.

**Tabla 2.** Tipos de interacción de ligandos (2D) con mejor energía de acoplamiento molecular con proteína 7BTF









**Fuente:** Datos obtenidos en la Unidad de Química Computacional, edificio T10, USAC.

Los resultados relevantes y significativos de la predicción de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los metabolitos secundarios se resumen en la tabla 3. En la misma se presentan el peso molecular y los valores de QPlogPo/w como propiedades moleculares. Para el caso de las propiedades farmacéuticas se detalla el porcentaje humano de absorción oral, la cual generalmente se relaciona con la absorción humana oral. La regla de 5 que indica el número de violaciones a la regla de Lipinski, cuyas normas son: Peso molecular < 500, QPlogPo/w < 5, donante HB  $\leq$  5 y aceptor HB  $\leq$  5. Y la regla de tres que indica el número de violaciones a la regla de Jorgensen, cuyas normas son: QPLogS > -5.7, QP PCaco > 22 nm/s y número de metabolitos primarios < 7 (Schrödinger, 2015). No se lograron obtener resultados ADME para 13 de los 44 metabolitos analizados. Mientras que para el caso de la regla de 5, 13 metabolitos no presentaron ninguna violación, y dos

presentan solo una violación. En la regla de 3, se obtuvieron casi los mismos resultados de violaciones de la regla de 5. Para el caso de los 13 metabolitos que no presentaron ninguna violación, 8 de los mismos presentan una absorción intestinal por arriba del 75%.

**Tabla 3.** Resultados de ADME de los metabolitos secundarios presentes en *Punica granatum L.*

Metabolito	Peso molecular (g/mol)	QPlogPo/w*	Porcentaje humano de absorción oral	Regla de 5	Regla de 3
Luteolin	286.24	0.964	62.277	0	0
Naringin	580.541	-1.504	0	3	2
pelletierine	141.213	1.008	83.281	0	0
Pseudopelletierine	153.224	0.274	80.88	0	0
Chlorogenic acid	354.313	-0.266	17.02	1	1
Pseudopelletierine	153.224	0.02	79.05	0	0
Chrysanthemim	449.9	ND	ND	ND	ND
Pelargonin	595.5	ND	ND	ND	ND
Coumestrol	268.225	1.251	76.677	0	0
Nasutin B	344.277	0.713	75.179	0	0
Corilagin	634.46	-2.994	0	3	2
Pedunculagin	784.55	-3.537	0	3	2
Ursolic acid	456.707	5.969	93.537	1	1
Kaempferol	286.24	0.946	64.632	0	0
Cyanidin	287.24	ND	ND	ND	ND
Myrtilin	580.541	-1.005	0.977	3	2
Delphin	624.551	-1.506	0	3	2
Petunin	302.197	-1.322	35.152	0	1
Pelargonidin	271.24	ND	ND	ND	ND

Ellagic acid	302.19	ND	ND	ND	ND
Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl 1-(1->6)-glucoside	624.5	ND	ND	ND	ND
Isosakuranetin 7-alpha-L-arabinofuranosyl -(1->6)-glucoside	580.5	ND	ND	ND	ND
5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone 7-alpha-L-arabinofuranosyl -(1->6)-glucoside	582.514	-2.225	0	3	2
Norhygrine	127.186	0.519	77.274	0	0
Maslinic acid	472.707	5.047	80.684	1	1
Methyl gallate	184.148	-0.216	62.833	0	0
Oleanolic acid	456.707	6.06	94.368	1	1
Icariside D1	416.424	-1.058	40.832	1	1
Punicanolic acid		ND	ND	ND	ND
Quinic acid	192.168	-1.258	38.908	0	1
Punicalagin	1084.7	ND	ND	ND	ND
2-O-Galloylpunicalin	934.6	ND	ND	ND	ND
5-O-Galloylpunicacortein D	1142.8	ND	ND	ND	ND
Punicacortein A	634.46	-3.894	0	3	2
Punicacortein B	634.46	-3.979	0	3	2
Punicacortein C	1084.731	-6.264	0	3	2
Punicacortein D	990.751	-2.199	0	3	2
Punicalin	782.535	-4.839	0	3	2
Cyanidin 3,5-di-O-glucoside	611.5	ND	ND	ND	ND
Delphinidin 3-O-glucoside	465.4	ND	ND	ND	ND

Punicafolin	938.672	-4.109	0	3	2
Tercatain	786.566	-3.129	0	3	2
Pregnenolone	316.483	3.663	100	0	0
N-Methylpelletierine	155.239	0.641	85.333	0	0

\* Coeficiente de reparto agua/octanol

\*\* ND = No disponible

**Fuente:** Datos obtenidos en la Unidad de Química Computacional, edificio T10, USAC.

Los resultados de toxicidad evaluada en todos los metabolitos se resumen en la tabla 4. Para determinar la misma se presenta la toxicidad aguda (roedor), representada como la dosis letal media (LD50) y la clase de toxicidad. Así como la hepatotoxicidad como toxicidad de órganos y carcinogenicidad como otro criterio de valoración toxicológica. La clase de toxicidad está definida de acuerdo al sistema globalmente armonizado de clasificación de etiquetado de productos químicos (GHS), en donde:

- Clase I: fatal en caso de ingestión ( $LD50 \leq 5$ )
- Clase II: fatal en caso de ingestión ( $5 < LD50 \leq 50$ )
- Clase III: tóxico por ingestión ( $50 < LD50 \leq 300$ )
- Clase IV: nocivo por ingestión ( $300 < LD50 \leq 2000$ )
- Clase V: puede ser nocivo si se ingiere ( $2000 < LD50 \leq 5000$ )
- Clase VI: no tóxico ( $LD50 > 5000$ ) (Banerjee, et al., 2018).

Se observa que ninguno de los 44 presenta toxicidad menor a clase III, mientras que 16 presentan entre clase III y IV. Favorablemente los otros 28 tienen una clase de toxicidad entre V y VI. Para el caso de carcinogenicidad y hepatotoxicidad la mayoría no presentó actividad. Sin embargo, 2 presentaron actividad para hepatotoxicidad, 6 solo para carcinogenicidad y otros dos presentaron actividad tanto para carcinogenicidad como hepatotoxicidad. Y de estos, Luteolin y Cyanidin, presentan una clasificación V.

**Tabla 4.** Resultados de Toxicidad de los metabolitos secundarios presentes en *Punica granatum L.*

Metabolito	Clase de toxicidad	LD50* mg/kg	Hepatotoxicidad		Carcinogenicidad	
			Actividad	Probabilidad	Actividad	Probabilidad
Luteolin	V	3919	Inactivo	0.69	Activo	0.68
Naringin	V	2300	Inactivo	0.81	Inactivo	0.9
pelletierine	IV	338	Inactivo	0.68	Inactivo	0.7
Pseudopelletierine	IV	338	Inactivo	0.9	Inactivo	0.62
Chlorogenic acid	V	5000	Inactivo	0.72	Inactivo	0.68
Pseudopelletierine	IV	338	Inactivo	0.85	Inactivo	0.66
Chrysanthemin	V	3200	ND**	ND	ND	ND
Pelargonin	VI	5530	ND	ND	ND	ND
Coumestrol	III	138	Inactivo	0.83	Activo	0.59
Nasutin B	IV	1100	Inactivo	0.63	Inactivo	0.51
Corilagin	V	2260	Inactivo	0.85	Inactivo	0.72
Pedunculagin	V	2190	Inactivo	0.85	Inactivo	0.65
Ursolic acid	IV	2000	Activo	0.52	Activo	0.57
Kaempferol	IV	500	Inactivo	0.69	Activo	0.64
Cyanidin	V	5000	Inactivo	0.72	Activo	0.61
Myrtillin	V	5000	Inactivo	0.76	Inactivo	0.86
Delphin	V	5000	Inactivo	0.84	Inactivo	0.84
Petunin	V	5000	Inactivo	0.78	Inactivo	0.78
Pelargonidin	V	3919	Inactivo	0.71	Inactivo	0.69
Ellagic acid	IV	2991	Inactivo	0.83	Activo	0.59
Quercetin 3,4'-dimethyl ether 7-alpha-L-Arabinofuranosyl-(1->6)-glucoside	V	5000	ND	ND	ND	ND

Isosakuranetin 7-alpha-L-arabinofuranosy l-(1->6)-glucoside	V	2300	Inactivo	0.84	Inactivo	0.82
5,7,3',4'-Tetrahydroxyflava none 7-alpha-L-arabinofuranosy l-(1->6)-glucoside	VI	12000	ND	ND	ND	ND
Norhygrine	IV	933	Inactivo	0.76	Inactivo	0.67
Maslinic acid	IV	2000	Inactivo	0.65	Activo	0.63
Methyl gallate	IV	1700	Inactivo	0.62	Inactivo	0.62
Oleanolic acid	IV	2000	Activo	0.52	Activo	0.52
Icariside D1	III	648	Inactivo	0.94	Inactivo	0.89
Punicanolic acid	IV	2400	Activo	0.59	Inactivo	0.68
Quinic acid	VI	9800	Inactivo	0.8	Inactivo	0.73
Punicalagin	V	5000	Inactivo	0.85	Inactivo	0.65
2-O-Galloylpunicalin	V	5000	Inactivo	0.85	Inactivo	0.71
5-O-Galloylpunicacortein D	V	2170	Inactivo	0.71	Inactivo	0.61
Punicacortein A	V	2170	Inactivo	0.87	Inactivo	0.78
Punicacortein B	V	2170	Inactivo	0.87	Inactivo	0.8
Punicacortein C	IV	1230	Inactivo	0.79	Inactivo	0.64
Punicacortein D	V	2170	Inactivo	0.73	Inactivo	0.6
Punicalin	V	5000	Inactivo	0.85	Inactivo	0.65
Cyanidin 3,5-di-O-glucoside	V	5000	Inactivo	0.84	Inactivo	0.84
Delphinidin 3-O-glucoside	V	5000	Inactivo	0.82	Inactivo	0.84
Punicafolin	V	2260	Inactivo	0.84	Inactivo	0.65
Tercatain	V	2260	Inactivo	0.84	Inactivo	0.65
Pregnenolone	VI	8800	Activo	0.61	Inactivo	0.56
N-Methylpelletierine	IV	338	Inactivo	0.93	Inactivo	0.63

\* Dosis letal media

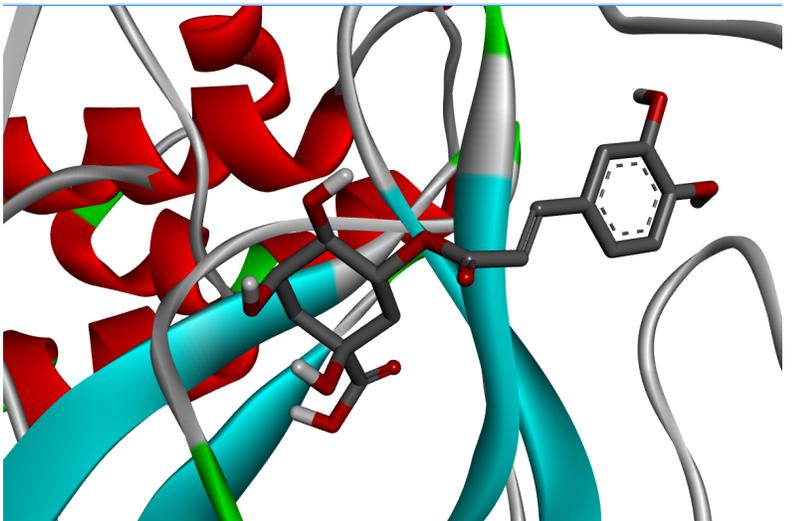
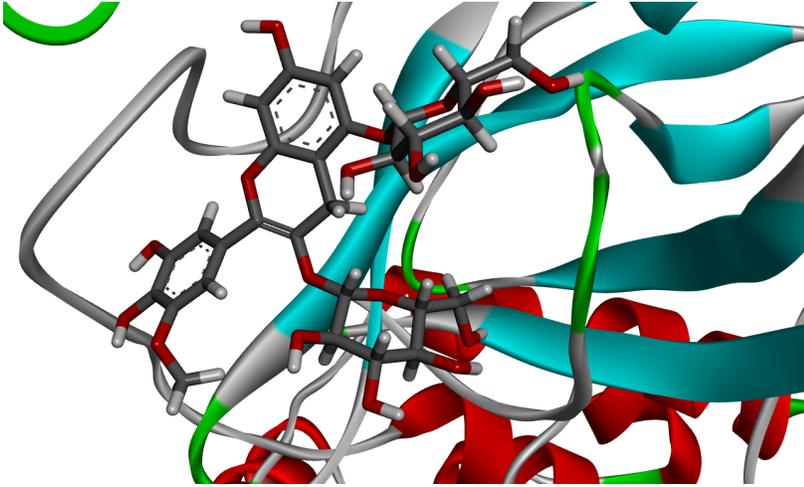
\*\* ND = No disponible

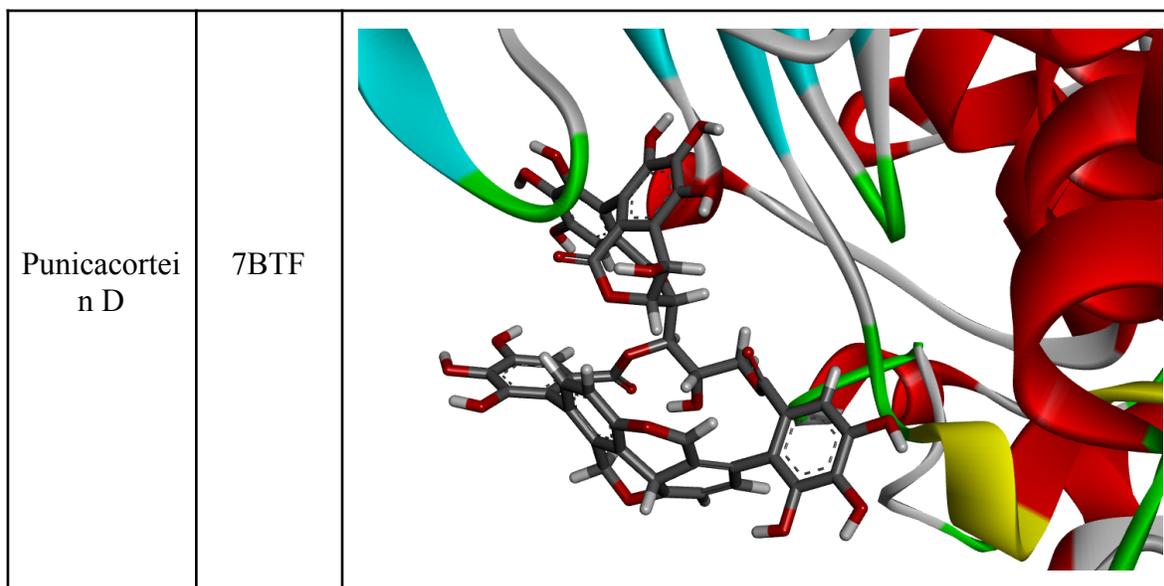
**Fuente:** Datos obtenidos en la Unidad de Química Computacional, edificio T10, USAC.

Tras un análisis minucioso de los metabolitos estudiados, conforme a los valores de energía de acoplamiento molecular, y los obtenidos en ADME y toxicidad, se clasificaron los mejores candidatos a ser modelados por dinámica molecular. Se observó que la mayoría de los que tienen una o ninguna violación a la regla de tres y de cinco poseen energías de acoplamiento menor a -8 KCal/mol, con excepción de Petunin, el cual presentó una energía de acoplamiento con la enzima 6LU7 de -9.1 KCal/mol. Además, debido a que la mayoría de los metabolitos que presentan buenos valores de acoplamiento no arrojaron resultados de toxicidad o ADME, se descartaron como candidatos para ser simulados con dinámica molecular.

Aparte de clasificar a Petunin como un candidato, se eligió a Chlorogenic acid ya que solo tiene una violación a las dos reglas, posee una toxicidad muy baja y sus resultados de energía de acoplamiento molecular tanto para 6LU7 como para 7BTF, son menores a -7 KCal/mol; y a pesar de tener una baja absorción, sigue siendo un buen candidato. La mayoría de los metabolitos con buenos resultados de acoplamiento molecular, no obtuvieron resultados óptimos de toxicidad y ADME, e incluso algunos resultaron tener potencial de desarrollar cáncer y hepatotoxicidad. Por lo que como último candidato se clasificó a Punicacortein D, el cual tiene buenos resultados de toxicidad por lo que se puede clasificar como no tóxico y a pesar de que tiene tres violaciones a la regla de 5 y dos a la regla de 3, tiene el mejor resultado de acoplamiento molecular frente a los demás metabolitos, por lo que su estudio más profundo sería de gran utilidad para la investigación, los cuales se representan en la tabla 5.

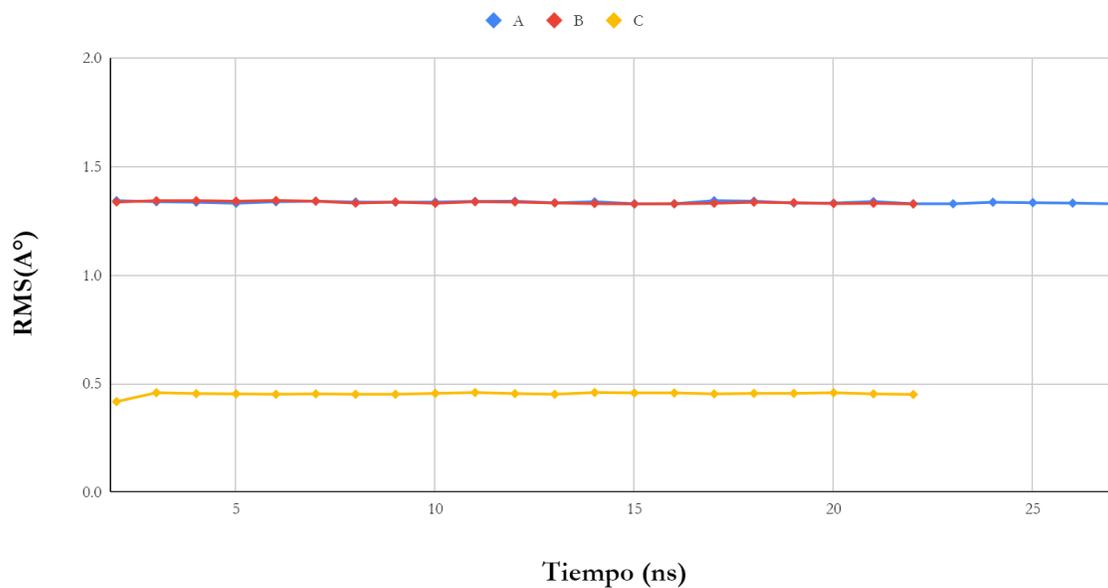
**Tabla 5.** Metabolitos clasificados según los resultados de ADME-Tox y acoplamiento molecular, para realización de Dinámica Molecular y Mecánica Cuántica/ Mecánica Molecular .

Metabolito secundario	Proteína	Complejo
Chlorogenic acid	6LU7	
Petunin	6LU7	



Para el caso de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos proteína ligando, se realizó un análisis e interpretación de los distintos resultados de trayectoria tanto de las proteínas como de los complejos. Primeramente se analizaron las desviaciones cuadráticas medias (RMSD) de los átomos de carbono alfa de todos los sistemas, para lograr detectar su estabilidad. La desviación cuadrática media es una medida de similitud de las coordenadas atómicas, que permite establecer el período de equilibrio en las conformaciones de las dinámicas macromoleculares (Sargsyan, 2017). Como se observa en la imagen 1, el complejo de Punicacortein D y 7BTF presenta el RMSD más bajo que otros complejos, indicando la mayor estabilidad. Para el caso de los sistemas A y B se observa un RMSD similar, por lo que la proteína permanece estable a pesar de que cambie el ligando. De forma general se observa que no hay fluctuación de los valores a lo largo de la trayectoria, y permanecen constantes en los tres sistemas.

**Imagen 1:** RMSD de los sistemas proteína-ligando analizados



A= Chlorogenic acid y 6LU7

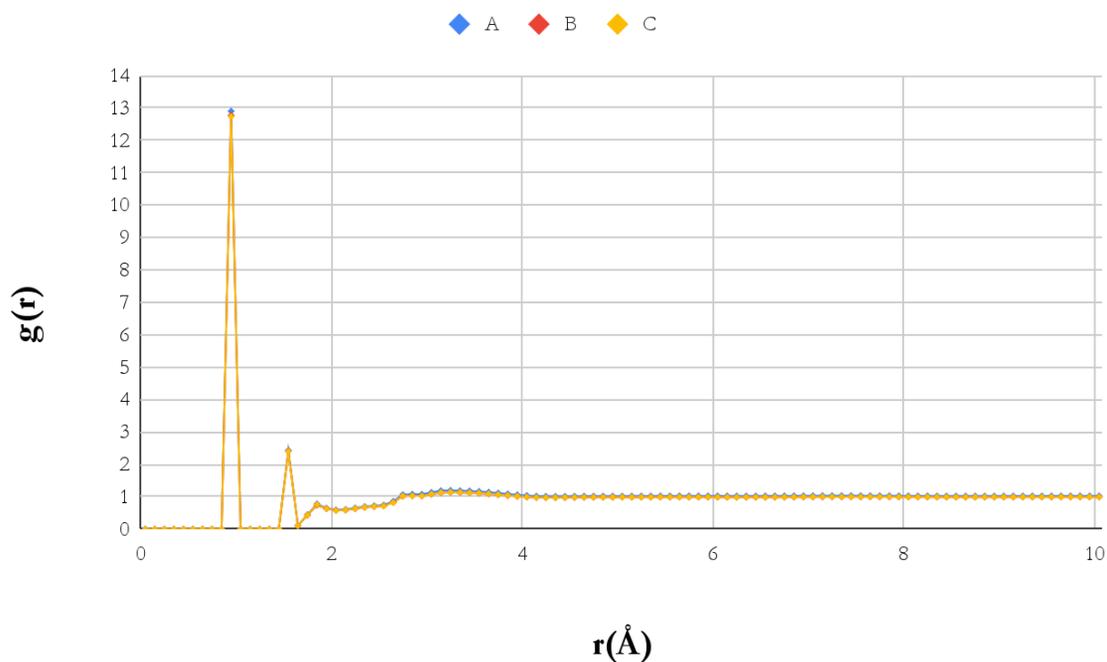
B = Petunin y 6LU7

C = Punicacortein D y 7BTF

**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en la Unidad de Química Computacional, edificio T10, USAC.

Se realizó otro análisis para evaluar la función de distribución radial (FDR), la cual mide el promedio de partículas que se encuentran a una distancia ( $r$ ;  $r + dr$ ) de cada partícula, lo cual nos permite estudiar cómo se agrupa cada tipo de partículas en el sistema. Como se observa en la imagen 2, la FDR casi permanece constante en los tres sistemas.

**Imagen 2:** Función de distribución radial entre los sistemas proteína-ligando y agua



A= Chlorogenic acid y 6LU7

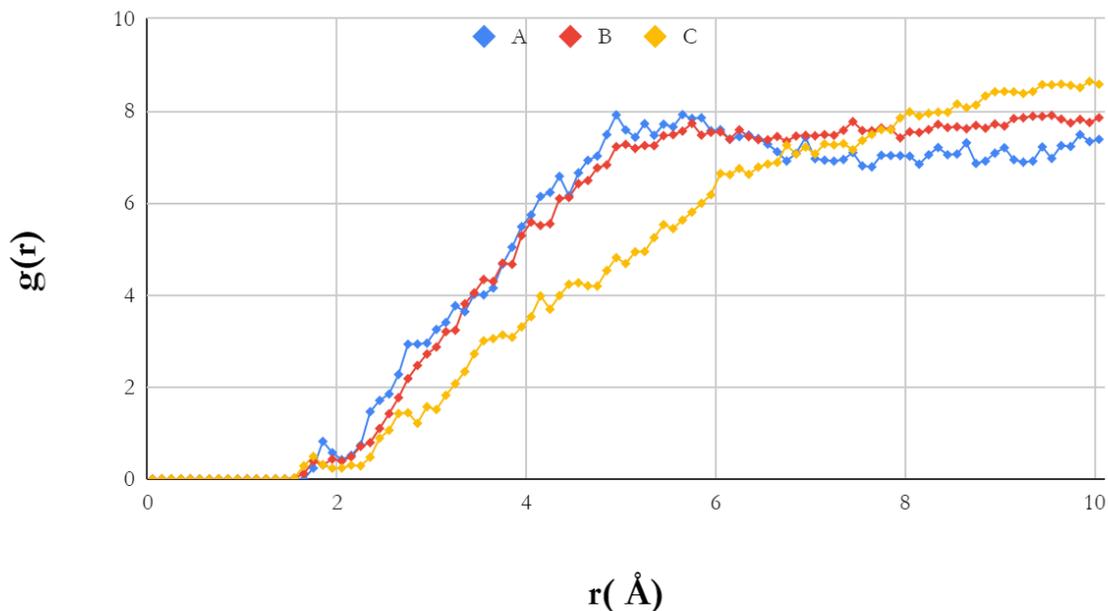
B = Petunin y 6LU7

C = Punicacortein D y 7BTF

**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en la Unidad de Química Computacional, edificio T10, USAC.

Un caso distinto ocurre cuando el FDR se compara entre la proteína y el ligando, en donde se observa que antes de los 2 Å, estos empiezan a variar significativamente. Se observa que la estructura tridimensional de la proteína 6LU7 varía poco al cambiar el ligando, con algunas diferencias, especialmente a partir de los 5 Å. Para el caso del sistema C, se observa que este aumenta su valor de  $g(r)$  a medida que aumenta su distancia en Å, lo que indica que aumenta la interacción con las moléculas del ligando.

**Imagen 3:** Función de distribución radial entre los sistemas proteína y el ligando

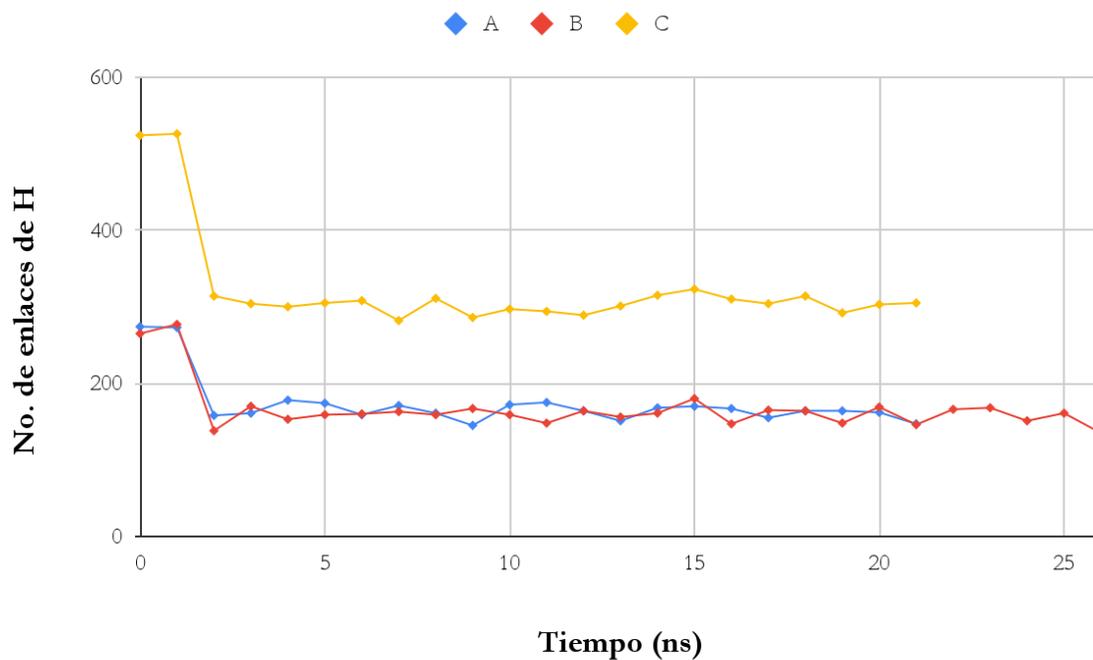


A= Chlorogenic acid y 6LU7  
 B = Petunin y 6LU7  
 C = Punicacortein D y 7BTF

**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en la Unidad de Química Computacional, edificio T10, USAC.

Como otra forma de analizar la estabilidad conformacional se calculó el número de enlaces de hidrógeno intermoleculares en el complejo proteína-ligando, ya que se sabe que estos contribuyen a la estabilidad conformacional del sistema. Se observa el número de enlaces de hidrógeno más alto (una media aproximada de 300) para el complejo entre Punicacortein D y 7BTF, indicando nuevamente una mayor estabilidad para el mismo. Mientras que los complejos A y B con la proteína 6LU7 tienen un menor número de enlaces durante la simulación, los cuales tienen una tendencia casi idéntica. Sin embargo, se debe de resaltar que al inicio de la trayectoria todos los complejos poseen un mayor número de enlaces de hidrógeno, pero a partir del tercer paso estos bajan y permanecen constantes.

**Imagen 4:** Número de enlaces de hidrógeno en los complejos proteína-ligando



A= Chlorogenic acid y 6LU7

B = Petunin y 6LU7

C = Punicacortein D y 7BTF

**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en la Unidad de Química Computacional, edificio T10, USAC.

## IX. DISCUSIÓN

Las simulaciones de acoplamiento molecular permiten predecir las formas de unión dominantes entre el ligando y la proteína, proponiendo una suposición de cómo los ligandos inhiben a la proteína, logrando así que se clasifiquen los ligandos con mejores resultados de inhibición (Islam, et al., 2020). Estas formas de unión, son generalmente causadas por fuerzas intermoleculares, tales como fuerzas de Van Der Waals o puentes de hidrógeno, ayudando así a entender mejor la causa raíz de dichas inhibiciones.

Para este estudio, se obtuvieron los resultados de acoplamiento molecular de 44 metabolitos secundarios presentes en *Punica Granatum L*, obteniéndose energías de acoplamiento molecular favorables en los metabolitos según las tres enzimas analizadas, tal como se observa en la tabla 1. Observándose una relación de resultados con respecto a la enzima control 5HDW, ya que para un mejor acoplamiento con 7BTF o 6LU7, la interacción con la enzima control mejoraba y viceversa. Mani y colaboradores señalan que las moléculas pequeñas más prometedoras para la inhibición de coronavirus son clasificadas como polifenoles, tal como Quercetin (Mani, et al., 2020), y para este caso, se observó que de los 44 metabolitos analizados, 30 pertenecen a este grupo que contienen un anillo fusionado conjugado, de los cuales la mayoría tienen buenos resultados de energía de acoplamiento.

Los 6 metabolitos con los resultados más bajos de energía de acoplamiento molecular, son polifenoles. Estos tienen una estructura química muy similar, difiriendo en algunos casos por la estereoisomería de los enlaces, y ambos poseen un anillo largo de 11 a 16 carbonos con la presencia de éster y alcoholes, unidos a otros aromáticos de la estructura. Tal como se observa en la tabla 2, los mejores resultados fueron con la estructura de la ARN polimerasa dependiente de ARN del virus COVID-19 (7BTF), específicamente con la cadena A de la misma. Aunque, los resultados para la proteasa (6LU7) acoplados a los mejores metabolitos, igualmente arrojaron resultados buenos (Tabla 1). Para la proteasa se

observaron resultados de acoplamiento molecular similares a los realizados por Islam y colaboradores en diferentes fitoquímicos (Islam. et al., 2020)

Tras analizar los tipos de interacción que presentan los metabolitos que obtuvieron mejores resultados de acoplamiento con la polimerasa (tabla 3) se encontró que principalmente estas se daban por enlaces de hidrógeno y otras fuerzas de Van Der Waals. Este tipo de interacción es predominante ya que en los metabolitos se encuentran mayoritariamente grupos hidroxilos, observándose para este caso que Punicalagin es el que posee más interacciones de este tipo. Por otro lado la interacción se dió específicamente con la cadena A de la polimerasa, ya que en la misma se encuentra el sitio activo, y principalmente en los aminoácidos LYS618, ASP757 y ASP620. Esto pudo ser ya que tanto la lisina como el ácido aspártico poseen un índice bajo de hidropatía (anexo 4), indicando así que ambos son hidrofílicos y tienen una alta afinidad por compuestos polares, facilitando así la formación de puentes de hidrógeno e interacciones con otras fuerzas de Vaan der Waals.

En el estudio de ADME (tabla 3), no se lograron obtener resultados para 13 de los 44 metabolitos analizados, lo cual pudo deberse a la falta de información necesaria en los archivos de entrada o a la complejidad de las moléculas causando que las propiedades moleculares no se pudieran calcular (Schrödinger, 2015). Para 6 metabolitos con mejor energía de acoplamiento (tabla 2), no se obtuvieron resultados para Punicalagin, 2-O-Galloylpunicalin y 5-O-Galloylpunicacortein D, y para el caso de Punicalin y Punicacortein C y D se obtuvo que tienen 0% de absorción humana oral.

Una de las principales razones por las cuales los metabolitos con mejores resultados de acoplamiento molecular no obtuvieron resultados favorables en el estudio ADME/TOX, fue su gran tamaño molecular ( $< 500$  g/mol) y valores de donante HB y aceptor HB mayor a 5, provocando así 3 violaciones a la regla de 5. El donante HB es un número estimado de

enlaces que se donarían por el soluto a moléculas de agua en una solución acuosa, mientras que el aceptor HB, es el número estimado de enlaces de hidrógeno que serían aceptados por el soluto de las moléculas de agua en una solución acuosa (Schrödinger, 2015). Y dado que la mayoría de los metabolitos son muy hidrofílicos, y por ende tienen facilidad de formar puentes de hidrógeno, también pueden llegar a interactuar fácilmente con moléculas de agua, por lo que el fármaco puede no llegar a penetrar las membranas celulares necesarias para acceder al torrente sanguíneo y llegar a la proteína de interés (Shouksmith, 2022), provocando así una poca o baja inhibición.

Por otro lado, las moléculas con un alto peso molecular, no son consideradas como fármacos ideales, no solo porque su aislamiento o síntesis conlleva grandes retos, sino que pueden llegar a no ser económicamente viables. Es recomendable según Lipinski, que para que sea un fármaco ideal, no deben de existir más de dos violaciones para que el fármaco tuviera una biodisponibilidad oral adecuada. Aunque, se han encontrado medicamentos antivirales que rompen la regla de 5 y que actúan sobre algunas proteínas que requieren ligandos de alto peso molecular y que han abordado muy bien la necesidad médica (Leeson y Young, 2015), por lo que no se debe descartar que su facultad farmacológica sea atractiva.

En los resultados de toxicidad (tabla 4) se observa nuevamente que fue imposible obtener los resultados completos para 4 de los ligandos. Probablemente porque el laboratorio virtual no pudo hacer la similitud molecular al no disponer de un modelo similar o por el tamaño grande de los ligandos (ProTox-II, 2021). De forma general se obtuvo que ningún metabolito se caracteriza como tóxico, y solo algunos pueden llegar a ser nocivos, mientras que la mayoría se clasifican como no tóxicos. Lamentablemente se encontró actividad ya sea de carcinogenicidad, hepatotoxicidad o ambos, en diez de los 44 metabolitos analizados. Y de estos 10, la mayoría obtuvieron buenos valores de acoplamiento molecular

(energía < -7 KCal/mol) tanto en 7BTF como en 6LU7, solo a excepción de Pregnenolone que a pesar de eso, sus energías de acoplamiento no son malas.

La hepatotoxicidad al ser una causa importante de insuficiencia hepática aguda, es una de las principales razones de la retirada de fármacos en el mercado (Banerjee, 2018), por lo que su predicción en el estudio de fármacos es de vital importancia, así como las medidas de carcinogenicidad. Aunque la predicción de carcinogenicidad del programa utilizado tiene una precisión equilibrada del 81,24 %, esta depende de las bases de datos sobre las que está diseñado el programa y se debe de considerar de que a su vez existen clasificaciones de compuestos en diferentes grupos estructurales que pueden tener un mayor riesgo de inducir cáncer, tales como compuestos similares a las aflatoxinas, compuestos azoxi y compuestos N-nitrosos (Kroes, et al., Banerjee, 2014). Por lo que cualquier similitud de las moléculas de estudio con compuestos catalogados como cancerígenos, concluye en la clasificación de los metabolitos como riesgosos para el consumo humano.

La información obtenida permite proporcionar datos necesarios para el diseño de inhibidores prometedores y eficaces, por lo que se clasificaron tres sistemas proteína-ligado, seguros y con propiedades inhibitorias contra SARS-CoV-2 para realizar simulaciones de dinámica molecular, los cuales se encuentran representados en la tabla 5. De los 6 metabolitos clasificados con mejor resultado de acoplamiento molecular (tabla 2), Punicacortein D fue el único elegido para realizar simulaciones de dinámica molecular ya que de los demás no se lograron obtener resultados completos de ADME/Tox, o estos no fueron favorables. Se observó que los metabolitos elegidos poseían un porcentaje bajo de absorción oral humana, al igual que la mayoría de los demás metabolitos analizados, lo cual pudo estar ligado al alto peso molecular de los ligandos.

Las simulaciones de dinámica molecular de los tres complejos analizados fueron realizadas con éxito, con la finalidad de examinar el cambio en la dinámica y la estabilidad conformacional del sistema proteína-ligando. Sin embargo, se obtuvieron pocos pasos del recorrido de la simulación, ya que se debe de considerar que los complejos, tanto en el tamaño de la proteína como del ligando, tenían un tamaño molecular muy alto, lo que pudo causar que estos se redujeran de gran forma. Así mismo, las moléculas de agua que se encontraban en los complejos proteína-ligando pudieron ocasionar un ruido aleatorio en el sistema. Y ya que algunas moléculas de agua podrían ser sólo moléculas de hidrógeno enlazados a átomos en la superficie de la proteína, pueden interferir en los resultados del modelo utilizado.

En los resultados de desviación cuadrática media (RMSD) (imagen ), se obtuvo que el complejo de Punicacortein D y 7BTF tuvieron los valores más bajos de RMSD, por lo que los carbonos alfa de ligando no inducen a variaciones significativas de conformación, dando estabilidad a la proteína. Para el caso de los otros dos sistemas, la similitud fue alta al tratarse de la misma proteína, por lo que a pesar de haber diferencias estructurales entre Chlorogenic acid y Petunin, no causó variación significativa en la conformación de la proteína.

Para los resultados de Función de Distribución Radial (FDR), analizada primeramente entre los sistemas proteína-ligando y agua (imagen 2), se observa una variación insignificante lo cual se pudo deber a la comparación con las moléculas de agua, brindando estabilidad al sistema y permitiendo que el este sea homogéneo. Para tener otro punto de referencia, se evaluó la FDR solamente entre la proteína y el ligando (imagen 3), logrando determinar cambios de distancia entre estos dos compuestos a lo largo de la trayectoria de la simulación. Aunque fue poca, la variación entre los dos sistemas de 6LU7, podría ser consecuencia de pequeñas alteraciones en la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína, probablemente inducida por cambios en las orientaciones de las cadenas laterales de los

residuos cercanos al ligando, al interactuar de distinta forma. Para el caso del complejo de Punicacortein D y 7BTF, se obtuvo un crecimiento continuo de valores de  $g(r)$  conforme aumentaba  $r(\text{\AA})$ . Ya que probablemente disminuye la distancia relativa entre la proteína y el ligando, al existir una interacción creciente entre ambos, indicando una mayor estabilidad.

El número de enlaces de hidrógeno en los complejos proteína-ligando (imagen 4), muestra que al inicio de la trayectoria, hay un mayor número de enlaces de hidrógeno en todos los sistemas antes de permanecer constantes. Lo cual coincide con el aumento de la función de distribución radial entre los sistemas proteína y el ligando. Por lo que puede ser que al inicio de la simulación la distancia entre las moléculas permitiera un mayor número de enlaces de hidrógeno, y a medida que esta distancia disminuye, sucede lo mismo con los enlaces.

A pesar de que Punicacortein D es un ligando grande, los resultados de acoplamiento molecular apuntan a que tiene una excelente inhibición contra la proteasa del COVID-19. Y además los resultados de dinámica molecular, señalan que el complejo en sí posee una buena estabilidad. Aunque este último obtuvo los mejores resultados, los obtenidos en la dinámica molecular para los complejos entre 6LU7 con Chlorogenic acid y Petunin también son buenos y tienen mejores resultados en el estudio ADME, por lo que pueden llegar a tener un buen comportamiento farmacológico.

## X. CONCLUSIONES

1. El 77% de los metabolitos secundarios estudiados, presentes en *Punica Granatum*, *L.* presentan un buen potencial de inhibición contra la proteasa principal y la polimera del SARS-CoV-2.
2. La mayoría de los metabolitos secundarios de *Punica Granatum L.* Presentan buenos resultados ADME y son considerados como no tóxicos. Sin embargo la mayoría fallan para ser considerados como fármacos ideales según los modelos analizados, al poseer un alto peso molecular.
3. Los sistemas de Chlorogenic acid y Petunin en complejo con 6LU7 muestran una buena estabilidad a lo largo de la trayectoria de la dinámica molecular, y poca variación entre ambos resultados. A pesar de que ambas moléculas son diferentes, ambas tienen grupos funcionales similares, lo cual pudo ocasionar resultados de estabilidad similares.
4. La molécula que presentó mejores resultados de estabilidad, e inhibición segura contra el SARS-CoV-2, fue Punicacortein. Sus resultados de toxicidad lo clasifican como seguro y los obtenidos en la dinámica molecular señalan que en complejo con 7BTF posee una buena estabilidad, por lo que no se descarta que pueda tener una buena actividad farmacológica.

## XI. RECOMENDACIONES

- Continuar con una investigación de forma experimental, para lograr el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en *Punica Granatum L.* para determinar su potencial farmacoterapéutico y demostrar la eficacia y seguridad de los mismos.
- Continuar con la investigación *in silico*, por medio de un estudio de Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (QM/MM) para lograr entender de mejor forma el mecanismo de acción entre la proteína y el ligando con mejores resultados. Y evaluar la mecánica molecular de otros metabolitos con buenos resultados de acoplamiento molecular.
- Realizar un análisis de la relación cuantitativa estructura actividad (QSAR) de los complejos modelados en dinámica molecular para profundizar en la actividad química y biológica de los sistemas.

## XII. REFERENCIAS

Aanouz, I., Belhassan, A., El-Khatabi, K., Lakhlifi, T., El-Idrissi, M., & Bouachrine, M. (2020). Moroccan Medicinal plants as inhibitors against SARS-CoV-2 main protease: Computational investigations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1758790>

Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, A., Sanchez Palomino, S. and Carrasco, L. (1997). Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytother. Res.*, 11: 198-202. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199705\)11:3<198::AID-PTR78>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199705)11:3<198::AID-PTR78>3.0.CO;2-L)

Ahmed, S. F., Quadeer, A. A., & McKay, M. R. (2020). Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v12030254>

Alqahtani S. (2017). In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 13(11), 1147–1158. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1389897>

Angamuthu, D., Purushothaman, I., Kothandan, S., & Swaminathan, R. (2019). Antiviral study on Punica granatum L., Momordica charantia L., Andrographis paniculata Nees, and Melia azedarach L., to Human Herpes Virus-3. *European Journal of Integrative Medicine*, 28, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.04.008>

Aranda, J., & Orozco, M. (2020). RNA-Dependent RNA Polymerase From SARS-CoV-2. Mechanism Of Reaction And Inhibition By Remdesivir. *BioRxiv*, 2020.06.21.163592. <https://doi.org/10.1101/2020.06.21.163592>

Arunkumar, J., & Rajarajan, S. (2018). Study on antiviral activities, drug-likeness and molecular docking of bioactive compounds of Punica granatum L. to Herpes simplex virus - 2 (HSV-2). *Microbial Pathogenesis*, 118, 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.052>

Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., & Preissner, R. (2018). ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic acids research*, 46(W1), W257–W263. <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>

Bedoya, L. M., Álvarez, A., Bermejo, M., González, N., Beltrán, M., Sánchez-Palomino, S., Cruz, S. M., Gaitán, I., del Olmo, E., Escarcena, R., García, P. A., Cáceres, A., San Feliciano, A., & Alcamí, J. (2008). Guatemalan plants extracts as virucides against HIV-1 infection. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.10.006>

Bloom, B. R., Nowak, G. J., & Orenstein, W. (2020). “When Will We Have a Vaccine?”-*Understanding Questions and Answers about Covid-19 Vaccination*. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2020.06.048>

Bouchentouf S, Missoum N. Identification of Compounds from Nigella Sativa as New Potential Inhibitors of 2019 Novel Coronavirus (Covid-19): Molecular Docking Study. *ChemRxiv*. Cambridge: Cambridge Open Engage; 2020 <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12055716.v1>

B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus: CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations, *J. Comp. Chem.* 4, 187-217 (1983)

Brown, S., Tauler, R., & Walczak, B. (2010). *Comprehensive Chemometrics*. In *Comprehensive Chemometrics*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-28356-5>

Cao, B., Wang, Y., Wen, D., Liu, W., Wang, J., Fan, G., Ruan, L., Song, B., Cai, Y., Wei, M., Li, X., Xia, J., Chen, N., Xiang, J., Yu, T., Bai, T., Xie, X., Zhang, L., Li, C., ... Wang, C. (2020). A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe covid-19. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001282>

Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2020). *Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19)*. In StatPearls.

Chandel, V., Raj, S., Rathi, B., & Kumar, D. (2020). In Silico Identification of Potent COVID-19 Main Protease Inhibitors from FDA Approved Antiviral Compounds and Active Phytochemicals through Molecular Docking: A Drug Repurposing Approach. *Preprint*. <https://doi.org/10.20944/preprints202003.0349.v1>

Chatterjee, A., Cutler, S. J., Doerksen, R. J., Khan, I. A., & Williamson, J. S. (2014). Discovery of thienoquinolone derivatives as selective and ATP non-competitive CDK5/p25 inhibitors by structure-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(22), 6409–6421. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.09.043>

Chilamakuri, R., & Agarwal, S. (2021). COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/cells10020206>

De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., & Cavalli, A. (2016). Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(9), 4035–4061. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01684>

Divya, M., Vijayakumar, S., Chen, J., Vaseeharan, B., & Durán-Lara, E. F. (2020). South Indian medicinal plants can combat deadly viruses along with COVID-19? - A review. *Microbial Pathogenesis*, 148, 104277. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104277>

Duman, A. D., Ozgen, M., Dayisoğlu, K. S., Erbil, N., & Durgac, C. (2009). Molecules Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. *Molecules*, 14, 1808–1817. <https://doi.org/10.3390/molecules14051808>

Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>

Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P. (2006). *Metodología de la investigación (4a)*. McGraw-Hill.

Huang, R., Xia, M., Nguyen, D.-T., Zhao, T., Sakamuru, S., Zhao, J., Shahane, S. A., Rossoshek, A., & Simeonov, A. (2016). Tox21Challenge to Build Predictive Models of Nuclear Receptor and Stress Response Pathways as Mediated by Exposure to Environmental Chemicals and Drugs. *In Frontiers in Environmental Science* (Vol. 3). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fenvs.2015.00085>

Islam, R., Parves, M. R., Paul, A. S., Uddin, N., Rahman, M. S., Mamun, A. Al, Hossain, M. N., Ali, M. A., & Halim, M. A. (2020). A molecular modeling approach to identify effective antiviral phytochemicals against the main protease of SARS-CoV-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1761883>

Ita, K. (2021). Coronavirus Disease (COVID-19): Current Status and Prospects for Drug and Vaccine Development. *In Archives of Medical Research* (Vol. 52, Issue 1, pp. 15–24). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.09.010>

Jassim, S. A. A., & Najji, M. A. (2003). Novel antiviral agents: A medicinal plant perspective. *In Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x>

Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., Zhang, B., Li, X., Zhang, L., Peng, C., Duan, Y., Yu, J., Wang, L., Yang, K., Liu, F., Jiang, R., Yang, X., You, T., Liu, X., ... Yang, H. (2020). Structure of Mpro from COVID-19 virus and discovery of its inhibitors. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>

Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, 9(9), 646–652. <https://doi.org/10.1038/nsb0902-646>

Khaerunnisa, S., Kurniawan, H., Awaluddin, R., & Suhartati, S. (2020). Potential Inhibitor of COVID-19 Main Protease ( M pro ) from Several Medicinal Plant

Compounds by Molecular Docking Study. *Preprints*.

<https://doi.org/10.20944/preprints202003.0226.v1>

Kim, J. H., Marks, F., & Clemens, J. D. (n.d.). Looking beyond COVID-19 vaccine phase 3 trials. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01230-y>

Kroes, R., Renwick, A. G., Cheeseman, M., Kleiner, J., Mangelsdorf, I., Piersma, A., Schilter, B., Schlatter, J., van Schothorst, F., Vos, J. G., & Würtzen, G. (2004). Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 42(1), 65–83. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2003.08.006>

Krzysiak, T.C., Chen, B.B., Lear, T., Mallampalli, R.K. and Gronenborn, A.M. (2016), Crystal structure and interaction studies of the human FBxo3 ApaG domain. *FEBS J*, 283: 2091-2101. <https://doi.org/10.1111/febs.13721>

Kuenemann, M. A., Spears, P. A., Orndorff, P. E., & Fourches, D. (2018). In silico Predicted Glucose-1-phosphate Uridyltransferase (GalU) Inhibitors Block a Key Pathway Required for *Listeria* Virulence. *Molecular Informatics*. <https://doi.org/10.1002/minf.20180000>

Kufer, J., Heinrich, M., Förther, H., & Pöll, E. (2005). Historical and modern medicinal plant uses - the example of the Ch'orti' Maya and Ladinos in Eastern Guatemala. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1211/jpp.57.9.0008>

Lee, S., Lee, I. H., Kim, H. joong, Chang, G. S., Chung, J. E., & No, K. T. (2002). The PreADME Approach: Web-based program for rapid prediction of physico-chemical, drug absorption and drug-like properties. *Euro QSAR 2002 - Designing Drugs and Crop Protectants: Processes Problems and Solutions*, 418–420.

Leeson, P. D., & Young, R. J. (2015). Molecular Property Design: Does Everyone Get It?. *ACS medicinal chemistry letters*, 6(7), 722–725. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00157>

Levine., I. N. (1996). Fisicoquímica. McGraw-Hill.

Lewars, E. G. (2016). *Computational chemistry: Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics: Third Edition 2016*. Springer.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-30916-3>

Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)

Lurie, N., Sharfstein, J. M., y Goodman, J. L. (2020). The Development of COVID-19 Vaccines Safeguards Needed. *Medical Association, A.*, 324(5)  
<https://doi.org/10.1001/jama.2020.12461>

Lubin, J. H., Zardecki, C., Dolan, E. M., Lu, C., Shen, Z., Dutta, S., Westbrook, J. D., Hudson, B. P., Goodsell, D. S., Williams, J. K., Voigt, M., Sarma, V., Xie, L., Venkatachalam, T., Arnold, S., Alfaro Alvarado, L. H., Catalfano, K., Khan, A., McCarthy, E., ... Burley, S. K. (2020). Evolution of the SARS-CoV-2 proteome in three dimensions (3D) during the first six months of the COVID-19 pandemic. *BioRxiv*, 2020.12.01.406637. <https://doi.org/10.1101/2020.12.01.406637>

Mani, J. S., Johnson, J. B., Steel, J. C., Broszczak, D. A., Neilsen, P. M., Walsh, K. B., & Naiker, M. (2020). Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses: A review. *In Virus Research* (Vol. 284, p. 197989). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197989>

Mattoli S. (2021). Filling the Gap Until Full Vaccine Deployment in the War on Coronavirus Disease-19. *Infectious diseases and therapy*, 10(1), 27–34.  
<https://doi.org/10.1007/s40121-020-00394-3>

Mayer-Kuckuk, F. (2020). Bis zu 100.000 Impfungen am Tag sollen möglich sein - Deutschland - Badische Zeitung. Recuperado de:

<https://www.badische-zeitung.de/bis-zu-100-000-impfungen-am-tag-sollen-moeglich-sein> (Accedido febrero 2021)

Moradi, M. T., Karimi, A., Shahrani, M., Hashemi, L., & Ghaffari-Goosheh, M. S. (2019). Anti-Influenza Virus Activity and Phenolic Content of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel Extract and Fractions. *Avicenna journal of medical biotechnology*, *11*(4), 285–291.

Muralidharan, N., Sakthivel, R., Velmurugan, D., & Gromiha, M. M. (2020). Computational studies of drug repurposing and synergism of lopinavir, oseltamivir and ritonavir binding with SARS-CoV-2 protease against COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*(7), 2673–2678. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1752802>

Nelson, D., Cox, M. *Principles of Biochemistry*. (2013). W. H. Freeman and Company.

OMS. (2021). Enfermedad por el coronavirus (COVID-19): Vacunas. Onu. [https://www.who.int/es/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/es/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines) (Accedido, abril 2021).

Paltiel, A. D., Zheng, A., & Schwartz, J. L. (2021). Speed Versus Efficacy: Quantifying Potential Tradeoffs in COVID-19 Vaccine Deployment. *Annals of Internal Medicine*, *174*(4), 568–570. <https://doi.org/10.7326/M20-7866>

Pandit, M. (2020). In silico studies reveal potential antiviral activity of phytochemicals from medicinal plants for the treatment of COVID-19 infection. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-22687/v1>

PDB. (2020). *3d structure viewers*. Descargado de <https://www.rcsb.org/news?year=2020&article=5e74d55d2d410731e9944f52&feature=true>

Ponce, G. (2019). *Evaluación in silico de los polifenoles de la rosa de jamaica (hibiscus sabdaria) y diseño de derivados como inhibidores de la enzima hmg co-a reductasa. Guatemala*. [Tesis de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala] <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QF1531.pdf>

PubChem. (2020). *Open chemistry data base*. Descargado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

QikProp, version 4.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015

Rafieian-kopaei, M., Saeedi, M., Asgari, S., Karimi, A., & Moradi, M.-T. (2013). Antiviral activity of *Quercus persica* L.: High efficacy and low toxicity. *Advanced Biomedical Research*. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.109722>

Richman, D., Whitley R., Hayden, F. (2016). *Clinical Virology, 4th Edition*. Wiley.

Rosales, P. F., Marinho, F. F., Gower, A., Chiarello, M., Canci, B., Roesch-Ely, M., Paula, F. R., & Moura, S. (2019). Bio-guided search of active indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*: Antitumour activity, toxicity in silico and molecular modelling studies. *Bioorganic Chemistry*, 85, 66–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.12.016>

Sánchez-Lamar, A., Fonseca, G., Fuentes, J. L., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Perticone, P., Degrassi, F., & De Salvia, R. (2007). Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(3), 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.011>

Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(4), 1518–1524. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00028>

Sayed, A. M., Khattab, A. R., AboulMagd, A. M., Hassan, H. M., Rateb, M. E., Zaid, H., & Abdelmohsen, U. R. (2020). Nature as a treasure trove of potential

anti-SARS-CoV drug leads: a structural/mechanistic rationale. *RSC Advances*, 10(34), 19790–19802. <https://doi.org/10.1039/D0RA04199H>

Schrödinger Release. (2021). *QikProp*, Schrödinger. Recuperado de: <https://www.schrodinger.com/products/qikprop> (Accedido, julio 2021).

Schrödinger, LLC. (2015). *QikProp 4.4 User Manual*. Schrödinger Press.

Senn, H. M., & Thiel, W. (2009). QM/MM methods for biomolecular systems. *In Angewandte Chemie - International Edition*. <https://doi.org/10.1002/anie.200802019>

Tahir ul Qamar, M., Alqahtani, S. M., Alamri, M. A., & Chen, L. L. (2020). Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.009>

Tahir ul Qamar, M., Maryam, A., Muneer, I., Xing, F., Ashfaq, U. A., Khan, F. A., Anwar, F., Geesi, M. H., Khalid, R. R., Rauf, S. A., & Siddiqi, A. R. (2019). Computational screening of medicinal plant phytochemicals to discover potent pan-serotype inhibitors against dengue virus. *Scientific Reports*, 9(1), 1433. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38450-1>

Thuy, B. T. P., My, T. T. A., Hai, N. T. T., Hieu, L. T., Hoa, T. T., Thi Phuong Loan, H., Triet, N. T., Anh, T. T. Van, Quy, P. T., Tat, P. Van, Hue, N. Van, Quang, D. T., Trung, N. T., Tung, V. T., Huynh, L. K., & Nhung, N. T. A. (2020). Investigation into SARS-CoV-2 Resistance of Compounds in Garlic Essential Oil. *ACS Omega*, 5(14), 8312–8320. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00772>

Venkatesh, S., & Lipper, R. A. (2000). Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *Journal of pharmaceutical sciences*, 89(2), 145–154. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200002\)89:2<145::AID-JPS2>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200002)89:2<145::AID-JPS2>3.0.CO;2-6)

Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W., & Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research*, 30(3), 269–271. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>

Xu, X., Yu, C., Qu, J., Zhang, L., Jiang, S., Huang, D., Chen, B., Zhang, Z., Guan, W., Ling, Z., Jiang, R., Hu, T., Ding, Y., Lin, L., Gan, Q., Luo, L., Tang, X., & Liu, J. (2020). Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. <https://doi.org/10.1007/s00259-020-04735-9>

Yang, F., Zhang, Y., Tariq, A., Jiang, X., Ahmed, Z., Zhihao, Z., Idrees, M., Azizullah, A., Adnan, M., & Bussmann, R. W. (2020). Food as medicine: A possible preventive measure against coronavirus disease (COVID-19). *In Phytotherapy research : PTR*. <https://doi.org/10.1002/ptr.6770>

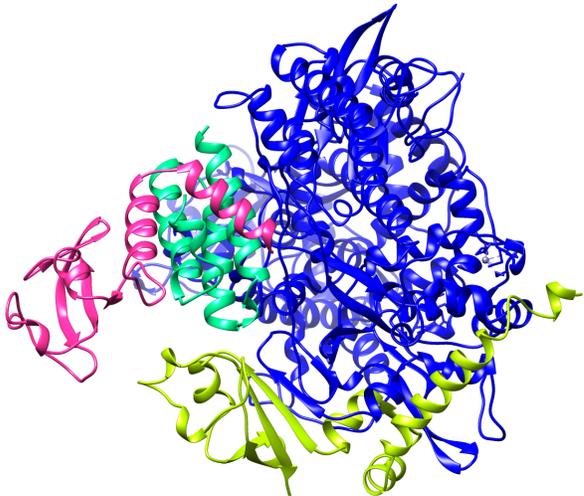
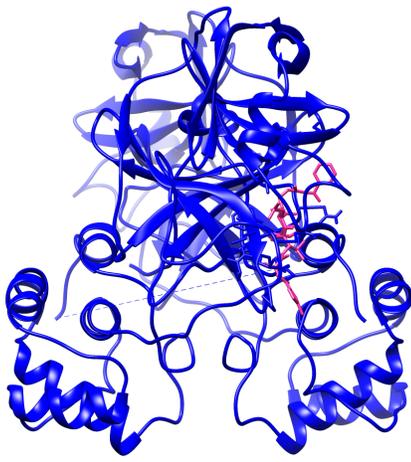
Yeni, Y., Supandi, S., & Merdekawati, F. (2018). In silico toxicity prediction of 1-phenyl-1-(quinazolin-4-yl) ethanol compounds by using Toxtree, pkCSM and preADMET. *Pharmaciana*, 8(2), 205-216. doi:<http://dx.doi.org/10.12928/pharmaciana.v8i2.9508>

Zhou, P., Li, Z., Xie, L., An, D., Fan, Y., Wang, X., Li, Y., Liu, X., Wu, J., Li, G., & Li, Q. (2021). Research progress and challenges to coronavirus vaccine development. *Journal of Medical Virology*, 93(2), 741–754. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmv.26517>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

### XIII. ANEXOS

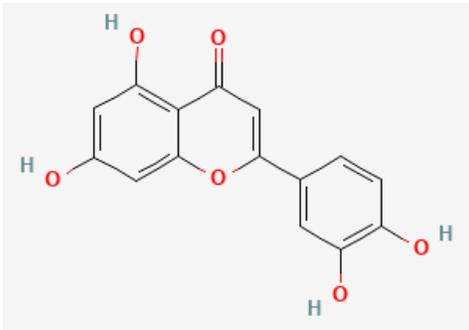
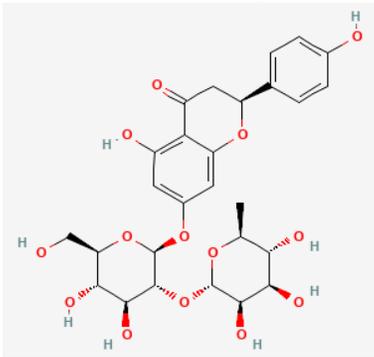
#### Anexo 1. Proteínas del SARS-CoV-2 modeladas

ARN polimerasa dependiente del SARS-CoV-2 en complejo con cofactores en condición reducida (7BTF)	Proteasa principal COVID-19 en complejo con un inhibidor N3 (6LU7)
	

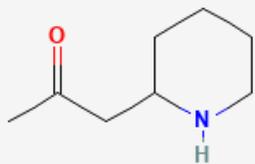
Cadena A: azul; Cadena B: verde; Cadena C: turquesa; Cadena D: rosado.

**Fuente:** Datos obtenidos en la Unidad de Química Computacional, edificio T10, USAC.

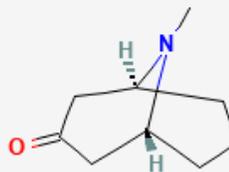
#### Anexo 2: Estructuras 2D de los metabolitos analizados:

<p style="text-align: center;">1. Luteolin</p> 	<p style="text-align: center;">2. Naringin</p> 
--	---

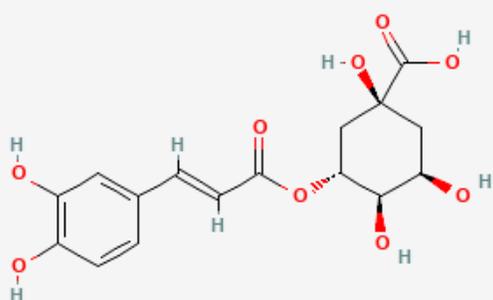
3. Pelletierine



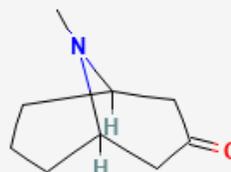
4. Pseudopelletierine



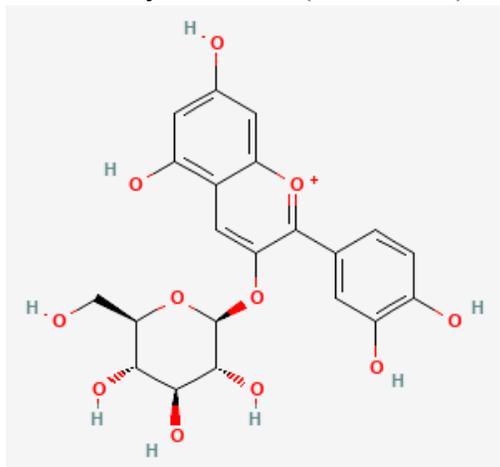
5. Chlorogenic acid



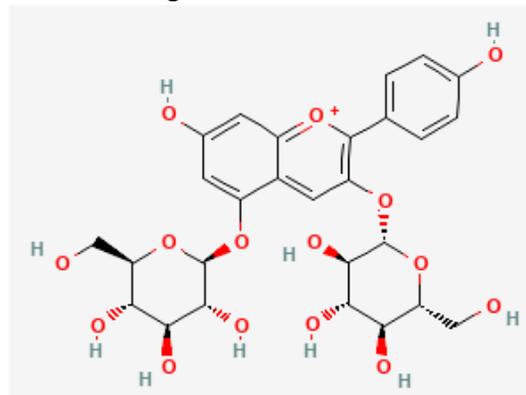
6. Pseudopelletierine



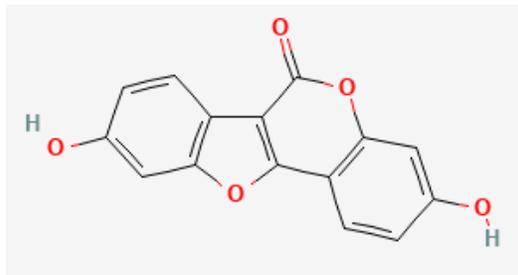
7. Chrysanthemin (Kuromanin)



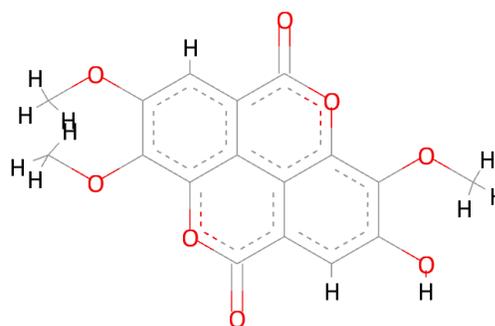
8. Pelargonin



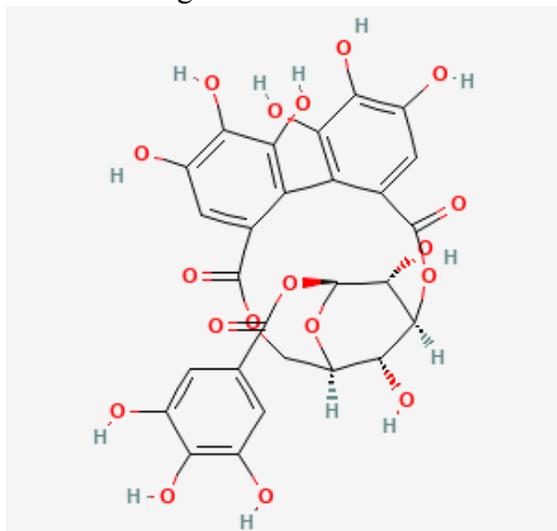
9. Coumestrol



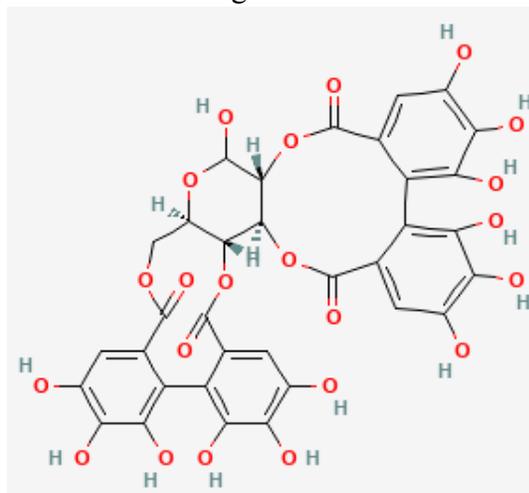
10. Nasutin B



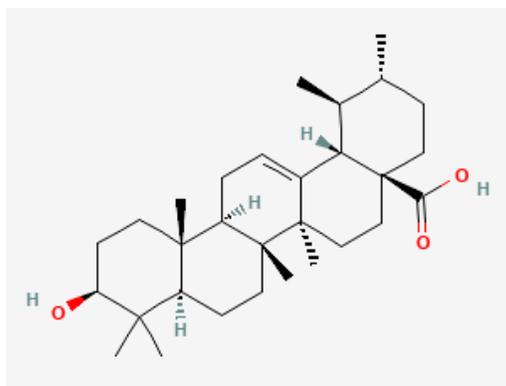
11. Corilagin



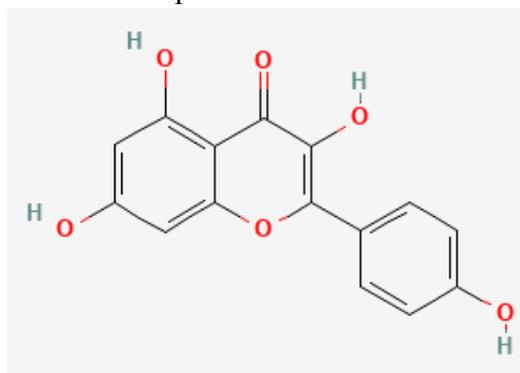
12. Pedunculagin



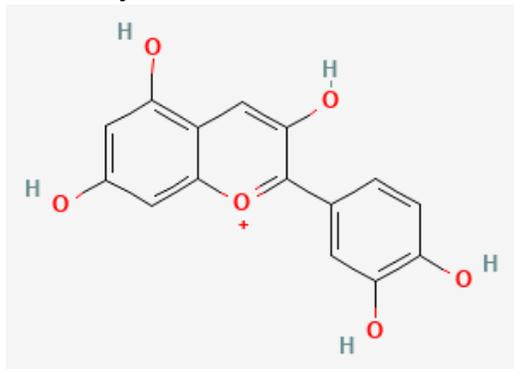
13. Ursolic acid



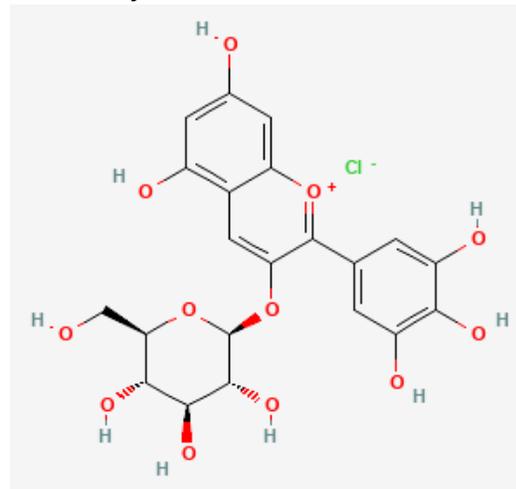
14. Kaempferol



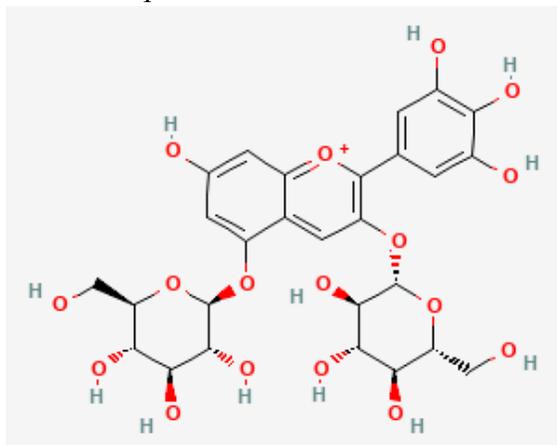
15. Cyanidin



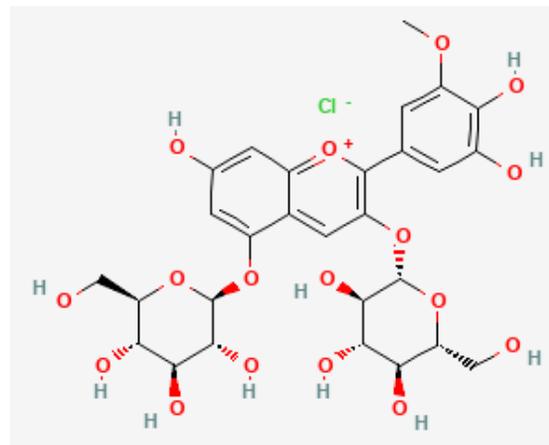
16. Myrtillin



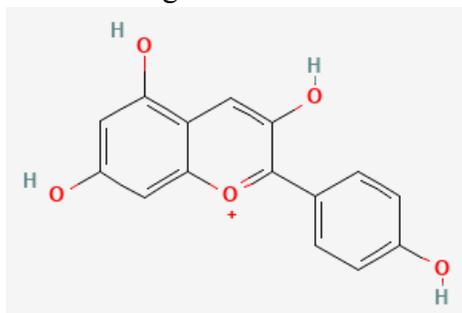
17. Delphin



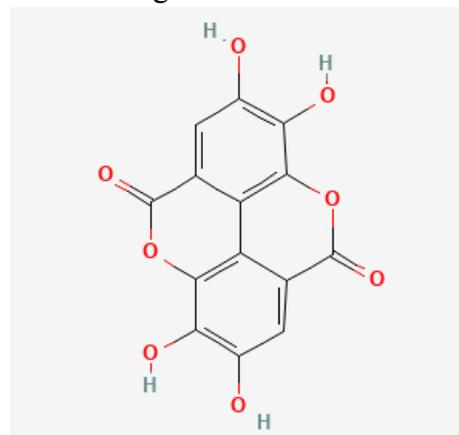
18. Petunin



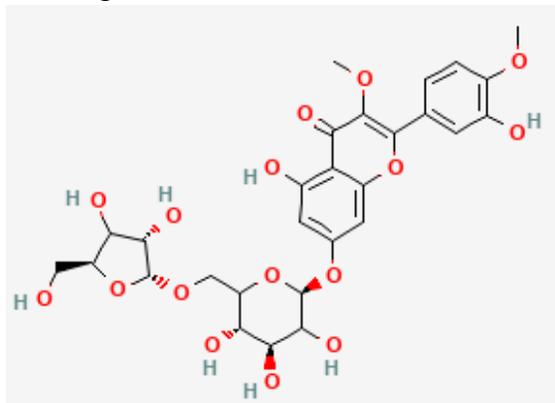
19. Pelargonidin



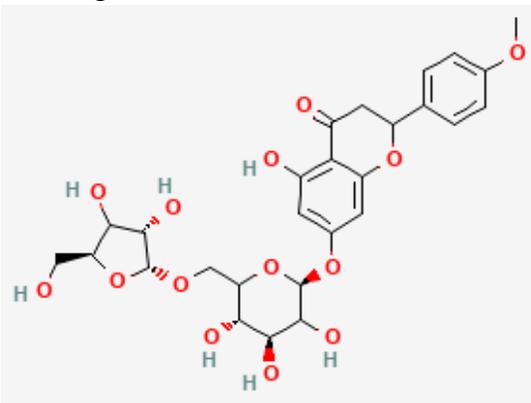
20. Ellagic acid



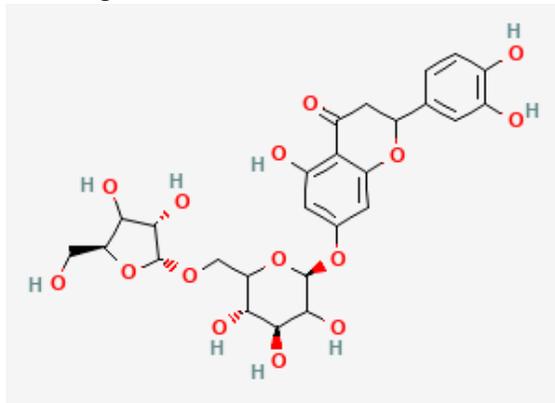
21. Quercetin 3,4'-dimethyl ether  
7- $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl-(1- $\rightarrow$ 6)-  
glucoside



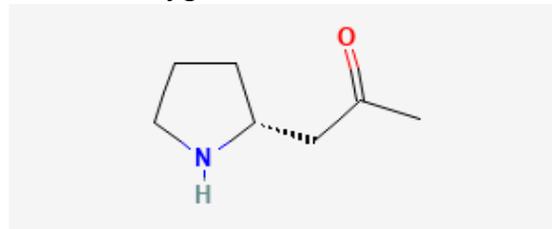
22. Isosakuranetin  
7- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1- $\rightarrow$ 6)-  
glucoside



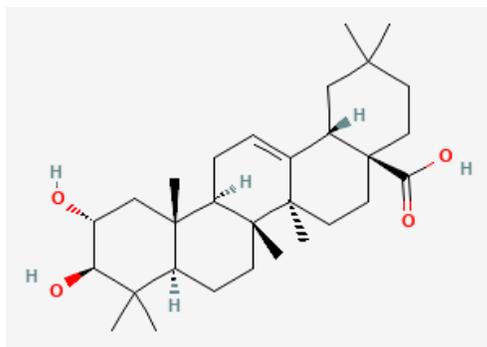
23. 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanone  
7- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl-(1- $\rightarrow$ 6)-  
glucoside



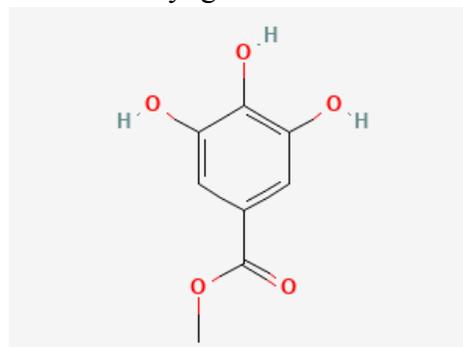
24. Norhygrine



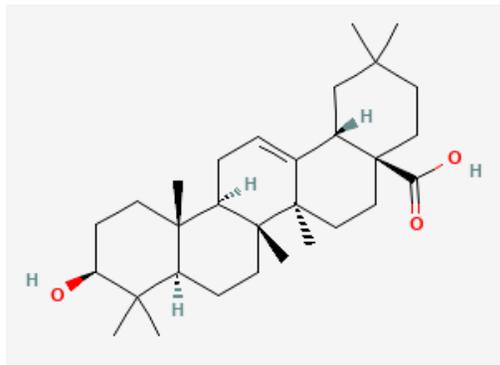
25. Maslinic acid



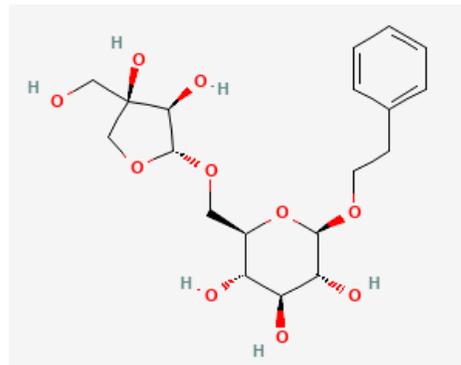
26. Methyl gallate



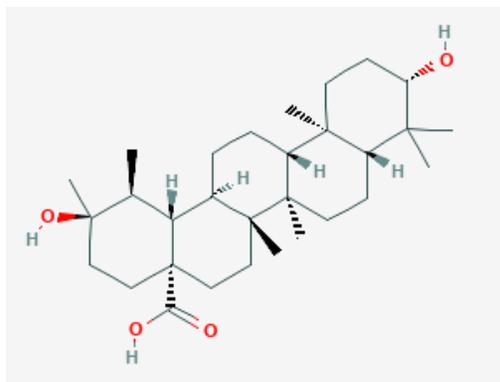
27. Oleanolic acid



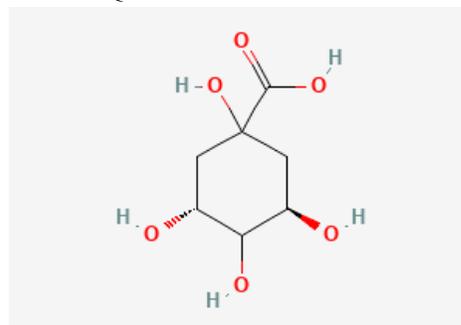
28. Icariside D1



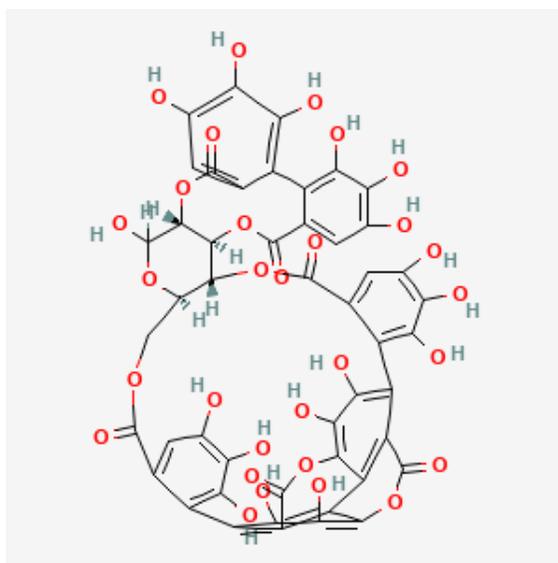
29. Punicalnic acid



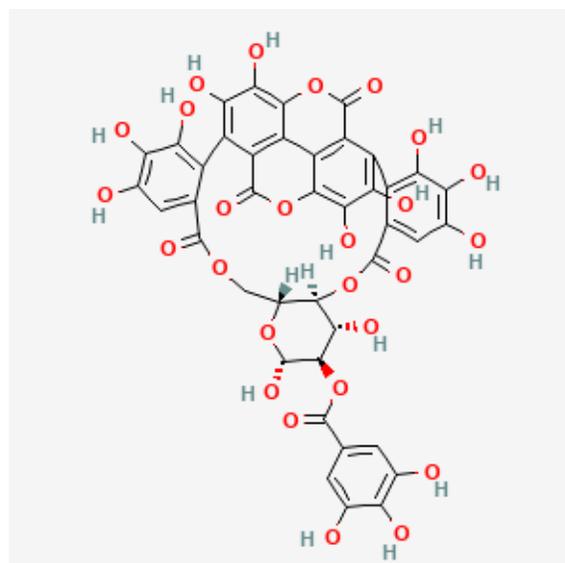
30. Quinic acid



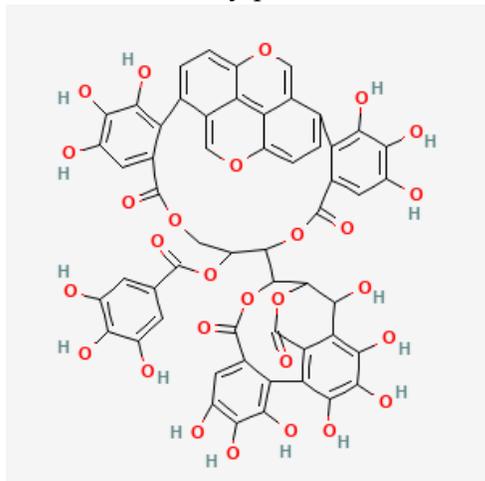
31. Punicalagin



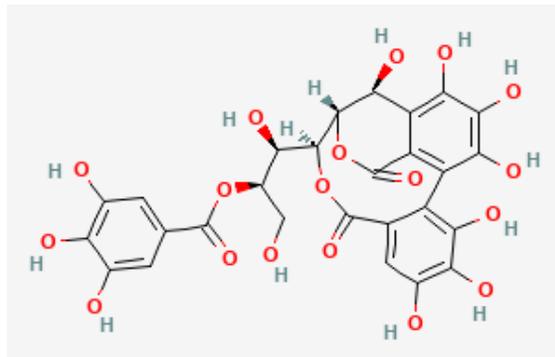
32. 2-O-Galloylpunicalin



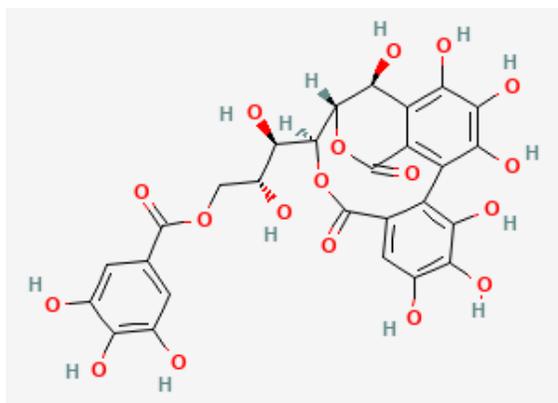
33. 5-O-Galloylpunicacortein D



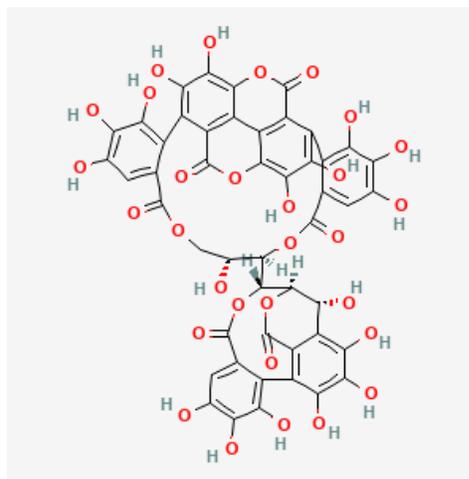
34. Punicacortein A



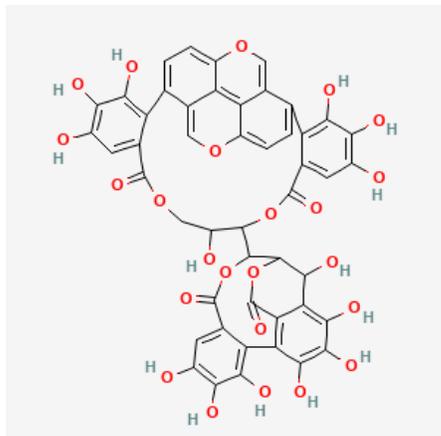
35. Punicacortein B



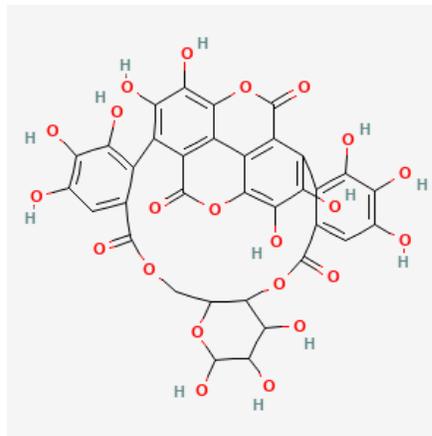
36. Punicacortein C

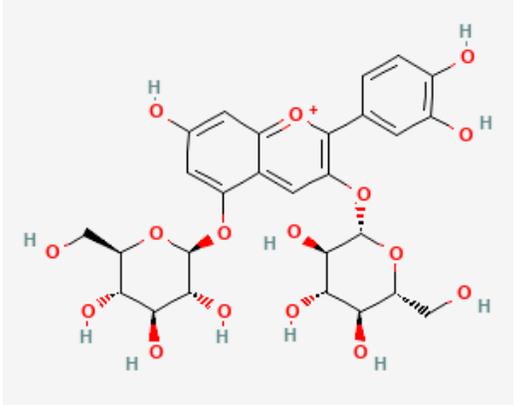
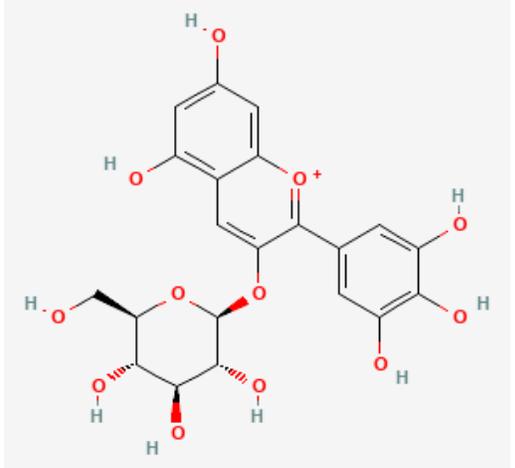
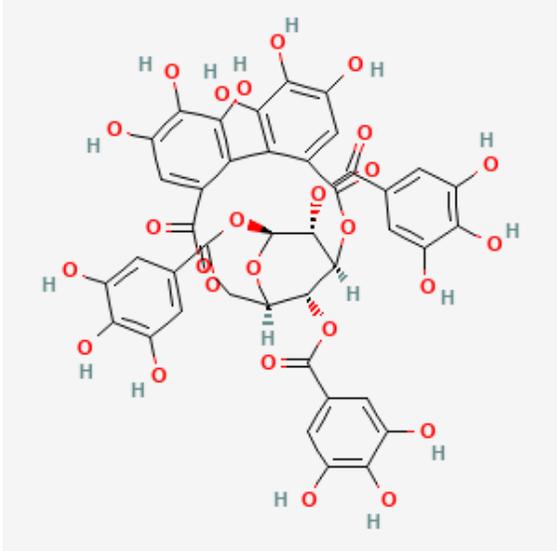
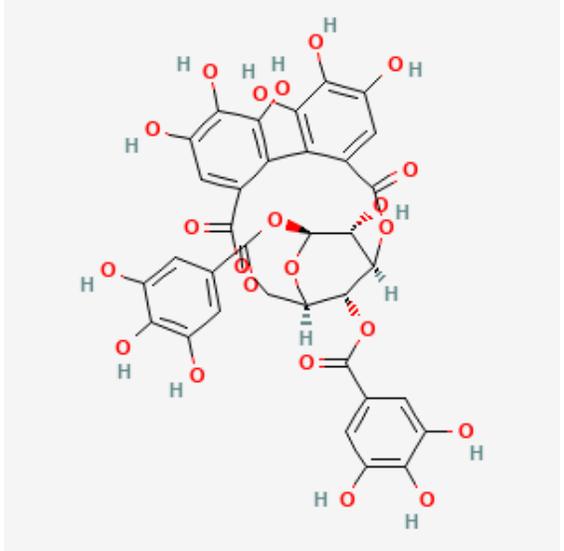
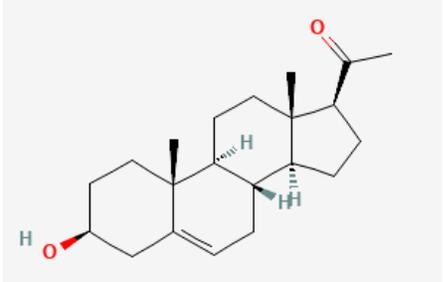
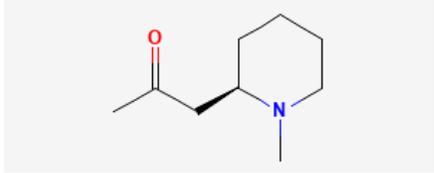


37. Punicacortein D



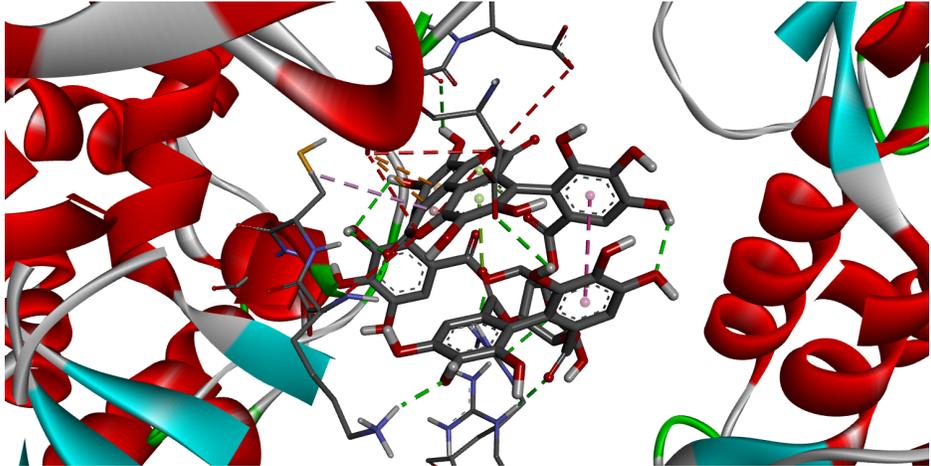
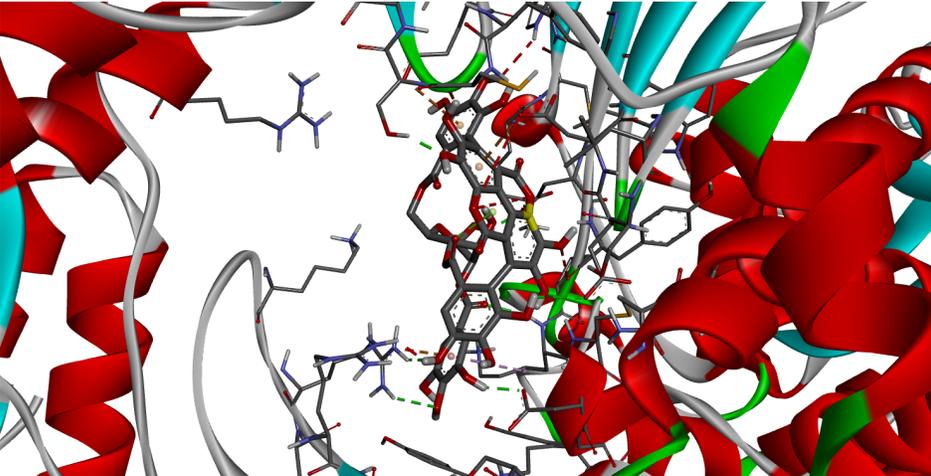
38. Punicalin

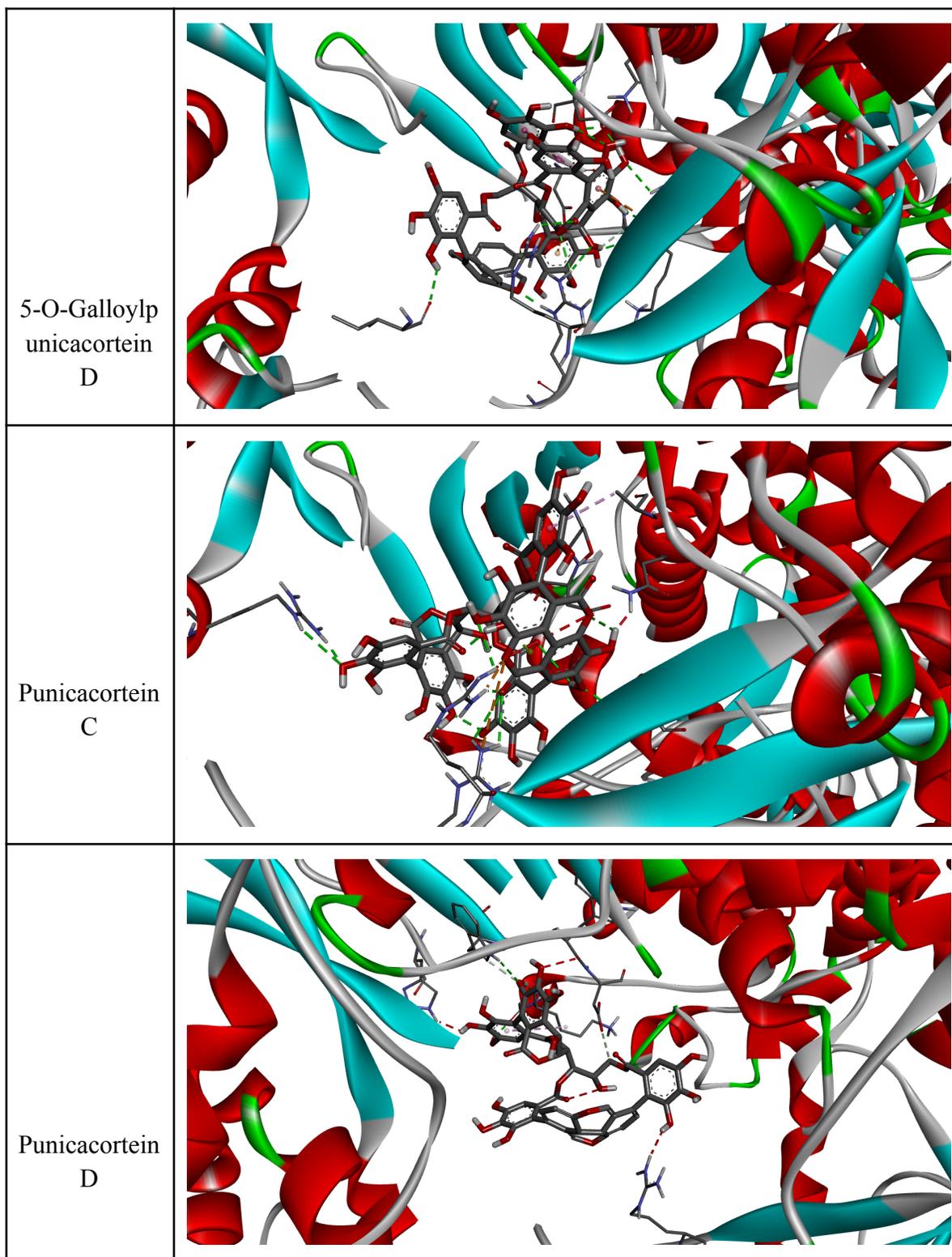


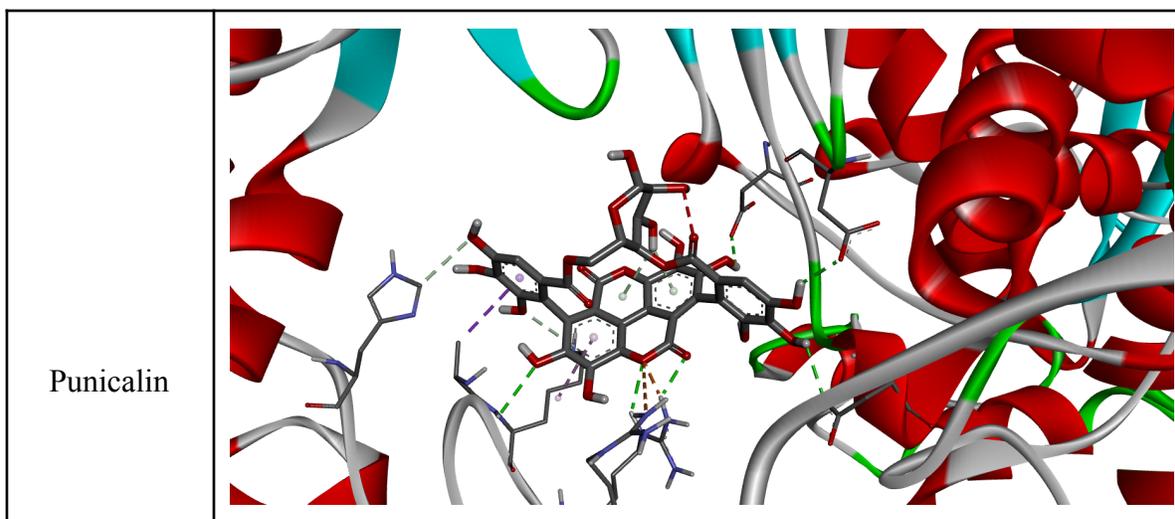
<p>39. Cyanidin 3,5-di-O-glucoside</p>  <p>The structure shows a cyanidin cation core with two glucose units attached at the 3 and 5 positions. The glucose units are in their cyclic pyranose form, with hydroxyl groups at various positions. The cyanidin core has a positive charge on the oxygen at the 4-position.</p>	<p>40. Delphinidin 3-O-glucoside</p>  <p>The structure shows a delphinidin cation core with a single glucose unit attached at the 3-position. The glucose unit is in its cyclic pyranose form. The cyanidin core has a positive charge on the oxygen at the 4-position.</p>
<p>41. Punicafolin</p>  <p>The structure shows a complex polyphenolic compound with a central core and multiple hydroxyl groups. It is a dimeric structure with a central oxygen atom and several hydroxyl groups attached to the aromatic rings.</p>	<p>42. Tercatatin</p>  <p>The structure shows a complex polyphenolic compound with a central core and multiple hydroxyl groups. It is a dimeric structure with a central oxygen atom and several hydroxyl groups attached to the aromatic rings.</p>
<p>43. Pregnenolone</p>  <p>The structure shows a steroid nucleus with a hydroxyl group at the 3-position and a ketone group at the 20-position. It has a methyl group at the 13-position and a double bond at the 5-position.</p>	<p>44. N-Methylpelletierine</p>  <p>The structure shows a piperidine ring with a methyl group on the nitrogen atom and a propyl chain attached to the 2-position. The propyl chain has a ketone group at the 2-position.</p>

**Fuente:** Datos obtenidos en Pubchem, 2022.

**Anexo 3.** Tipos de interacción de ligandos (3D) con mejor energía de acoplamiento molecular con proteína 7BTF

Metabolito	Tipos de interacción de ligandos
Punicalagin	
2-O-Galloylpunicalin	





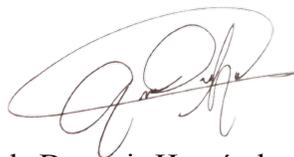
**Fuente:** Datos obtenidos en la Unidad de Química Computacional, edificio T10, USAC.

**Anexo 4.** Estructura molecular y de los aminoácidos lisina y ácido aspártico presentes en la proteína 7BTF

	<b>Lisina</b>	<b>Ácido Aspártico</b>
Estructura química	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{NH}_3^+  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{COO}^-  \end{array}  $
Índice de hidropatía*	-3.9	-3.5

\* **Índice de hidropatía:** Escala que combina la hidrofobicidad y la hidrofiliidad de los grupos R, teniendo un valor negativo para cadenas R más hidrofílicas y un valor positivo para cadenas R más hidrofóbicas.

**Fuente:** Datos obtenidos en Principles of Biochemistry, Nelson, D. Cox, M., 2013. W. H. Freeman and Company.



Amanda Damaris Hernández Tzorín

**Autor**



MSc. Omar Ernesto Velásquez González

**Asesor**



Licda. Bessie Evelyn Oliva Hernández

**Directora de la Escuela de Química**



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

**Decano de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**