



**Evaluación *in silico* del acoplamiento molecular entre metabolitos secundarios del cacao
fino de aroma y proteínas blanco del virus SARS-CoV-2**

Jara Baldeón, Wendy Valeria

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Mihai, Raluca Alexandra, PhD.

10 de agosto del 2022



Tesis Copyleaks.docx

Scanned on: 15:55 August 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	48
Words with Minor Changes	7
Paraphrased Words	45
Omitted Words	0



Alcunna scansionata per:
RALUCA
ALEXANDRA



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: **“Evaluación *in silico* del acoplamiento molecular entre metabolitos secundarios del cacao fino de aroma y proteínas blanco del virus SARS-CoV-2”** fue realizado por la señorita **Jara Baldeón Wendy Valeria**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de agosto del 2022



firmado digitalmente por:

**RALUCA
ALEXANDRA**

Raluca Mihai PhD.

C. I: 1757487507



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Jara Baldeón Wendy Valeria**, con cédula de ciudadanía Nro. 1310057672 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación *in silico* del acoplamiento molecular entre metabolitos secundarios del cacao fino de aroma y proteínas blanco del virus SARS-CoV-2”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 10 de agosto del 2022

Jara Baldeón Wendy Valeria

C.C: 1310057672



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Jara Baldeón Wendy Valeria** con cédula de ciudadanía Nro. 1310057672, ID: L00357219 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Evaluación *in silico* del acoplamiento molecular entre metabolitos secundarios del cacao fino de aroma y proteínas blanco del virus SARS-CoV-2"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 10 de agosto del 2022



Jara Baldeón Wendy Valeria

C.C: 1310057672

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a las personas que persiguen el conocimiento y luchan desde su trinchera para descubrir y dar valor a nuestros recursos naturales, a través de la ciencia. La curiosidad ante el mundo nos hace maravillarnos día a día de la riqueza que existe a nuestro alrededor.

Jara Baldeón, Wendy Valeria

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional y por creer en mí. Su fe y su guía me acompañó desde el día uno, incluso en mis tropiezos. Los amo demasiado.

Le doy gracias a mi familia y amigos por el empuje a lo largo de la carrera, incluso cuando uno se quería dar por vencido. Por estar en las buenas y en las malas. Su aporte me ayudó a forjar carácter y la garra para seguir luchando por mis objetivos.

A mis docentes de la carrera de biotecnología por nutrirme con conocimiento, abrir mis horizontes y ayudarme a construirme de manera personal y profesional. Mi admiración completa por la calidad de gente que encontré en mi camino por la Universidad.

A la Dra. Raluca Mihai por abrirme las puertas y ser guía en la realización de este proyecto, quién con constante apoyo me ayudó a sacar adelante el trabajo, además de darme las pautas y abrirme los ojos en el ámbito investigativo.

Índice de Contenidos

Certificado de Análisis de Copyleaks.....	2
Autorización de Sustentación	3
Certificado de Autoría	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de Tablas.....	11
Índice de Figuras	11
Resumen.....	13
Abstract.....	14
Capítulo I: Introducción	15
Antecedentes	15
Justificación	16
Objetivo General del Proyecto	18
Objetivos Específicos.....	18
Capítulo II: Revisión Bibliográfica	19
SARS-CoV-2.....	19
Estructura del virus	19
Metabolitos secundarios de plantas contra el SARS-CoV-2.....	21
Cacao fino de aroma variedad Nacional	22

Metabolitos secundarios del cacao fino de aroma	23
Docking molecular	23
Funcionamiento.....	24
Fármaco	24
Evaluación de “Druglikeness”	25
Capítulo III: Metodología.....	27
Identificación de metabolitos secundarios del cacao fino de aroma	27
Base de datos de ligandos y receptores	27
Refinamiento de estructuras	29
Preparamiento de ligandos	29
Preparamiento de receptor	29
Docking Molecular	30
Visualización de Resultados	33
Validación de Resultados	33
Eficiencia de ligando	33
Cálculo de RMSD.....	35
Predicción de características farmacológicas	35
Capítulo IV: Resultados	36
Identificación de metabolitos secundarios del cacao fino de aroma	36
Predicción de propiedades farmacológicas	38
Cálculo de energía de enlace y métricas de eficiencia del ligando.....	40
Interacciones de los complejos ligando-proteína generados por Autodock Vina.....	46

Capítulo V: Discusión.....	57
Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones	64
Conclusiones	64
Recomendaciones	65
Capítulo VII: Referencias	66
Capítulo VIII: Apéndices	79

Índice de Tablas

Tabla 1 Resumen de función de proteínas blanco de SARS-CoV-2	20
Tabla 2 Taxonomía de <i>Theobroma cacao</i> L.	22
Tabla 3 Moléculas candidatas a ligandos para ensayo de docking molecular, recopiladas de base de datos de Pubchem	27
Tabla 4 Lista de proteínas blanco de SARS-CoV-2 seleccionadas para análisis de docking molecular	31
Tabla 5 Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos secundarios del cacao fino de aroma con propiedades bioactivas de interés.....	37
Tabla 6 Predicción de propiedades farmacocinéticas y de “druglikeness” de moléculas candidatas del cacao fino y de aroma	38

Índice de Figuras

Figura 1 Metabolitos secundarios de cacao fino y de aroma candidatos con potencial antiviral	36
Figura 2 Diagrama BOILED Egg predictivo de los metabolitos secundarios de cacao fino y de aroma, obtenido de Swiss ADME	40
Figura 3 Energía de afinidad de los complejos ligando-proteína formados por los metabolitos secundarios del cacao fino y de aroma con las proteínas blanco de SARS-CoV-2	41
Figura 4 Métricas de eficiencia de ligando de los complejos ligando-proteína formados por los metabolitos secundarios del cacao fino y de aroma con las proteínas blanco de SARS-CoV-2	43
Figura 5 Interacciones moleculares de complejos ligando-proteína con la proteinasa 3Clpro (PDB: 6M2N) en conformación 3D y 2D	47

Figura 6 Interacciones moleculares de complejos ligando-proteína con la proteinasa tipo papaína (PDB:7CMD) en conformación 3D y 2D	49
Figura 7 Interacciones moleculares de complejos ligando-proteína con la ARN polimerasa dependiente de ARN RdRp (PDB: 6M71) en conformación 3D y 2D	51
Figura 8 Interacciones moleculares de complejos ligando-proteína con la helicasa (PDB:7NIO) en conformación 3D y 2D	53
Figura 9 Interacciones moleculares de complejos ligando-proteína con la glicoproteína spike (PDB: 7LM9) en conformación 3D y 2D.....	55

Resumen

La pandemia por COVID-19, dada por el virus de SARS-CoV-2 es un problema mundial de salud. El contagio latente y falta de terapias efectivas ha promovido el acelerado desarrollo de medicamentos. Los métodos *in silico* han jugado un papel importante en la evaluación rápida de potenciales fármacos. El cacao Arriba (*Theobroma cacao* L.) variedad Nacional, también conocido como fino y de aroma, es una variedad de cacao que contiene gran riqueza de compuestos bioactivos. En este estudio, se evaluó *in silico* el acoplamiento molecular entre metabolitos secundarios del cacao fino de aroma y proteínas blanco del virus SARS-CoV-2.

Se identificaron, bibliográficamente, metabolitos secundarios del cacao Arriba con potencial bioactivo, se predijo sus características farmacocinéticas y se realizó el acoplamiento molecular con proteínas blanco críticas de SARS-CoV-2. La cafeína, teobromina, epicatequina, trans-resveratrol y trans-picéido demostraron posibilidad de ser absorbidas pasivamente en el intestino, al tener solubilidad $WLogP < 8$ y $TPSA < 200 \text{ \AA}^2$. La epicatequina y el trans-picéido, derivado del trans-resveratrol, mostraron la mejor formación de enlaces con residuos catalíticos de los sitios activos de helicasa (-7,9 y -8,2 kcal/mol) y la proteinasa 3Clpro (-7,8 y -8 kcal/mol). Adicionalmente, la eficiencia de ligandos corroboró la fortaleza de las interacciones ejercidas en el complejo proteína-ligando simulados, obteniendo valores mayores a 0,3, valor ideal en fármacos.

Palabras clave: flavonoides, antiviral, SARS-CoV-2, cacao fino y de aroma, docking molecular.

Abstract

The COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2 virus is a global health problem. The latent contagion and lack of effective therapies has promoted an accelerated development of drugs. *In silico* methods have played major role on the rapid evaluation of potential drugs. Cacao Arriba (*Theobroma cacao* L.) Nacional variety, also known as fine and flavor, is a variety of cocoa which contains bioactive compounds. In this study, the molecular docking between secondary metabolites of fine or aroma and target proteins of the SARS-CoV-2 was evaluated.

Secondary metabolites of Arriba cocoa with bioactive potential were identified, bibliographically, their pharmacokinetic characteristics were predicted, and molecular docking with critical target proteins of SARS-CoV-2 was performed. Caffeine, theobromine, epicatechin, trans-resveratrol and trans-piceid showed the possibility of being passively absorbed in the intestine, having solubility $WLogP < 8$ and $TPSA < 200 \text{ \AA}^2$. Epicatechin and trans-piceid, derived from trans-resveratrol, showed the best bond formation with catalytic residues of active site of helicase (-7,9 and -8,2 kcal/mol) and proteinase 3Clpro (-7,8 and -8 kcal/mol). In addition, the efficiency of ligands corroborated the strength of the interactions exerted in the simulated protein-ligand complex, obtaining values greater than 0.3, the ideal value in drugs.

Keywords: flavonoids, antiviral, SARS-CoV-2, fine and flavor cocoa, molecular docking.

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

El SARS-CoV-2 es responsable de la pandemia global de la enfermedad de COVID-19 que comenzó en Wuhan, Hubei, provincia de China. El coronavirus SARS-CoV-2, agente causante de la enfermedad del COVID-19, ha generado 273 millones de infectados y 5 millones de muertos alrededor del mundo, hasta diciembre de 2021 (John Hopkins University, 2021). En la mayoría de los casos, la infección causada por SARS-CoV-2 induce síntomas respiratorios con una severidad de rangos desde lo asintomático hasta la neumonía que puede llegar a ser mortal.

Todas las medidas y protocolos, al día de hoy, sirven para el tratamiento preventivo y sintomático de la enfermedad, pero no son curativos. Sin embargo, existen varios estudios clínicos donde se evalúa a potenciales drogas ya que al tratarse de una epidemia mundial existe una necesidad en la búsqueda de medicina complementaria e integrativa que asista en la prevención, tratamiento y recuperación (Salata *et al.*, 2019).

La medicina alternativa basada en plantas, han demostrado gran importancia para la riqueza en la actividad biológica que presentan los metabolitos secundarios. Los compuestos fitoquímicos han sido utilizados en prevención y tratamiento de diferentes enfermedades. En el caso de la familia de coronavirus, se ha reportado terpenos con acción antiviral para etapas primarias de infección. Así mismo, se han descubierto inhibidores naturales contra enzimas de SARS-CoV que bloquean actividades críticas de replicación del virus (Cheng *et al.*, 2006; C. Lin *et al.*, 2005; L. Lin *et al.*, 2014).

El cacao Arriba (*Theobroma cacao* L.) variedad Nacional, también conocido como fino de aroma, es una variedad del cacao del Ecuador caracterizado por su color amarillo, muy apetecido por su aroma y sabor único (Quingasía & Riveros, 2007). La riqueza del cacao en compuestos bioactivos muestra un gran atractivo para su uso en industrias farmacéuticas y

alimenticias debido a sus actividades biológicas como antibióticos, antitumorales, anticancerígenos, entre otros (Baharum *et al.*, 2016; Brusotti *et al.*, 2014; Yañez *et al.*, 2021).

Justificación

El contagio pandémico y la falta de terapias efectivas dirigidas específicamente a la replicación del virus ha promovido gran cantidad de investigaciones que generan potenciales estrategias en la intercepción del virus del SARS- CoV-2 con el receptor ACE2. El acelerado desarrollo de medicamentos junto a la correspondiente evaluación no termina por responder a la demanda de identificar estrategias viables para ayudar con el tratamiento de la enfermedad (Salata *et al.*, 2019).

El desarrollo de medicamentos para tratar el COVID-19, se ha manejado bajo tres estrategias en las cuales se usan antivirales de amplio espectro, el screening de bases de datos moleculares y el desarrollo basado en información genética y patológica específica (Wu *et al.*, 2020). El screening de base de datos con herramientas como el docking molecular posee una gran ventaja ya que permite obtener información en un tiempo corto y da lugar a repotenciar moléculas. Dentro de la latente lucha contra la pandemia, resulta como una ventajosa vía para obtener resultados prontamente.

Algunos metabolitos secundarios han demostrado acción farmacológica y el consumo rutinario no representa, en la mayoría de casos, efectos adversos. Conocer los mecanismos moleculares y funcionales por los que trabajan los fitoquímicos pueden ayudar a plasmar posibles tratamientos. La exploración de bases de datos con compuestos naturales de metabolitos secundarios de plantas utilizando técnicas de screening como el docking molecular simulan la interacción a nivel molecular de los bioactivos. Los ensayos *in silico* resultan ser un filtro previo para seleccionar elementos para ensayos *in vitro* o *in vivo*.

Por estas razones, el presente estudio pretende investigar la potencial acción inhibitoria de los metabolitos secundarios del cacao (*Theobroma cacao* L.) contra las proteínas blanco de SARS-CoV-2 mediante el uso de herramientas de modelamiento molecular.

Objetivo General del Proyecto

Evaluar *in silico* el acoplamiento molecular entre metabolitos secundarios del cacao fino de aroma y proteínas blanco del virus SARS-CoV-2

Objetivos Específicos

- Identificar bibliográficamente metabolitos secundarios del cacao fino de aroma con potencial actividad antiviral.
- Estimar la energía de enlace en el acoplamiento molecular de metabolitos secundarios del cacao fino de aroma con las proteínas blanco del virus SARS-CoV-2, usando Autodock Vina.
- Analizar el posicionamiento de los metabolitos secundarios del cacao ocupando el sitio activo de las proteínas blanco del virus SARS-CoV-2, usando PyMol
- Calcular la eficiencia del ligando usando la energía de enlace generada en los ensayos de acoplamiento molecular.
- Evaluar el potencial farmacológico de los metabolitos secundarios mejor acoplados a través de la plataforma SwissADME.

Capítulo II: Revisión Bibliográfica

SARS-CoV-2

Los coronavirus son virus con envoltura con ARN monocatenario positivo, miembros de la familia Coronaviridae tales como SARS-CoV o MERS-CoV que también han formado parte de los brotes zoonóticos que han afectado a humanos desde el principio del siglo 21. (Chen *et al.*, 2020; Ge *et al.*, 2013).

El SARS-CoV-2 es un virus de la misma familia que ha sido protagonista de la pandemia global por la enfermedad de coronavirus COVID-19. Pertenece al orden de los Nidovirales y tiene como característica principal las espinas en forma de corona en su superficie externa (Schoch *et al.*, 2020).

Estructura del virus

Se caracteriza por tener diferentes estructuras proteicas, la proteína matriz (M), glicoproteína spike (S), proteína esterasa dimérica, proteína de envoltura y proteína de nucleocápside (N). Se ha establecido que el SARS-CoV entra a la célula hospedera al acoplarse con el receptor de la enzima ACE2 (Human Angiotensin Converting Enzyme Receptor). La interacción del virus con ACE2 es mediada por la proteína transmembrana spike (S), dicha proteína de superficie se encarga además de la fusión de membrana. En el virus intacto, la proteína S se compone como una estructura trimérica, cada monómero tiene un peso molecular de aproximadamente 180 kDa y contiene dos subunidades funcionales, S1 y S2 (Harvey *et al.*, 2021; Muhammed, 2020).

Proteínas blanco de interés.

El genoma del virus de SARS-CoV-2 genera 21 proteínas de los cuales 17 se han utilizado como modelos de proteínas blanco de tratamientos antivirales. Dentro de estudios generados de docking molecular se ha evaluado a las proteínas respecto a moléculas de origen

natural, se seleccionan a las proteínas más importantes en el desarrollo de inhibidores cuya estructura molecular sea pequeña debido a las funciones biológicas clave (Gossen *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020).

En la siguiente tabla, Tabla 1, se presenta un resumen de las funciones de las proteínas blanco que ha dado mejor respuesta frente a metabolitos de plantas efecto sobre el SARS-CoV-2:

Tabla 1

Resumen de función de proteínas blanco de SARS-CoV-2

Nombre de proteína	Función	Referencia
Targets que previenen la síntesis y replicación del virus de ARN		
Proteína tipo papaína (PLpro)	Es un dominio funcional en el complejo de múltiple dominio nsp3 replicasa activa en etapas tempranas del ciclo de replicación.	(Niemeyer <i>et al.</i> , 2018; Ziebuhr <i>et al.</i> , 2000)
Proteinasa 3CLpro (Mpro)	Es mediadora de la maduración funcional de los polipéptidos implicados en el ensamblaje de la maquinaria de replicación y transcripción.	(Ang <i>et al.</i> , 2020; Wang <i>et al.</i> , 2016)
ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp)	Es una proteína conservada en coronavirus. Es una ARN polimerasa responsable de la replicación y transcripción.	(Wu <i>et al.</i> , 2020)
Helicasa (Hel)	Es una proteína multifuncional. Tiene un dominio ligado a un metal en N-terminal, con la capacidad de desenrollar la doble hélice con polaridad 5' a 3'.	(Ang <i>et al.</i> , 2020; Shum & Tanner, 2008)

Nombre de proteína	Función	Referencia
Targets estructurales del virus SARS-CoV-2		
Glicoproteína spike (S)	Se acopla a la membrana celular del hospedero, iniciando la infección. El dominio RBD liga con el receptor ACE2 del hospedero.	(Ou <i>et al.</i> , 2020; Wu <i>et al.</i> , 2020)

Metabolitos secundarios de plantas contra el SARS-CoV-2

La actual pandemia de COVID-19 ha generado una gran demanda por el desarrollo de antivirales. Teniendo en cuenta que la medicina basada en fitoquímicos proveen una fuente rica para el desarrollo de fármacos novedosos, se ha estudiado a las moléculas como potenciales antivirales. En el caso de la familia *Coronaviridae*, se ha reportado que las saikosaponinas de plantas como *Buplerum* spp. o *Heteromorpha* spp. previenen etapas tempranas de infección de HCoV-22E9 (L. Lin *et al.*, 2014).

Otros estudios relacionados señalan que inhibidores naturales tales como la miricetina o la escutelareina actúan contra enzimas. críticas en la replicación del SARS-CoV, como la helicasa nsP13 o la proteasa 3CL (Zhang *et al.*, 2020). Así como también se ha observado que la epicatequina, embelina, hesperidina, cafestol obtienen buen desempeño en la inhibición del SARS-CoV-2 (Gupta *et al.*, 2020).

Una de las grandes ventajas de los metabolitos secundarios respecto a algunos antivirales es su baja citotoxicidad, lo que mejora su administración manteniendo su efectividad. El resveratrol es un ejemplo del caso. En un estudio *in vitro*, el resveratrol inhibió con éxito la replicación de SARS-CoV-2 y tuvo una citotoxicidad menor (EC₅₀= 4,6 µM) respecto a lopinavir (EC₅₀=8,8 µM) o la cloroquina (EC₅₀ = 5 µM) (Pasquereau *et al.*, 2021).

Cacao fino de aroma variedad Nacional

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol reconocido por el producto de la fermentación del fruto, el chocolate. El árbol de cacao crece en regiones tropicales y subtropicales, siendo nativo en las selvas de la región amazónica de Sudamérica. Entre las variedades del cacao, existen tres: Criollo, Trinitario y Forastero. Dentro de la variedad de clase Forastero, encontramos una variedad de gran calidad conocido como el cacao Nacional Fino de Aroma o Cacao Arriba (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao e Industrializados del Ecuador, 2019; Baharum *et al.*, 2016).

La producción de cacao fino de aroma variedad Nacional se da a una altitud de cero a 1200 m sobre el nivel del mar, en zonas de clima húmedo. La zona de producción se centra en las provincias de Guayas y Los Ríos (Oracz *et al.*, 2020; Pino *et al.*, 2018).

En el Ecuador, la variedad Nacional es uno de los principales cultivos reconocido por el mercado internacional debido a sus características organolépticas que otorgan fragancias frutales y florales (Asociación Nacional de Exportadores de Cacao e Industrializados del Ecuador, 2019; Carranza *et al.*, 2020).

Tabla 2

Taxonomía de Theobroma cacao L.

	Nivel	Descripción
	Reino:	<i>Plantae</i>
	Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
	Orden:	<i>Malvales</i>
	Familia:	<i>Malvaceae</i>
	Género:	<i>Theobroma</i> .
	Especie:	<i>Theobroma cacao</i> L.
	Nombre común:	<i>Cacao</i>

Tomado de: Schoch *et al.* (2020)

Metabolitos secundarios del cacao fino de aroma

El cacao contiene aproximadamente 380 químicos conocidos y 10 compuestos psicoactivos. El cacao es una fuente de compuestos fenólicos así como otros metabolitos como glucósidos de la quercitina, trans-resveratrol, alcaloides como la teobromina o la cafeína (Rusconi & Conti, 2010).

En el caso de las semillas de cacao Forastero (variedad Nacional) no fermentadas, son caracterizadas por presentar una coloración púrpura producto de las antocianinas presentes que registran resistencia a enfermedades (Afoakwa, 2016). Además, en sus semillas se ha encontrado un contenido de 35% de epicatequina (Othman *et al.*, 2010).

Estudios realizados por INIAP demuestran un contenido de 37% flavan-3-oles, 58% procianidinas, 4% antocianinas, 1% flavonoles glicosilados. Sin embargo, el proceso de fermentación disminuye en 50% el contenido total de polifenoles debido a procesos oxidativos. La reacción produce taninos insolubles de alto peso molecular lo cual influencia en el característico aroma de la variedad Nacional (Samaniego, 2016).

Respecto al contenido de alcaloides, se estima que en los cotiledones maduros de la clase Forastero se puede encontrar hasta 2.7% de teobromina en peso de base seca. Otros alcaloides reportados son la cafeína, teofilina y teacrina (Vázquez-Ovando *et al.*, 2016).

Docking molecular

El docking o acoplamiento molecular es una herramienta que permite predecir y calcular la interacción entre un ligando y un blanco, basándose en su estructura molecular dadas por los modelos tridimensionales. Se considera como una herramienta importante en el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que genera resultados preliminares perfilando candidatos propicios (Ballón & Grados, 2019; Berry *et al.*, 2015).

Existen limitaciones dentro del proceso pues asume como estructura estática a la proteína blanco. Así como también está sujeto a procesos estocásticos que pueden no

representar la realidad generando falsos positivos que serán descartados en evaluaciones *in vitro* o *in vivo* (Attique *et al.*, 2019). Por lo que es importante señalar que los resultados no son extrapolables a entornos vivos, sin embargo, genera un filtro importante e incluso permite observar modificaciones óptimas a moléculas para potenciar su actividad.

Funcionamiento

Comúnmente se manejan algoritmos que utilizan los ángulos de las conformaciones estructurales del ligando para revisar el ajuste dentro de un dominio proteico. La identificación suele requerir dos etapas: la exploración de potenciales modos de ligar entre las moléculas y la predicción de la energía de interacción asociada con cada conformación. La suma de estos procesos nos entrega un resultado en forma de puntuación, convergiendo hacia una solución de mínima energía (Ballón & Grados, 2019; Ferreira *et al.*, 2015).

Dentro de la primera etapa, se utilizan parámetros estructurales como los grados de libertad torsional (diédrico), traslacional y rotacional. Para esto existen algoritmos sistemáticos y estocásticos que ocupan dichos parámetros generando un ajuste luego de varias evaluaciones (Ferreira *et al.*, 2015; Yuriev *et al.*, 2011). Para la segunda etapa, se utilizan puntuaciones en función de la variación de energía dado por la constante de disociación (K_d) y la energía libre de Gibbs (ΔG_L). La predicción suele utilizar fenómenos fisicoquímicos implicados en la unión del complejo ligando-receptor incluyendo la interacción intermolecular, desolvatación y efectos entrópicos (Foloppe & Hubbard, 2006; Jain, 2006).

Fármaco

Un fármaco puede definirse como una sustancia con la capacidad de generar un cambio en la función biológica a través de la acción química. Si bien puede actuar como agonista (Activador) también puede actuar como antagonista (inhibidor) al interactuar con una molécula blanco (Katzung, 2018).

La evaluación de fármacos permite definir la actividad y selectividad de un fármaco, para esto se realizan ensayos diferentes para caracterizar la viabilidad y seguridad de los fármacos además de los mecanismos de acción y eficacia. Una manera de realizar el análisis es a través de modelos predictivos computacionales que permiten dilucidar la biodisponibilidad de las moléculas a través de sus características moleculares (Daina *et al.*, 2017).

Evaluación de “Druglikeness”

Regla de Lipinski

La regla de Lipinski también conocida como la regla de los 5, es una regla empírica que establece valores a cumplir para que un principio activo pueda ser administrado vía oral. Las reglas son las siguientes:

1. Debe poseer un peso molecular relativo entre 160 y 500 uma.
2. Debe contener 5 o menos donadores de enlaces por puente de hidrógeno.
3. Debe contener 10 o menos aceptores de enlaces por puente de hidrógeno.
4. Debe tener un coeficiente de reparto log P entre -0.4 y 5.6 (Lipinski, 2000).

ADME

Se trata de un conjunto de criterios que sirven para caracterizar la naturaleza farmacológica de un compuesto. Se analizan a través de su estructura, y son los siguientes: absorción, distribución, metabolismo y excreción. Existen plataformas en línea que analizan la estructura química y calculan la biodisponibilidad utilizando las propiedades fisicoquímicas como, por ejemplo: lipofilidad, tamaño, polaridad, solubilidad, flexibilidad y saturación (Ntie-Kang *et al.*, 2019).

Lipofilicidad.

El coeficiente de partición octanol-agua ($\log P_{o/w}$) es la característica usada para medir esta propiedad. Este parámetro influye en la solubilidad, permeabilidad en membrana, potencia, selectividad y promiscuidad (Arnott & Planey, 2012).

Solubilidad

Una molécula soluble facilita el desarrollo de fármacos por la facilidad de manejo y formulación. Además, la solubilidad está fuertemente relacionado con la absorción que pueda tener un fármaco. Los valores suelen ser expresados en unidades de mol/l o mg/ml (Ottaviani *et al.*, 2010).

Farmacocinética

Los modelos de farmacocinética utilizan funciones que permiten la predicción de la permeabilidad en piel, donde se puede correlacionar el tamaño molecular y la lipofilicidad. La predicción de la absorción pasiva gastrointestinal y permeabilidad en barrera sangre-cerebro, de la misma manera son clasificadas a través de modelos correlacionados (Daina *et al.*, 2017).

Capítulo III: Metodología

Identificación de metabolitos secundarios del cacao fino de aroma

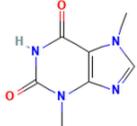
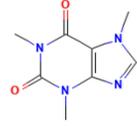
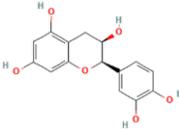
A través de bibliografía, se identificaron los metabolitos secundarios del Cacao Arriba fino de aroma variedad Nacional. Se seleccionó aquellos metabolitos secundarios que previamente han presentado potencial como bioactivo de interés.

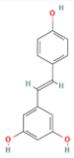
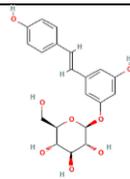
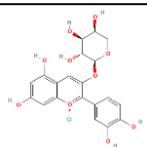
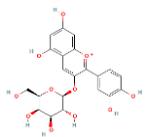
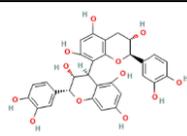
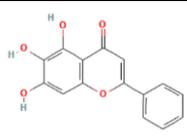
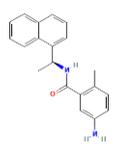
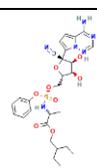
Base de datos de ligandos y receptores

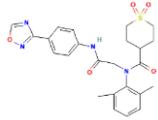
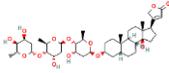
En este estudio, se utilizaron los metabolitos secundarios de Cacao Arriba fino y de aroma identificados como potenciales antivirales. Las estructuras cristalinas en 3D de los metabolitos secundarios se van a obtener de la compilación de estructuras provistas en el Banco de Datos de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) en formato sdf.

Tabla 3

Moléculas candidatas a ligandos para ensayo de docking molecular, recopiladas de la base de datos de Pubchem

	Nombre	Pubchem CID	Nomenclatura	Estructura
LIGANDOS	Teobromina	5429	$C_7H_8N_4O_2$	
	Cafeína	2519	$C_8H_{10}N_4O_2$	
	Epicatequina	72276	$C_{15}H_{14}O_6$	

	Nombre	Pubchem CID	Nomenclatura	Estructura
	Trans-resveratrol	445154	$C_{14}H_{12}O_3$	
	Trans-picéido	5281718	$C_{20}H_{22}O_8$	
LIGANDOS	Cianidin-3-O- α -arabinósido	91810602	$C_{20}H_{19}ClO_{10}$	
	Cianidin-3-O- β -galactósido	441699	$C_{21}H_{21}O_{11}^+$	
	Procianidina B1	11250133	$C_{30}H_{26}O_{12}$	
	Baicaleína	5281605	$C_{15}H_{10}O_5$	
CONTROL	TTT: 5-Amino-2-Metil-N-[(1r)-1-Naftalen-1-Yletil]benzamida	24941262	$C_{20}H_{20}N_2O$	
	Remdesivir	121304016	$C_{27}H_{35}N_6O_8P$	

	Nombre	Pubchem CID	Nomenclatura	Estructura
CONTROL	Amenamevir	11397521	C ₂₄ H ₂₆ N ₄ O ₅ S	
	Digitoxina	441207	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	

Mientras que las estructuras cristalinas en 3D de las seis proteínas blanco de SARS-CoV-2 se obtuvieron del Banco de Datos de Proteína (RCSB PDB: Protein Data Bank; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) en formato pdb.

Refinamiento de estructuras

Preparamiento de ligandos

Se transformó la molécula utilizando Discovery Studio para pasar de formato sdf a mol2. Se abre el archivo en Autodock Tools. Se añade todos los hidrógenos. Se añade las cargas de Castiger para el ligando. Se retira los hidrógenos no polares. Se guarda el archivo en formato pdbqt.

Preparamiento de receptor

Para realizar el proceso de refinamiento para esto abrimos el archivo PDB usando Autodock Tools. Se elimina los ligandos, iones metálicos y otros grupos que suelen presentarse en la estructura de la macromolécula. Se añade los hidrógenos de los enlaces polares y se elimina los hidrógenos no polares. Además, se elige la cadena completa y se guarda el archivo para el tratamiento.

Docking Molecular

Se utilizó el software Chimera UCSF (versión 1.16.) instalado en un procesador Intel(R) Core(TM) i5 con 8 GB RAM, con sistema operativo Windows 10.

Se estableció el área de trabajo donde se diseñó la caja donde debe encontrarse el sitio de unión entre el ligando y el receptor. En la Tabla 4, se desglosa las características del *grid box* de las proteínas de interés. El archivo *gpf* generado es una entrada para el ensayo.

Tabla 4

Lista de las proteínas blanco de SARS-CoV-2 seleccionadas con sus tamaños de caja y sitios de unión para análisis de docking molecular

Nombre de proteína	Dimensiones de caja (centro, X, Y, Z)	Sitios de Unión
Targets que previenen la síntesis y replicación del virus de ARN		
Proteína tipo papaína (PLpro)	-28.277 × -11.496 × -30., 30 × 30 × 30	Lys105, Trp106 , Asp108 , Lys157, Leu162 , Asp164, Glu167 , Tyr264 Asn267 , Tyr268 Gln269 , Cys270, Gly271
PDB: 7CMD		
Proteinasa 3CLpro (Mpro)	-38.967 × -20.855 × 60.211., 30 × 30 × 30	Thr24, Thr25, Thr26, Leu27, His41, Phe140 , Leu141, Asn142, Gly143 , Ser144, Cys145 , His163, His164 , Met165, Glu166 , Pro168, His172, Arg188 , Gln189 , Thr190 , Ala191, Gln192
PDB: 6M2N		
ARN polimerasa (RdRp)	114.58 × 115.26 × 122.09, 30 × 30 × 30	Arg555, Val557, Asn611, Trp617 Asp618 , Tyr619, Lys621 Asp623, Thr680 Ser682, Ser682, Asn691, Phe753, Ser754 Ser759 , Asp760 , Asp761 , Lys798 , Trp800 , Ser814
PDB: 6M71		

Nombre de proteína	Dimensiones de caja (centro, X, Y, Z)	Sitios de Unión
Helicasa (Hel) PDB: 7NIO	-27.125 × -11.518 × 8.360, 30 × 30 × 30	Arg178 , Asn179, Glu197 , Glu261, Phe262, Pro284, Gly285, Thr286, Gly287, Lys288, Ser289, His290, Phe291, Arg339 , Met378 , Asn361 , Asp383 Gln404, Ala407, Thr410, Leu412 , Thr416, Leu417 , Arg442, Arg443, Asp534 , Glu540, Asn557, Arg560 , Arg567
Targets estructurales del virus SARS-CoV-2		
Glicoproteína spike (S) PDB:7LM9	9.771 × -16.479 × -1.331, 30 × 30 × 30	Gly404 , Lys417, Tyr453 , Thr495 , Gly496, Phe497, Asn501 , Gly504, Tyr505

Adaptado de (Gupta *et al.*, 2020)

Se utilizó *Surface/Binding Analysis/Autodock Vina* para ingresar los parámetros de entrada del ensayo de docking. Se configura de manera predeterminada al ligando para que se realice la rotación de los ángulos de enlace. De la misma manera, los parámetros del algoritmo de Vina usan la configuración predeterminada cambiando a la máxima exhaustividad de la evaluación.

Dentro del resultado de docking, se escogió a las conformaciones con menor energía de enlace generadas por el programa.

Visualización de Resultados

Utilizando los archivos generados por Autodock Vina, se utilizó el software PyMOL donde se analiza manualmente las poses para identificar las interacciones de los ligandos en el sitio activo de las proteínas blanco. Sin embargo, los archivos generados tenían pérdida de resolución respecto a la señalización de los aminoácidos de interacción produciendo archivos ilegibles, por lo cual se complementó la generación de archivos 2D utilizando la plataforma ProteinPlus (<https://proteins.plus/>). La plataforma dispone de la aplicación PoseView la cual genera diagramas en dos dimensiones de los complejos estructurales 3D generados con Autodock Vina ilustrando las estructuras bajo las convenciones químicas.

Validación de Resultados

Eficiencia de ligando

La eficiencia de ligando (EL) es un parámetro dependiente del coeficiente de disociación K_d que indica la fuerza de enlace del complejo ligando-proteína (Abad-Zapatero, 2013; Yañez *et al.*, 2021). Se obtuvo el valor utilizando la energía de afinidad (ΔG^0 , kcal mol⁻¹) obtenida del ensayo de docking. La eficiencia del ligando por cada átomo que no es de hidrógeno fue calculada utilizando las ecuaciones siguientes:

$$K_d = 10^{\frac{\Delta G^0}{2.3030 RT}} \quad (1)$$

donde R es la constante universal de los gases $1.987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ y T es la temperatura en condiciones estándar 298.15 K .

$$EL = -\frac{2.303 RT}{HAC} \log(Kd) \quad (2)$$

donde HAC es el conteo de átomos pesados del ligando.

Adicionalmente, se realizó el cálculo de otras métricas de eficiencia del ligando, las cuales son valores que identifican la calidad y señalan una posible optimización futura:

- IEL (índice de eficiencia del ligando) (Ecuación 3): Es un descriptor físicoquímico que se interpreta como la medida directa de ligamiento de 1 g de muestra (Polanski *et al.*, 2017).

$$IEL = \frac{pIC50}{PM (kDa)} \quad (3)$$

- IES (Índice de eficiencia de superficie) (Ecuación 4): Es un descriptor que relaciona la afinidad con la polaridad (Abad-Zapatero, 2007).

$$SEI = \frac{pIC50}{(APS/100 A^2)} \quad (4)$$

- LipE (Eficiencia Lipofílica) (Ecuación 5): Es un parámetro que combina la potencia y la lipofiliidad. Al usar $\log P$ permite predecir consistentemente la eficacia y la duración *in vivo* (Ryckmans *et al.*, 2009).

$$LipE = pIC50 - \log P \quad (5)$$

IC50, Kd y Ki puede ser intercambiable. PM: peso molecular, APS: área polar de superficie. Se utilizará $\log P$ por la simplicidad de cálculo.

Cálculo de RMSD

Para validar los resultados de docking, se realiza el cálculo de la desviación cuadrática media entre el ligando cocrystalizado propio de las proteínas blanco y el resultado de docking. Se realizará para las moléculas que posean la misma naturaleza química que el ligando cocrystalizado (Ramírez & Caballero, 2018).

Predicción de características farmacológicas

Se utilizó la plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) para evaluar los parámetros fisicoquímicos de las moléculas identificadas como potenciales inhibidores de las proteínas blanco. Los parámetros de Lipinski utiliza a las moléculas candidatas en formato SMILES (Attique *et al.*, 2019).

A través de esta plataforma se determinó la absorción de las moléculas en el tracto gastrointestinal y cerebro utilizando el modelo BOILED-Egg (Brain Or Intestinal Estimated permeation predictive model) también conocido como “Egan Egg” que ofrece una representación descriptiva de discriminación donde se representa la facilidad de absorción basado en la lipoficidad y la polaridad, descrita entre el coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$) y el área polar superficial (PSA) (Daina & Zoete, 2016).

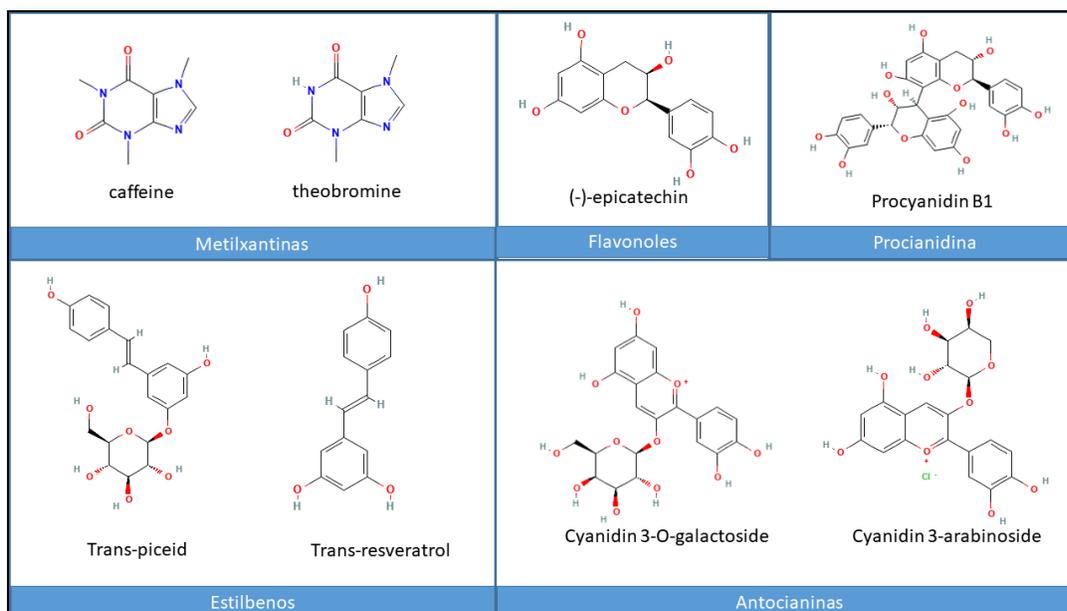
Capítulo IV: Resultados

Identificación de metabolitos secundarios del cacao fino de aroma

Se recopiló información de publicaciones dentro de la base de datos de NCBI bajo los términos “cacao fino de aroma/ fine flavor aroma cocoa”, “variedad Nacional/ Nacional variety”, “Cacao Forastero”, “Ecuador”, “metabolitos secundarios/ secondary metabolites”, “composición/composition”, donde se encontró las listas de los compuestos volátiles y no volátiles, de los cuales se seleccionaron los compuestos no volátiles. Se comparó los compuestos de mayor concentración respecto a otras variedades encontrando así polifenoles y metilxantinas preponderantes en la composición de los metabolitos secundarios del cacao fino de aroma. Posteriormente, se evaluó su potencial antiviral a través de bibliografía en donde se seleccionaron ocho moléculas representativas de los metabolitos secundarios del cacao fino de aroma, los cuales se encuentran ilustrados en la Figura 1:

Figura 1

Metabolitos secundarios de cacao fino y de aroma candidatos con potencial antiviral



Las propiedades fisicoquímicas de las moléculas conjunto a las funciones bioactivas de los metabolitos clasificados se encuentran desglosadas en la Tabla 5:

Tabla 5

Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos secundarios del cacao fino de aroma con propiedades bioactivas de interés

Molécula	Fórmula	Peso molecular (g/mol)	Número de átomos pesados	Área Polar de Superficie (Å ²)	Antivirales	Referencias
Teobromina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180.16	13	72.68	Metilxantinas como adyuvante contra SARS-CoV-2	(Monji <i>et al.</i> , 2020; Rolta <i>et al.</i> , 2022)
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.16	14	61.82	Mayaro virus, paperas, hepatitis B	(Ferreira <i>et al.</i> , 2018), (Takahashi <i>et al.</i> , 2021), (Parvez <i>et al.</i> , 2022)
Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27	12	110.38	Herpes simplex, Varicella-zoster, Pseudorabia	(Docherty <i>et al.</i> , 1999), (Zhao <i>et al.</i> , 2017), (Abba <i>et al.</i> , 2015)
Trans-resveratrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.24	17	60.69	Coronavirus, virus de mosaico (plantas)	(Xu <i>et al.</i> , 2021), (Song <i>et al.</i> , 2021)
Trans-piceido	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	390.38	28	139.84	Inhibición de proteasas virales de VIH y hepatitis C	(Mohammadi Pour <i>et al.</i> , 2019)
cianidin-3-O-arabinósido	C ₂₀ H ₁₉ ClO ₁₀	454.81	31	173.21		
cianidin-3-O-galactósido	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.38	32	193.44		
Procianidina B1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578.52	42	220.76	Herpes simplex, rotavirus	(Ghildiyal <i>et al.</i> , 2020; Lipson <i>et al.</i> , 2017)

Predicción de propiedades farmacológicas

Se ha realizado el análisis del perfil farmacocinético de los candidatos a ligandos para los ensayos de docking molecular usando la plataforma de Swiss ADME, en donde se desglosó la caracterización de las moléculas individualmente (Tabla 5). Las predicciones de las propiedades señalan a la cianidin-3-O-arabinósido, cianidin-3-galactósido y a la procianidina como moléculas no aptas como candidatas a fármaco pues incumplen con múltiples parámetros idóneos para el desarrollo de una droga.

Al cianidin-3-O-arabinósido, observamos que supera el número de donadores de enlace hidrógeno ($NH_{or}OH \leq 5$) pues cuenta con un total de siete. Además, el área polar superficial es de 173.21 \AA^2 . Por otro lado, el cianidin-3-galactósido tiene ocho donadores de enlace hidrógeno, 11 aceptores de enlace de hidrógeno y 93.44 \AA^2 incumpliendo tres de los cinco parámetros de Lipinski. La procianidina B1 es otra molécula que incumple cuatro de los cinco parámetros de Lipinski.

Tabla 6

Predicción de propiedades farmacocinéticas y de druglikeness de las moléculas candidatas del cacao fino de aroma

Molécula	Farmacocinética		Druglikeness				
	Absorción	BBB	NH _{or} OH ≤ 5	NorO ≤ 10	MW ≤ 500 Da	log P ≤ 5	PSA ≤ 140 Å
	GI	Permeable					
Teobromina	X		X	X	X	X	X
Cafeína	X		X	X	X	X	X
Epicatequina	X		X	X	X	X	X
Trans-resveratrol	X	X	X	X	X	X	X
Trans-picéido	X			X	X	X	X

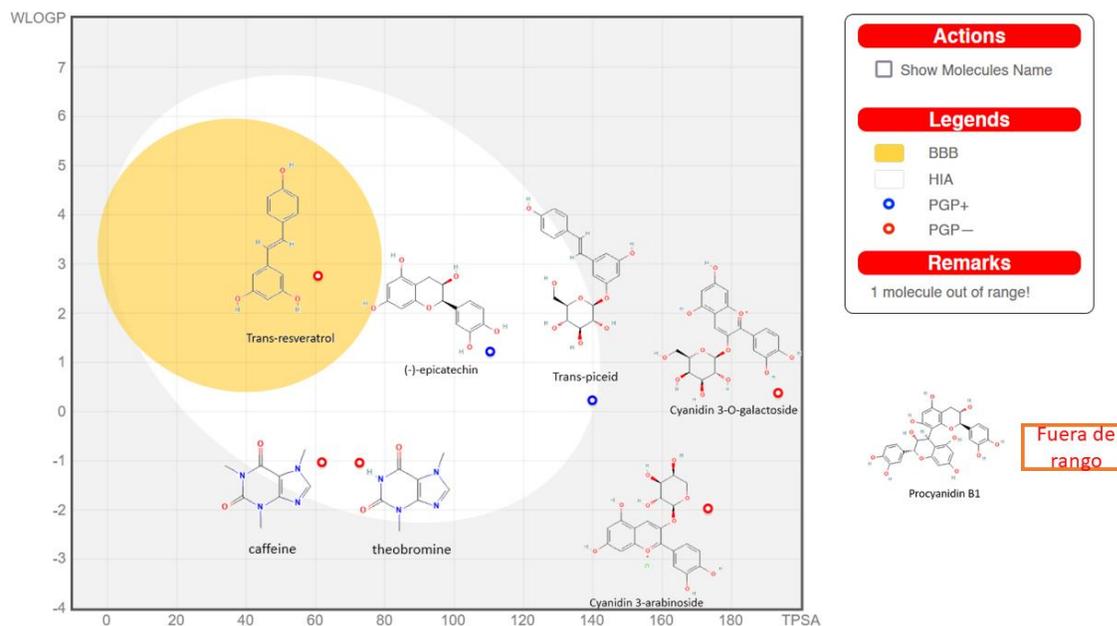
Molécula	Farmacocinética		Druglikeness				
	Absorción	BBB	NH _{or} OH ≤ 5	NorO ≤ 10	MW ≤ 500 Da	log P ≤ 5	PSA ≤ 140 Å
	GI	Permeable					
Cianidin-3-arabinósido	X				X	X	
Cianidin-3-galactósido	X				X	X	
Procianidina B1						X	

Absorción GI: Absorción gastrointestinal; *Permeabilidad BBB:* Permeabilidad de barrera sangre-cerebro, por sus siglas en inglés; *NH_{or}OH:* Donadores de enlace hidrógeno (expresado como la suma de OH y NH); *NorO:* Aceptores de enlace hidrógeno (expresado como la suma de N y O); *MW:* peso molecular, por sus siglas en inglés; *log P:* coeficiente de partición; *PSA:* área polar superficial, por sus siglas en inglés.

El modelo predictivo de BOILED-Egg para la absorción y biodisponibilidad de los metabolitos secundarios del cacao fino y de aroma generado a través de la plataforma Swiss ADME nos permite dar lectura de la farmacocinética de las moléculas candidatas. El resultado presentado en la Figura 2 nos muestra que cinco de los ocho compuestos seleccionados pueden ser más probablemente absorbidos pasivamente (compuestos encontrados en el área blanca y amarilla del gráfico). Se muestra al trans-resveratrol como un compuesto con la capacidad de pasar a través de la barrera sangre-cerebro. Los compuestos que se encuentran fuera del área blanca son compuestos con poca capacidad de ser absorbidos, se caracterizan por tener una solubilidad $WlogP > 8$ y un área topológica polar superficial $TPSA > 200$, encontrándose las antocianinas y la procianidina.

Figura 2

Diagrama BOILED Egg predictivo de la absorción gastrointestinal y permeabilización en cerebro de los metabolitos secundarios del cacao fino de aroma, obtenido de la plataforma Swiss ADME



Las moléculas de procianidina B1, cianidin-3-arabinósido y cianidin-3-galactósido se descartaron para análisis posteriores de docking molecular, debido a las múltiples violaciones de las reglas de Lipinski además de la poca capacidad para ser absorbidos por vía oral.

Las moléculas que se usaron para el análisis por docking molecular fueron: cafeína, teobromina, epicatequina, trans-resveratrol, trans-picéido.

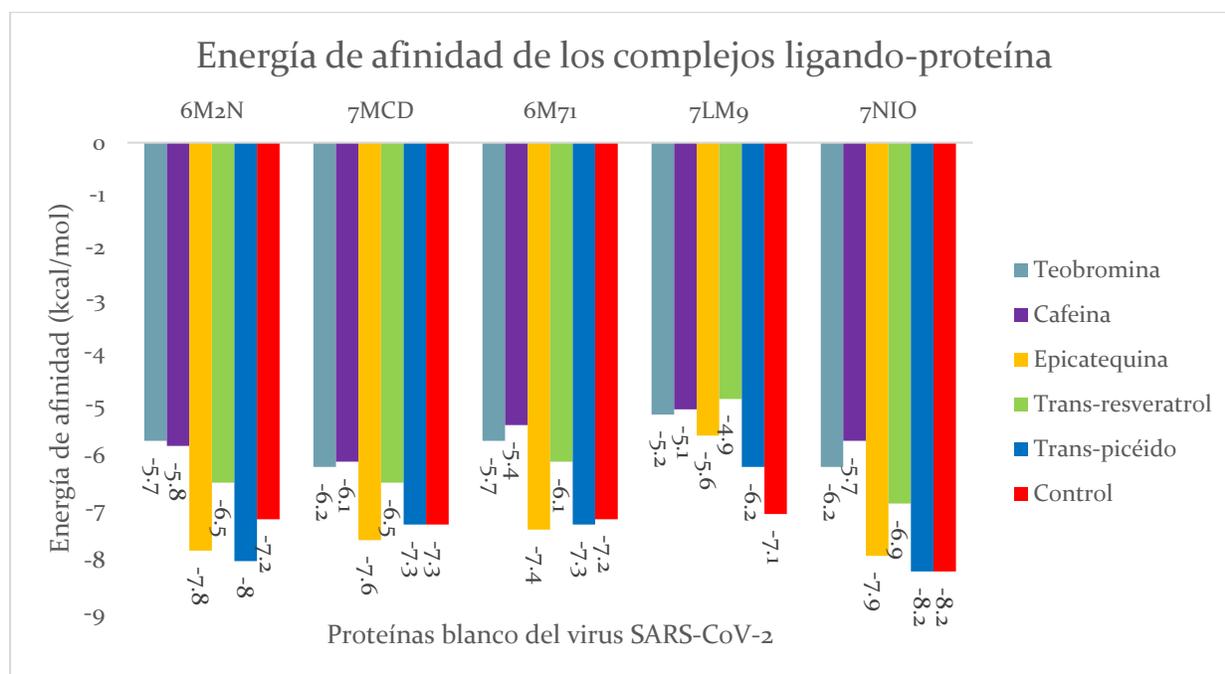
Cálculo de energía de enlace y métricas de eficiencia del ligando

Se obtuvo la energía de afinidad (kcal/mol) de los mejores diez modelos generados de la simulación de Autodock Vina. Se ilustró la menor energía de enlace de los ligandos donde se logra observar que la epicatequina y el transpicéido logran equiparar a los valores de control positivo de cada una de las proteínas. En el caso de la glicoproteína S (7LM9), observamos

que las moléculas no consiguen una energía de enlace equiparable con el control, la molécula con la energía de mejor afinidad es el transpicéido (-6.2 kcal/mol).

Figura 3

Energía de afinidad de los complejos ligando-proteína formados por los metabolitos secundarios del cacao fino de aroma con las proteínas blanco de SARS-CoV-2. 6M2N: Proteínasa 3CLpro; 7CMD: Proteínasa tipo papaína; 6M71: ARN polimerasa; 7NIO: Helicasa; 7LM9: Glicoproteína spike



Se usó los parámetros K_d y eficiencia de ligando, para comparar la afinidad existente dentro del complejo ligando-proteína, donde K_d corresponde a la constante de disociación calculada usando la energía de afinidad (kcal/mol) por cada modelo generado de la simulación de Autodock Vina.

Para el cálculo de las métricas de eficiencia del ligando, se utilizó los valores generados con la plataforma SwissADME donde se encontraban valores de: peso molecular, conteo de

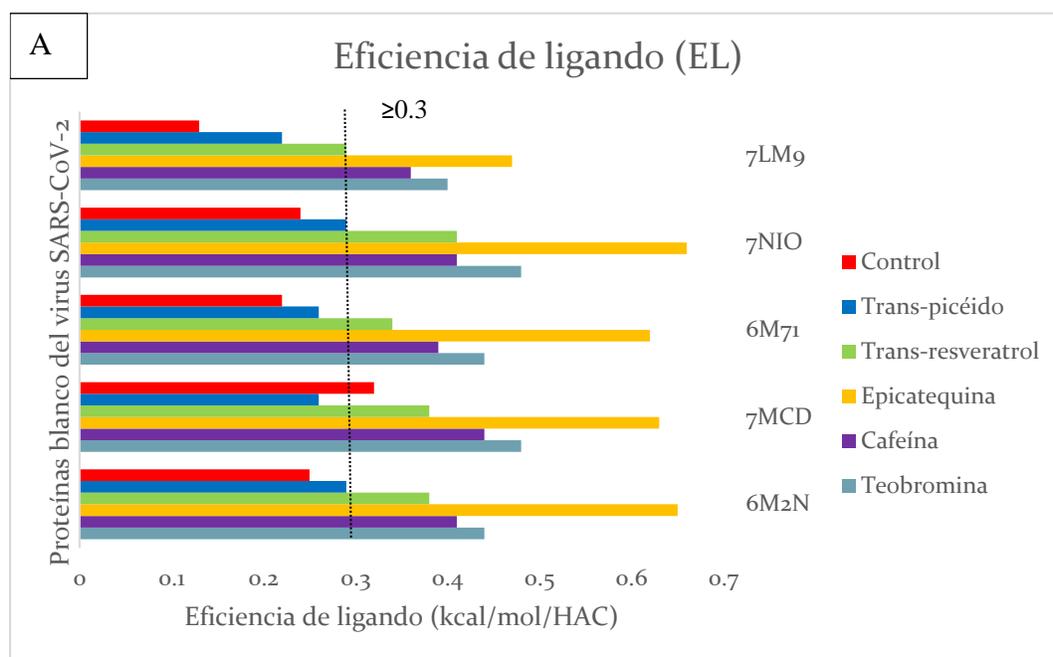
átomos pesados (HAC, por sus siglas en inglés), área topológica polar de superficie (PSA, por sus siglas en inglés), solubilidad consenso (log P).

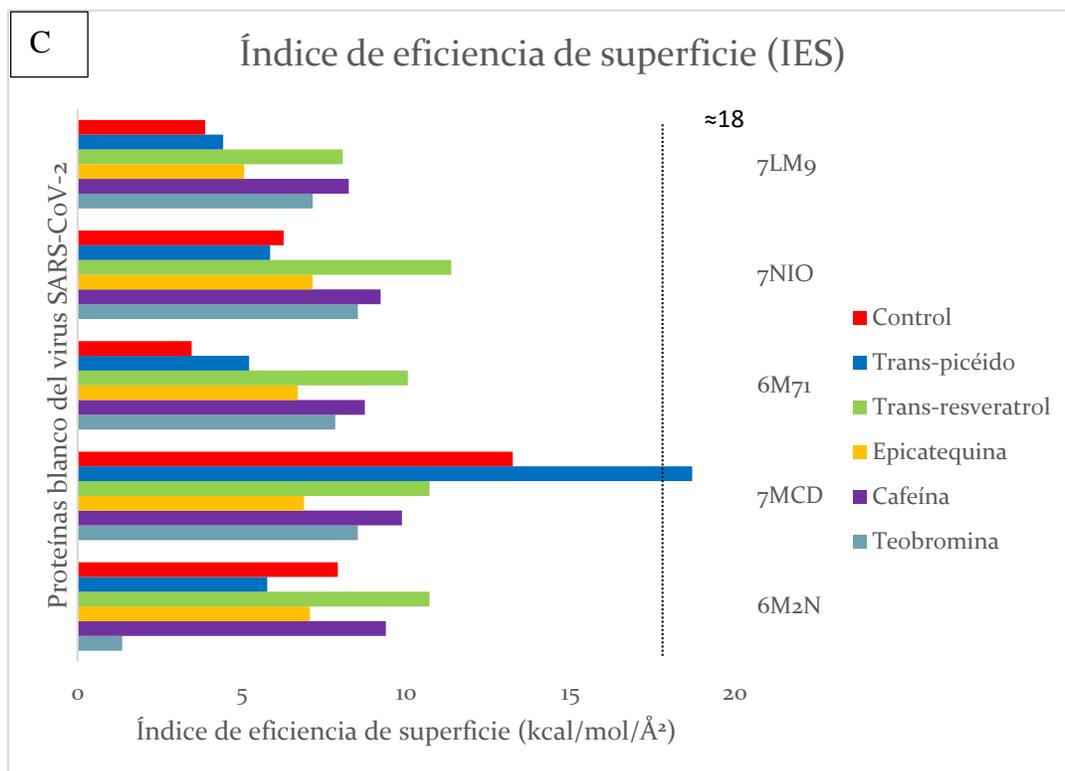
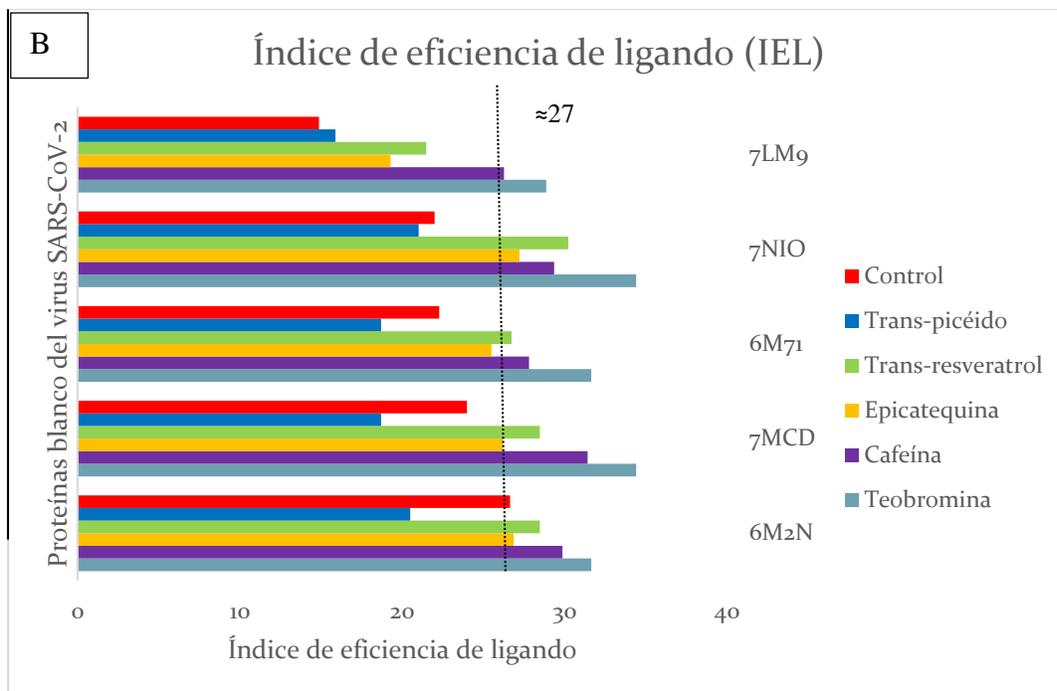
Los ligandos que superan al valor referencial de eficiencia de ligando, EL, de fármaco ideal fueron la epicatequina, la cafeína y la teobromina. El trans-resveratrol supera el valor referencial menos en la interacción con glicoproteína S (7LM9) con un valor de 0.29. El transpicéido tiene una eficiencia de ligando de 0.22-0.29 respecto a las diferentes interacciones de proteínas (Figura 4.A.).

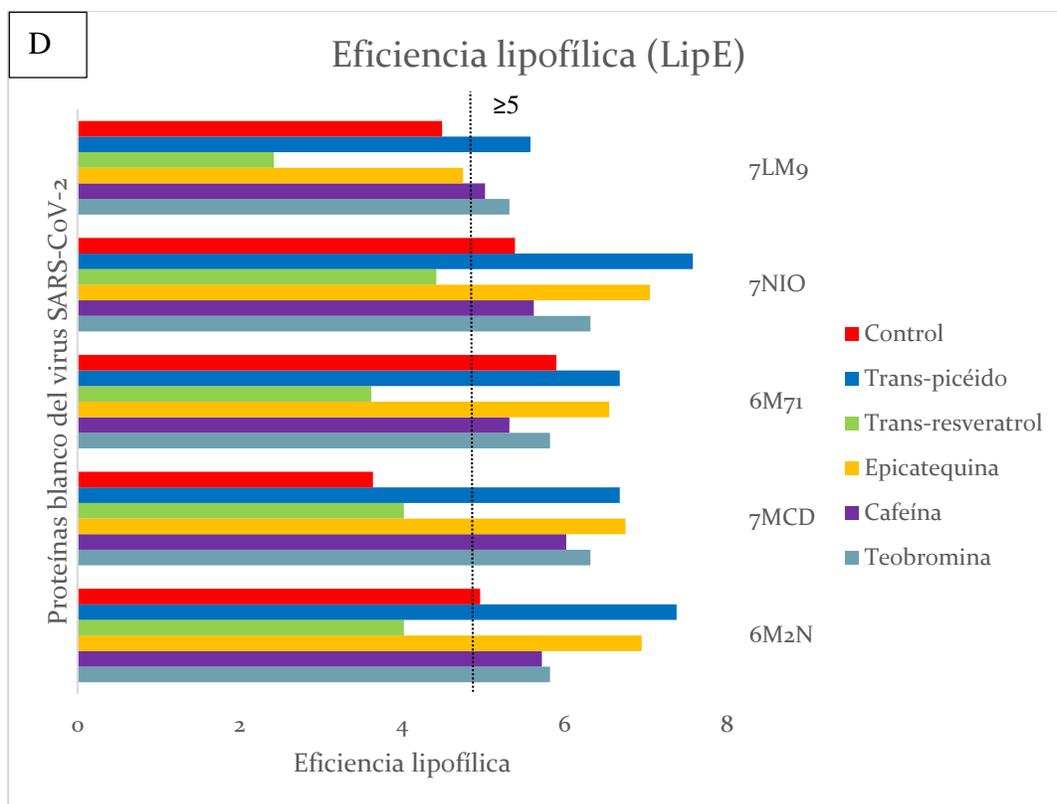
Se logra observar que, respecto al índice de eficiencia de ligando, las metilxantinas (la cafeína y la teobromina) logran tener valores mayores superando al valor referencial de 27. Los complejos de proteína-ligando formados por la proteinasa tipo papaína (7CMD) y la proteinasa 3CLpro (6M2N) muestran valores altos de IEL para los metabolitos secundarios del cacao del ensayo elaborado excepto la molécula de transpicéido que se encuentra bajo el valor referencial (Figura 4.B.).

Figura 4

Métricas de eficiencia de ligando de los complejos ligando-proteína formados por los metabolitos secundarios del cacao fino de aroma con las proteínas blanco de SARS-CoV-2. A) Eficiencia de ligando (EL); B) Índice de eficiencia de ligando (IEL); C) Índice de eficiencia de superficie (IES); D) Eficiencia Lipofílica (LipE). 6M2N: Proteínasa 3CLpro; 7CMD: Proteínasa tipo papaína; 6M71: ARN polimerasa; 7NIO: Helicasa; 7LM9: Glicoproteína spike







En el caso del índice de eficiencia de superficie, los complejos ligando-proteína tienen valores menores al valor de referencia (IES \approx 18), excepto el complejo 7CMD: trans-picéido con un valor de 18.7 (Figura 4.C.). Para la eficiencia lipofílica, el trans-resveratrol y los controles no superan el valor de referencia (LipE: 5-7), mientras que el resto de complejos formados sí (Figura 4.D.).

Las métricas generadas de la eficiencia del ligando nos indican que la mejor eficiencia lograda en los complejos formados con la proteinasa tipo papaína (7CMD). De la misma manera, la proteinasa 3CLpro (6M2N) representa índices altos. Así también, se denota que en el caso de la proteína spike las métricas demuestran que las moléculas del cacao no aportan al ligamiento en el complejo proteína-ligando.

Interacciones de los complejos ligando-proteína generados por Autodock Vina

El análisis de interacción con las proteínas del virus SARS-CoV-2 en Chimera 1.16 donde se evaluó los enlaces formados en los complejos ligando-proteína, utilizando como referencia los sitios de unión establecidos en el protocolo (Gupta *et al.*, 2020). Se realizó el docking con el control individual para cada proteína y se delimitó un área de trabajo única para cada proteína.

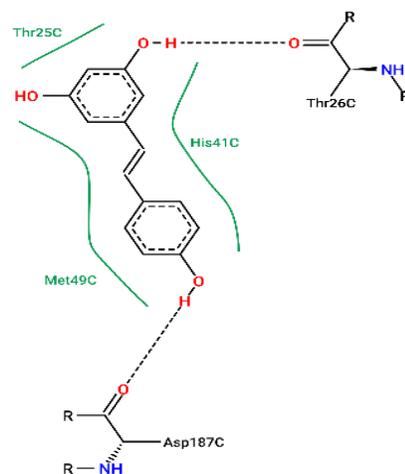
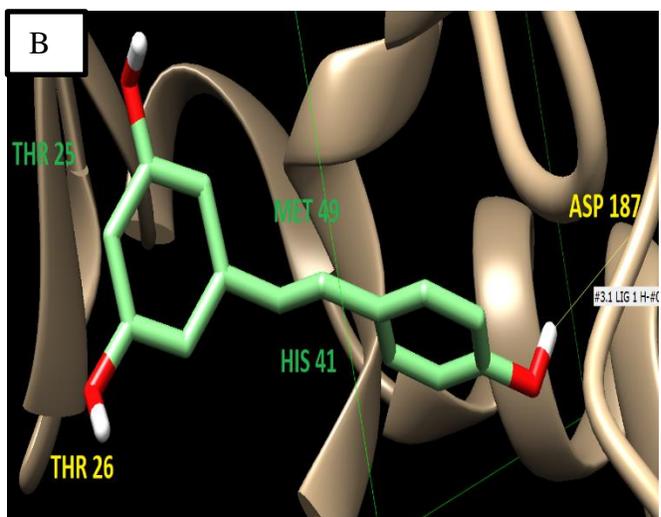
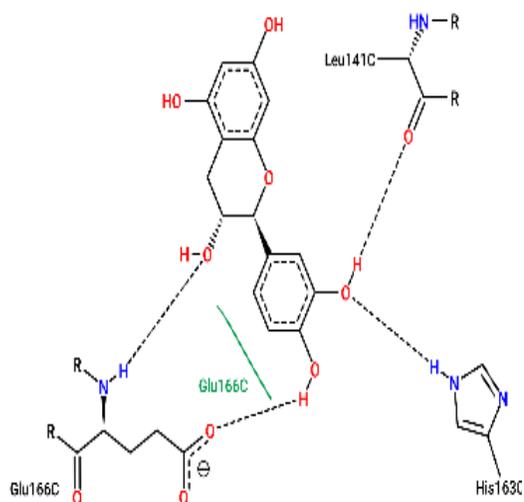
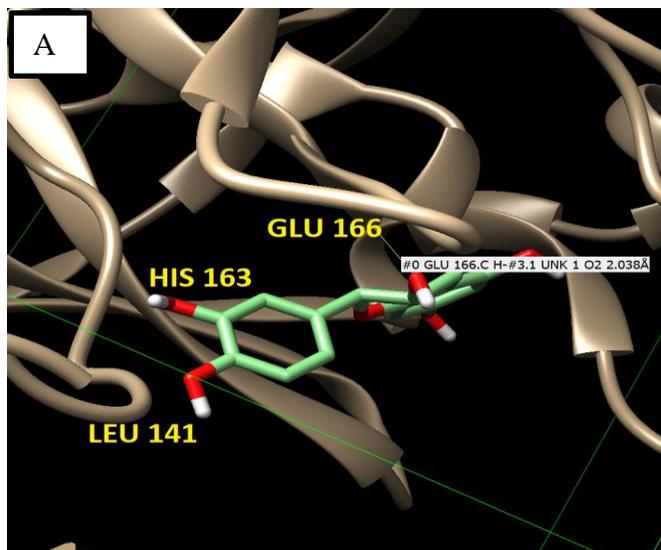
Las conformaciones estructurales en 3D se generaron del ensayo de docking molecular a través de USCF Chimera 1.16 donde se visualizó las interacciones entre los residuos de aminoácidos de los sitios de unión de las proteínas del ensayo con los metabolitos del cacao fino y de aroma. Para visualizar las interacciones más claras, se utilizó PyMol para obtener diagramas en 2D del complejo formado, sin embargo, las imágenes renderizadas no permitían una lectura clara. Por lo que se optó el uso de la plataforma de ProteinPlus con la aplicación PoseView, encargada de crear diagramas 2D acorde a la convención química.

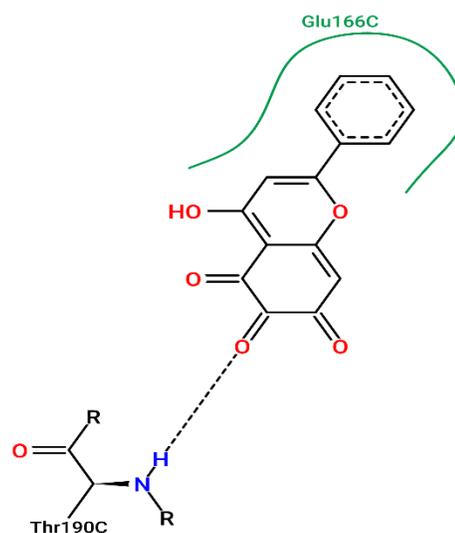
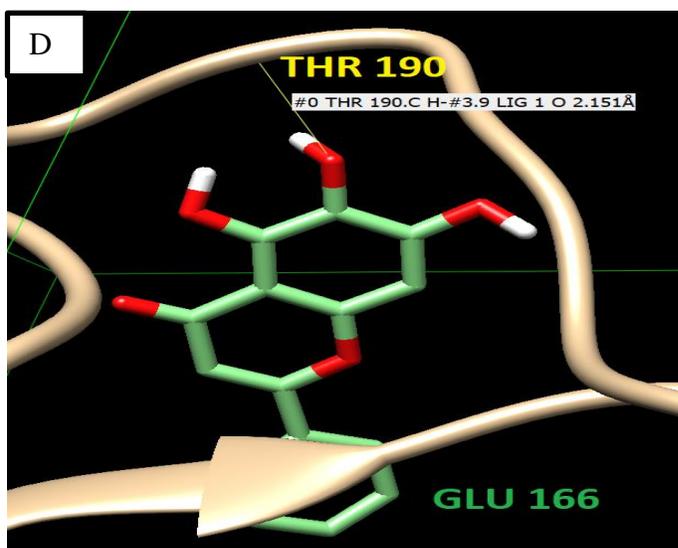
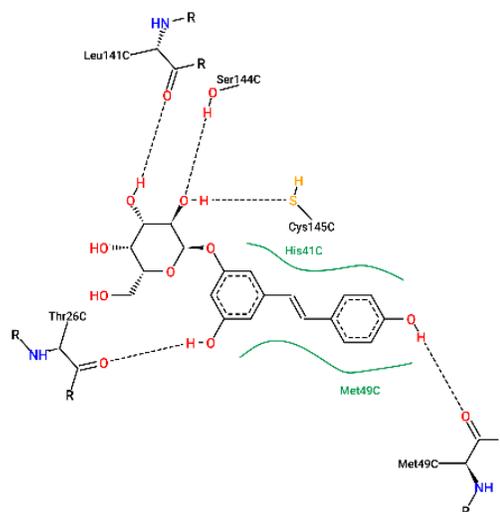
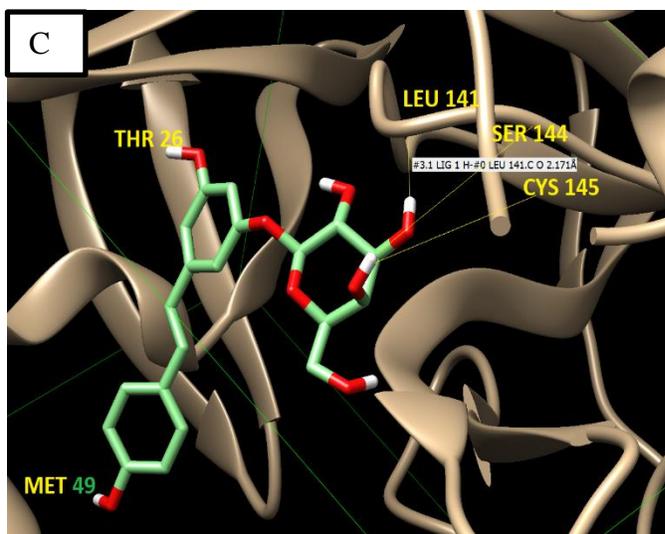
Las imágenes de las conformaciones en 2D muestran los enlaces directos entre proteína y ligando dibujados con líneas punteadas de color negro y los contactos hidrofóbicos son representados con líneas estriadas de color verde donde se resalta las partes hidrofóbicas del ligando y se etiqueta al residuo contactado.

Las interacciones con la proteinasa 3CLpro mostraron una fuerte unión con HIS 163 presentándose en epicatequina y en el control de bacaleína. Otras interacciones polares compartidas entre los complejos fueron la GLU 166, THR 26, MET 49. Las interacciones hidrofóbicas presentes fueron HIS 41, THR 25, MET 49, GLU 166. De las cuales la HIS 41, se encontró en la interacción de los complejos formados con trans-resveratrol y trans-picéido.

Figura 5

Interacciones moleculares de complejos ligando proteína con la proteinasa 3CLpro (PDB: 6M2N) en conformación 3D y 2D. A) epicatequina, B) *trans*-resveratrol, C) *trans*-piceído, D) control: baicaleína





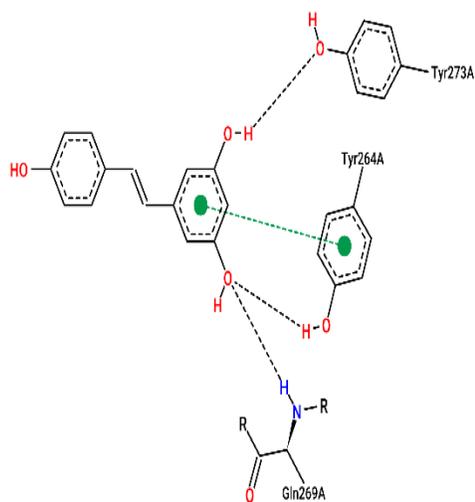
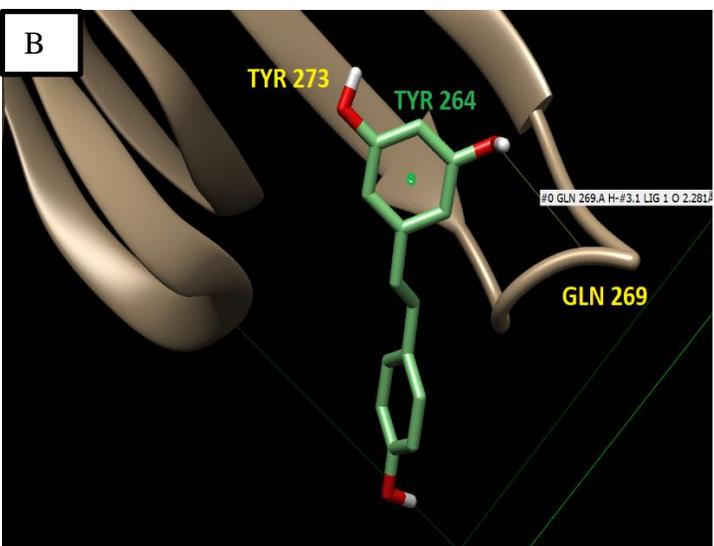
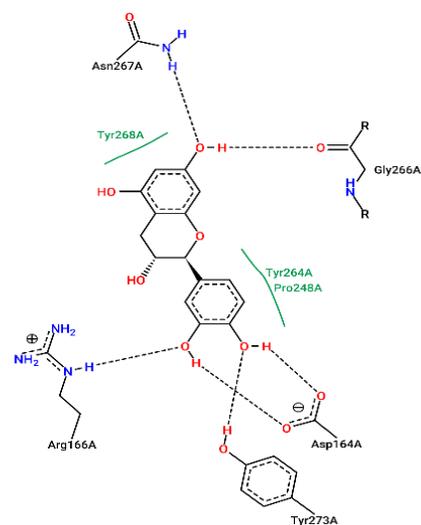
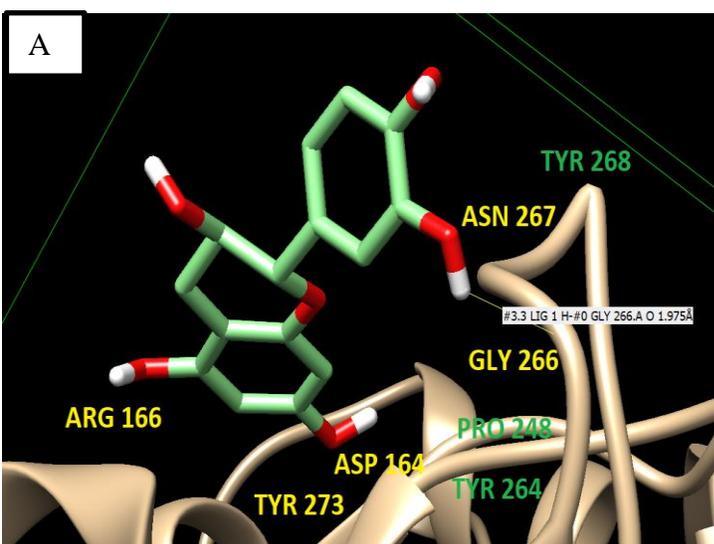
Respecto a las interacciones con la proteinasa tipo papaína PLpro todas obtuvieron una interacción hidrofóbica con el residuo TYR 264. Otras interacciones hidrofóbicas de los ligandos fueron la TYR 268, PRO 248, ASP 164, GLN 269. Se observa interacciones no covalentes (π - π) entre los anillos aromáticos del trans-resveratrol y el trans-picéido con el residuo TYR 264.

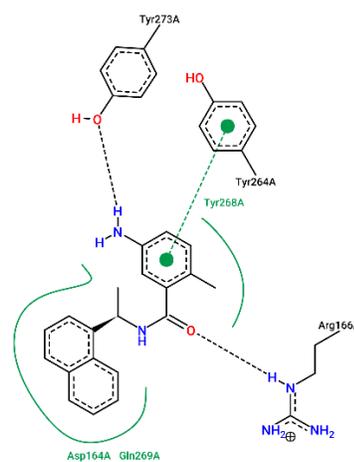
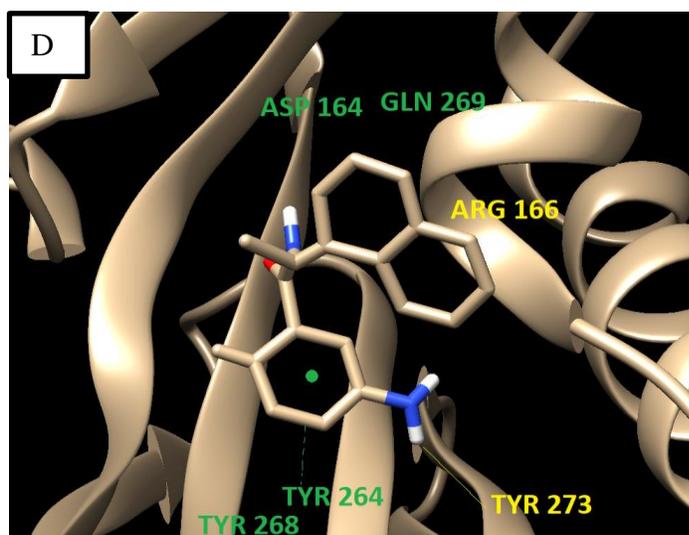
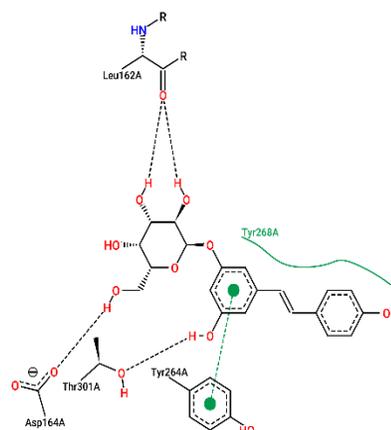
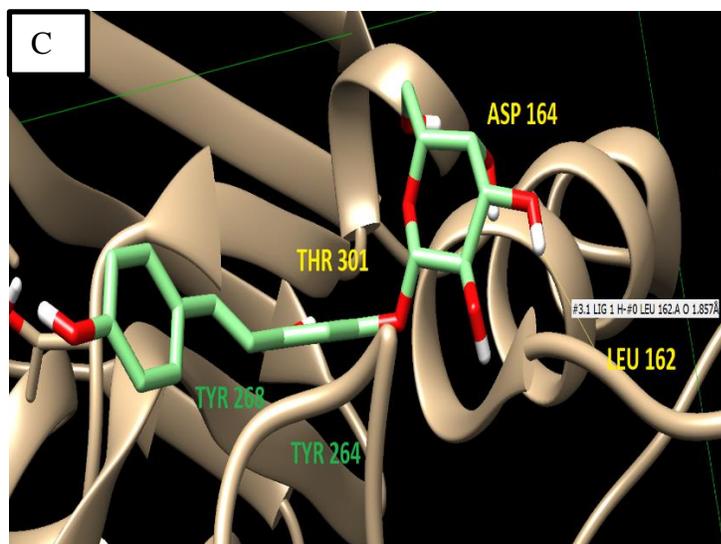
Los enlaces polares formados con la epicatequina fueron dados con los residuos de GLY 266, ASN 267, ASP 164, TYR 273, ARG 166. Con el trans-resveratrol, hubo interacción con TYR 264, TYR 263, GLN 269. Respecto al trans-picéido, se dio lugar a enlaces con los

residuos THR 301, ASP 164, LEU 162. Por último, el control: TTT, formo enlaces covalentes con los residuos TYR 273, ARG 166, TYR 264.

Figura 6

Interacciones moleculares de complejos ligando proteína con la proteinasa tipo papaína (PDB: 7CMD) en conformación 3D y 2D. A) epicatequina, B) trans-resveratrol, C) trans-piceido, D) control: TTT





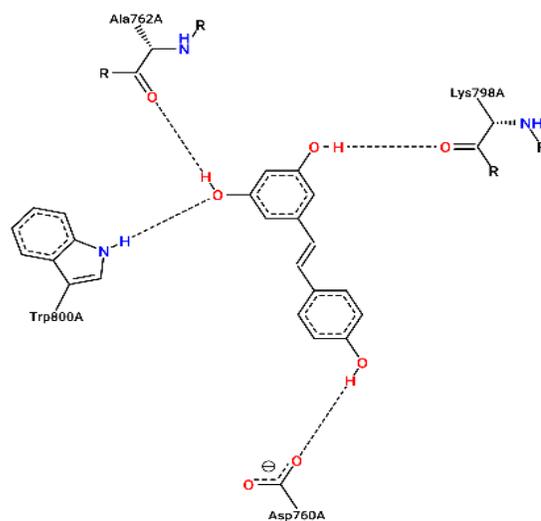
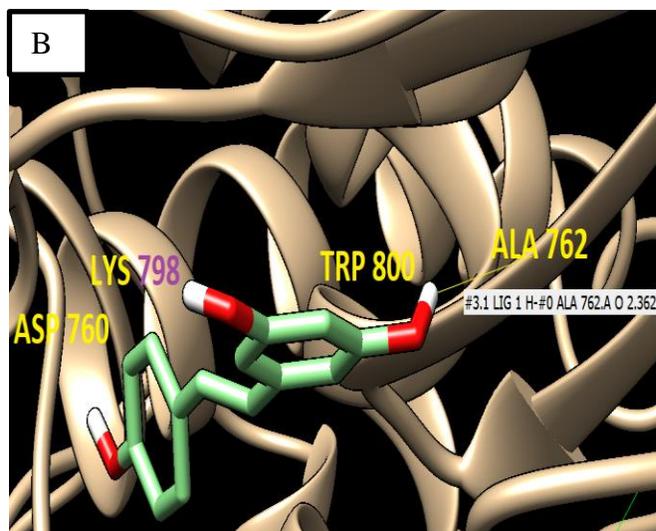
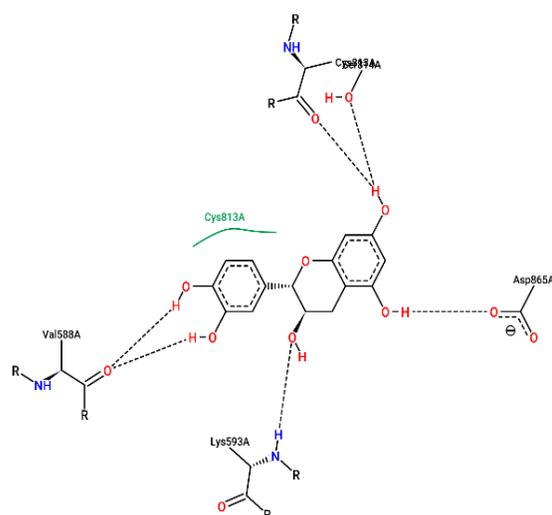
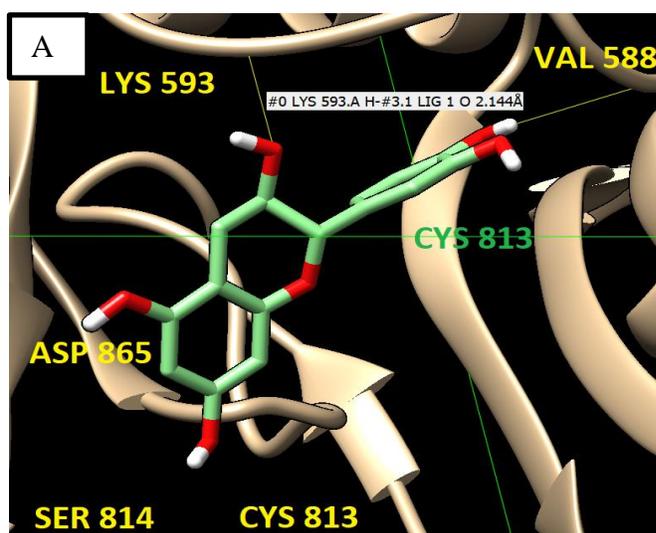
La ARN polimerasa RdRp tuvo interacciones hidrofóbicas del residuo CYS 813 con la epicatequina, el residuo ASP 761 con el trans-piceído y los residuos PRO 620 y ASP622 con la molécula control de remdesivir.

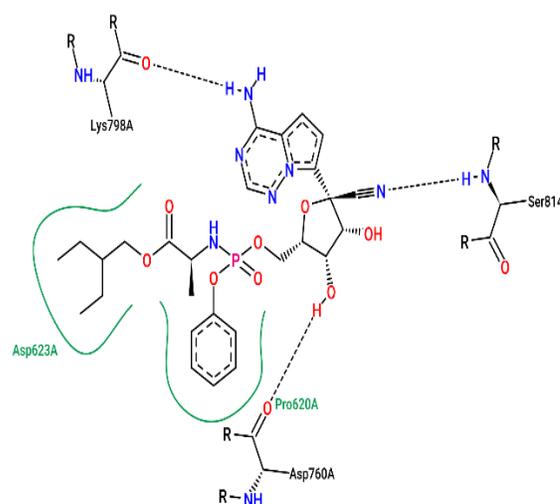
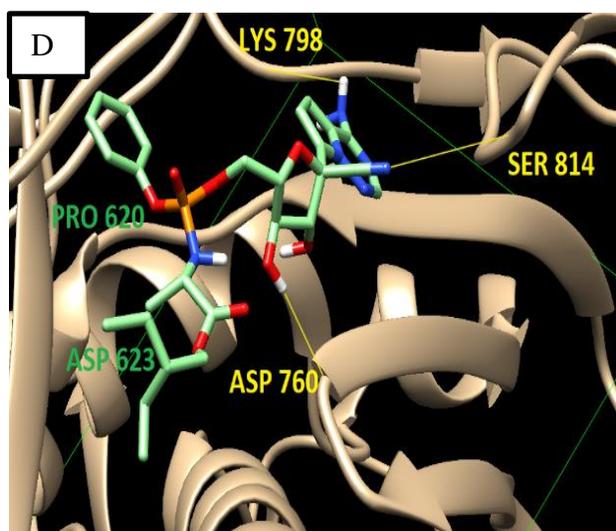
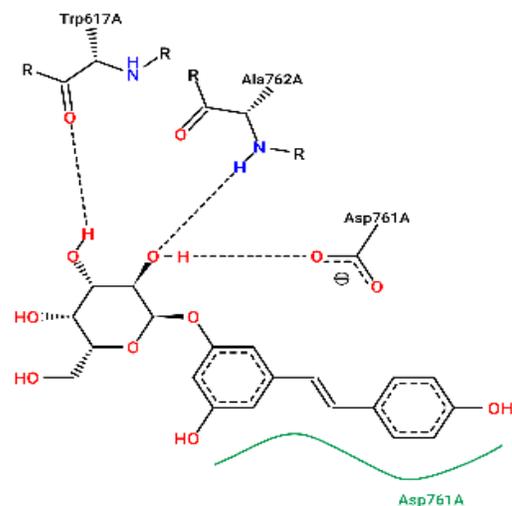
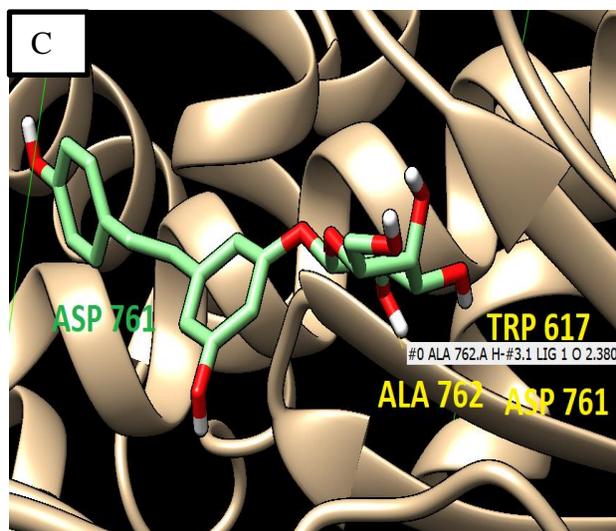
Los enlaces polares formados entre los residuos y la epicatequina fueron dados con CYS 813, SER 814, ASP 865, LYS 593, VAL 588. Con la molécula de trans-resveratrol, se formó enlaces con ALA 762, LYS 798, TRP 800, ASP 760. Respecto a la molécula de trans-piceído, se dio lugar a enlaces con los residuos ASP 761, ALA 762, TRP 617. Por último, el

control con remdesivir, forma enlaces covalentes con los residuos de aminoácido de LYS 798, SER 814, ASP 760.

Figura 7

Interacciones moleculares de complejos ligando proteína con la ARN polimerasa dependiente de ARN RdRp (PDB: 6M71) en conformación 3D y 2D. A) epicatequina, B) trans-resveratrol, C) trans-piceido, D) control: remdesivir





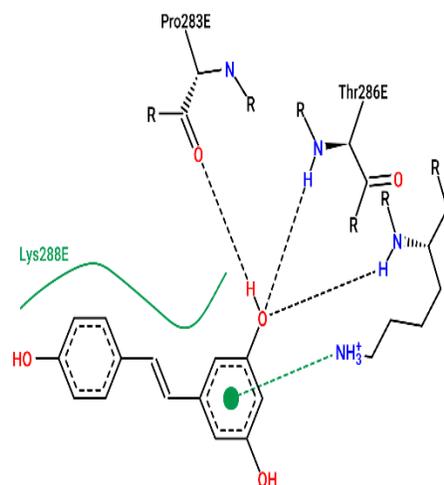
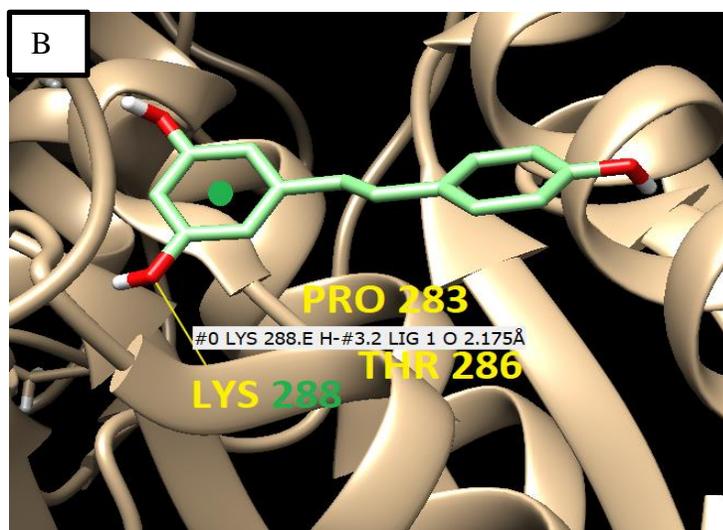
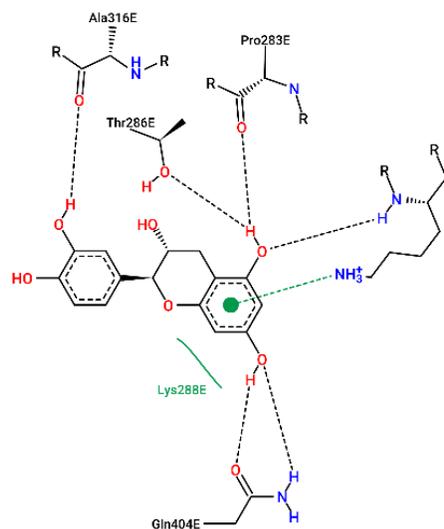
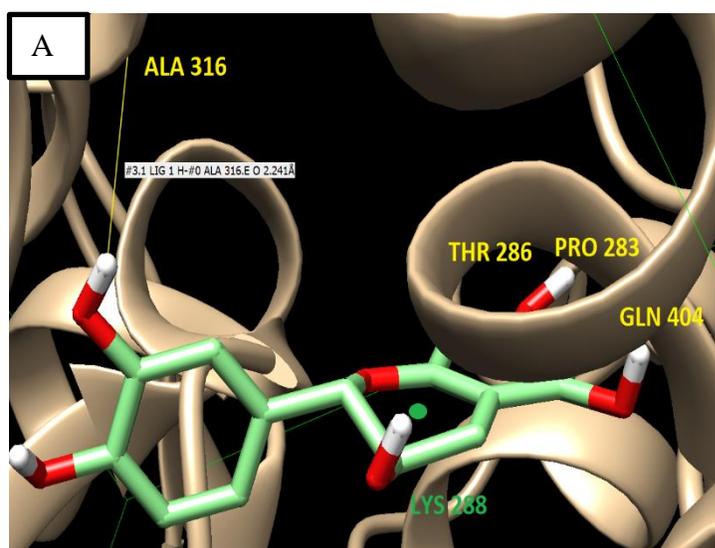
La helicasa, proteína blanco del virus del SARS-CoV-2, presentó interacciones hidrofóbicas con su residuo LYS 288 para epicatequina y trans-resveratrol. Otras interacciones hidrofóbicas de los ligandos fueron la ARG 442 con el trans-picéido; GLU 319 y ALA 316 con el control de amenamevir.

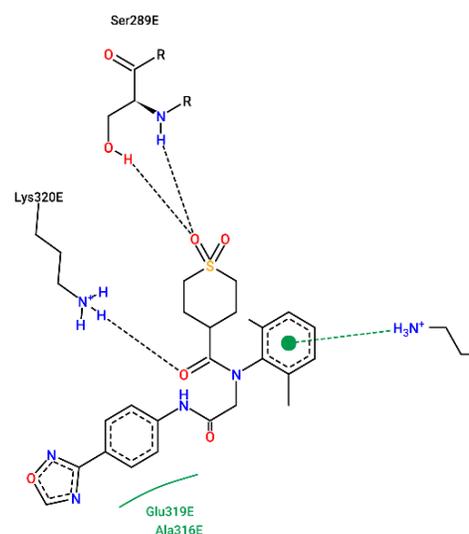
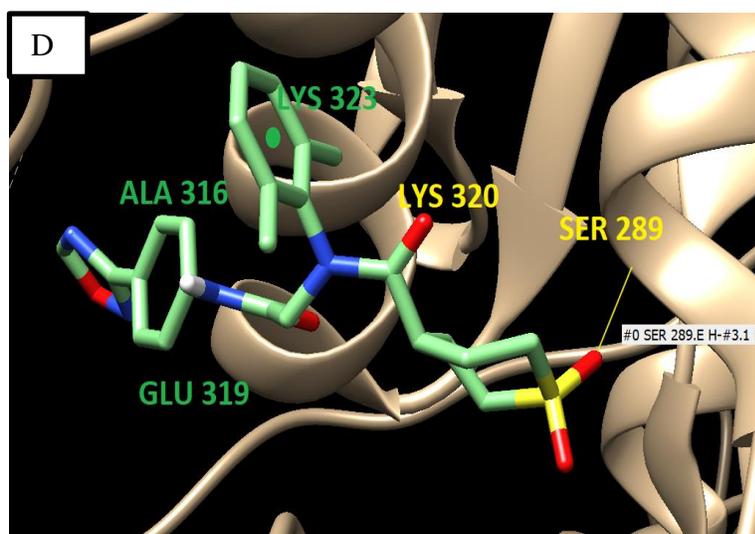
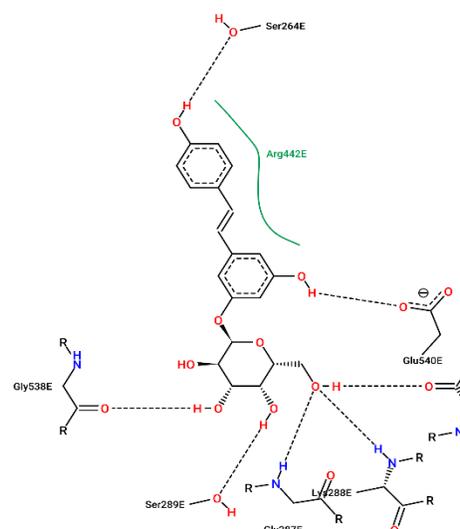
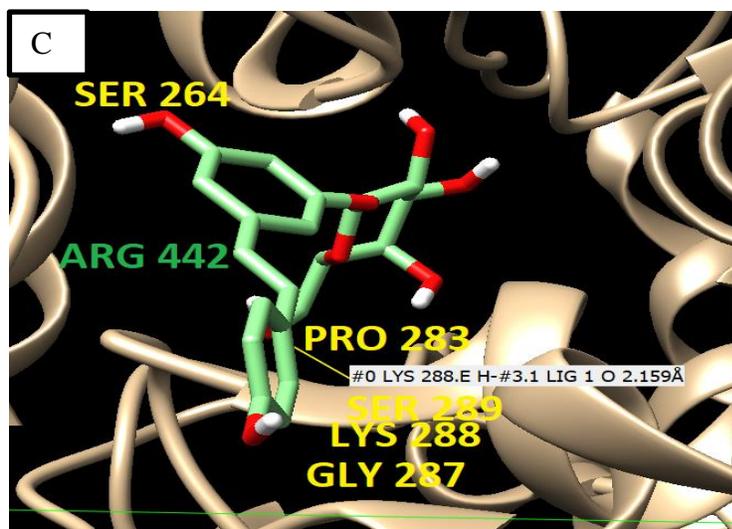
La epicatequina formo enlaces de naturaleza polar con los residuos de LYS 288, PRO 283, THR 286, ALA 316, GLN 404. Para el trans-resveratrol, hubo interacción con PRO 283, THR 286, LYS 288. En cuanto al trans-picéido, se observó enlaces con los residuos SER 264,

PRO 283, GLY 287, LYS 288, SER 289, GLY 538, GLU 540. El control: amenamevir, forma enlaces covalentes con los residuos SER 289, LYS 320, LYS 323.

Figura 8

Interacciones moleculares de complejos ligando proteína con la helicasa (PDB: 7NIO) en conformación 3D y 2D. A) epicatequina, B) trans-resveratrol, C) trans-piceido, D) control: amenamevir.



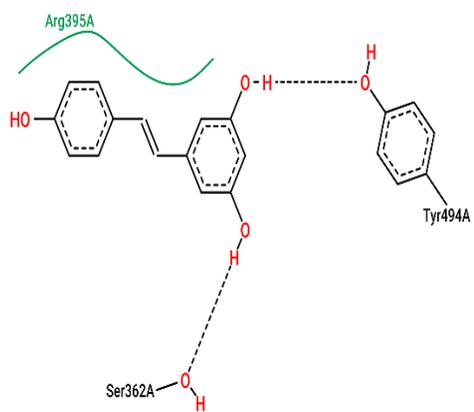
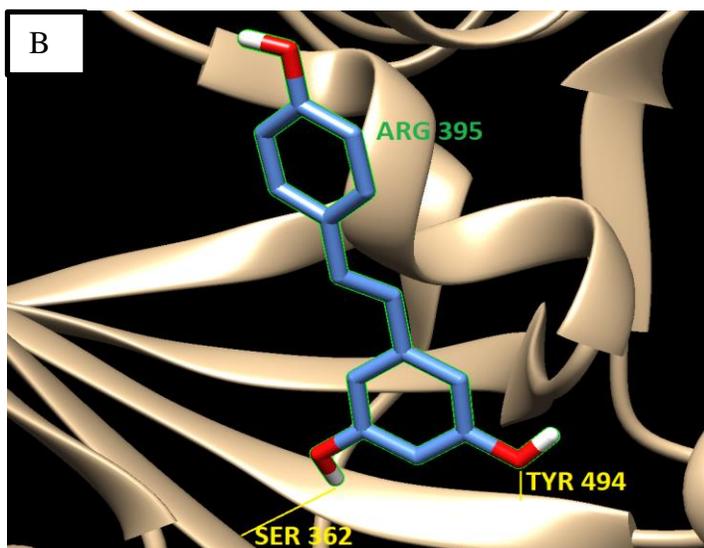
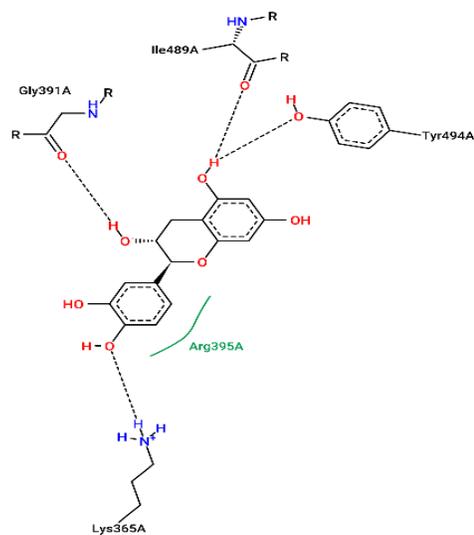
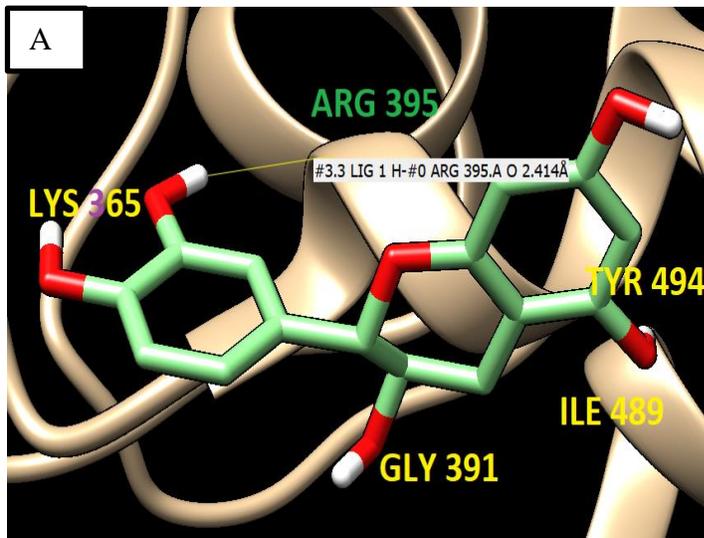


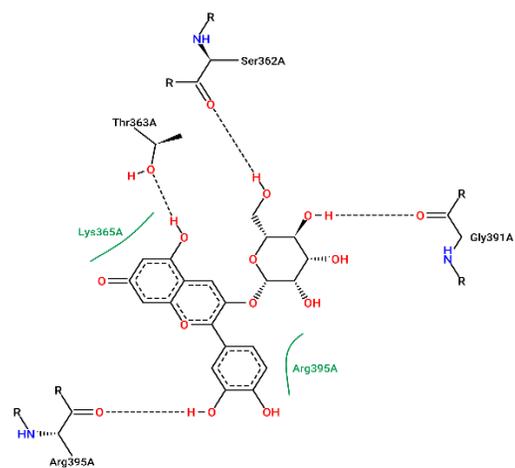
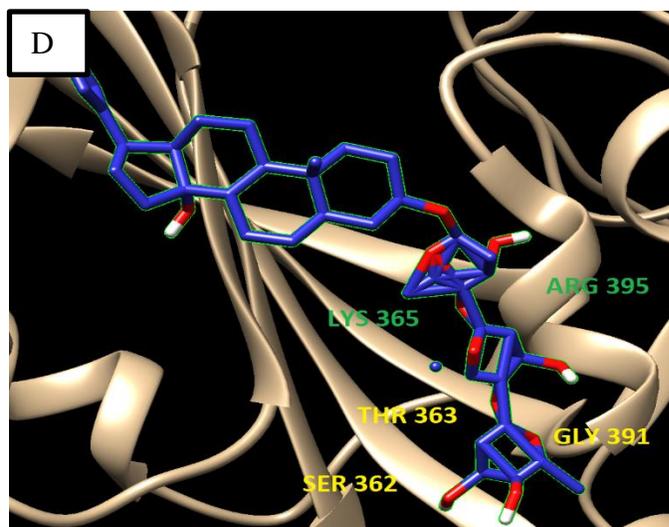
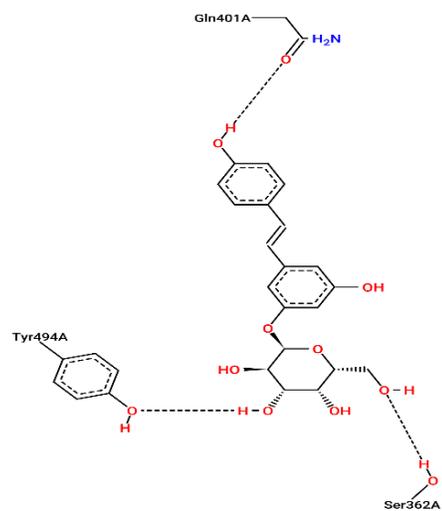
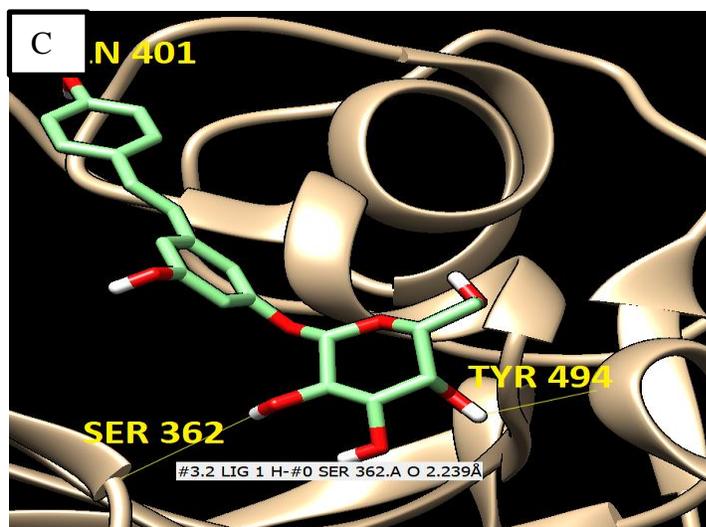
La glicoproteína spike con su residuo ARG 395 encontró interacciones hidrofóbicas con la epicatequina y el trans-resveratrol. En el caso del control de digitoxina, se observó que las interacciones hidrofóbicas se dieron con los residuos LYS 365 y ARG 395.

La formación de enlaces polares con los ligandos se mostró de la siguiente manera: la epicatequina formo enlaces con los residuos de LYS 365, GLY 391, ILE489, TYR 494, el trans-resveratrol, tuvo interacción con TYR 494 y SER 362. Respecto al trans-picéido, los enlaces se formaron con los residuos SER 362, GLN 401, TYR 494. Por último, el control con digitoxina, formo enlaces polares con los residuos GLY 391, ARG 395, SER 362, THR 363.

Figura 9

Interacciones moleculares de complejos ligando proteína con la glicoproteína spike (PDB: 7LM9) en conformación 3D y 2D. A) epicatequina, B) trans-resveratrol, C) trans-piceido, D) control: digitoxina





Capítulo V: Discusión

Los bioactivos de origen natural están emergiendo como una fuente de agentes antivirales, y ha sido considerado en la pandemia emergente de la enfermedad del COVID-19 (Ang *et al.*, 2020). Existen estudios *in vitro* que demuestran que moléculas como flavonoides han resultado eficientes en la inhibición de la replicación viral, tal como la naturaleza de los compuestos seleccionados del cacao variedad Nacional, en el caso de la epicatequina (Ferreira *et al.*, 2018; Parvez *et al.*, 2022; Takahashi *et al.*, 2021), el trans-resveratrol (Abba *et al.*, 2015) y el trans-picéido (Song *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021).

Las cianidinas y procianidinas también han demostrado ser moléculas con función biológica como antiviral al inhibir proteasas críticas para la replicación del virus (Ghildiyal *et al.*, 2020; Mohammadi Pour *et al.*, 2019). Las metilxantinas no presentan actividad antiviral *in vivo*, sin embargo, se ha encontrado su potencial como inhibidor contra SARS-CoV-2 (*in silico*) así como adyuvante para tratamiento COVID-19 (Monji *et al.*, 2020; Rolta *et al.*, 2022). Por tanto, los metabolitos secundarios del cacao (*Theobroma cacao* L.) son buenos candidatos para el acoplamiento molecular con proteínas blanco del virus SARS-CoV-2.

Las propiedades fisicoquímicas de las moléculas influyen directamente en la biodisponibilidad como fármaco, la permeabilidad en el metabolismo y en la capacidad de excreción. La biodisponibilidad es un parámetro que representa la fracción de un fármaco administrado oralmente que llega al sistema circulatorio sin cambiar su forma molecular (Dahlgren & Lennernäs, 2019). Para ganar biodisponibilidad, el fármaco necesita ser soluble y estable en el lumen intestinal, por lo que modelos de absorción gastrointestinal permiten predecir y optimizar la dosificación y distribución de medicamentos (Roos *et al.*, 2017). Modelos como los de la plataforma Swiss ADME permiten un fácil análisis global de la naturaleza química de moléculas además de su farmacocinética.

La interacción antagonista de un inhibidor con un receptor proteico, como lo son las proteínas blanco del virus, no puede garantizar que su función biológica pueda ser ejercida en el metabolismo, por lo cual el análisis ADME (absorción, distribución, metabolismo, excreción) de los ligandos es importante. Muchas moléculas pueden tener afinidad a las proteínas blanco, pero al tener características ADME pobres, así como una toxicología desfavorable en un sistema biológico genera el veto inmediato de la molécula como fármaco (Vugmeyster *et al.*, 2012). Una forma de evaluar, es a través de las reglas de Lipinski. Las reglas de Lipinski cubre la lipofilicidad (coeficiente partición octanol-agua, LogP), número de donadores y aceptores de enlace hidrógeno y peso molecular, además en el mercado es deseable el cumplimiento de dichos criterios (Ntie-Kang *et al.*, 2019; Pollastri, 2010).

Los compuestos naturales no necesariamente cumplen todos los criterios de las reglas de Lipinski, sin embargo, una gran parte de librerías de compuestos naturales son usados como cabeza de serie para el desarrollo de fármacos (Zhang & Wilkinson, 2007). Estudios señalan que en las librerías de compuestos naturales, solo el 10% viola más de dos criterios, lo que hace de aquellas moléculas pilares ideales para un nuevo fármaco (Lee & Schneider, 2001; Ntie-Kang *et al.*, 2019). De los ocho metabolitos secundarios del cacao fino y de aroma, tres moléculas (procianidina B1, cianidin-3-arabinósido y cianidin-3-galactósido) incumplieron dos o más parámetros de “drug-likeness”.

Otro indicativo del comportamiento farmacológico que se puede predecir de los resultados de Swiss ADME, es el demostrado en la Figura 2, donde se representa de manera descriptiva y discriminante regiones de pobre (zona gris) o mejor absorción (zona blanca y amarilla) basado en la lipofilicidad y polaridad, descritas por el coeficiente de partición octanol-agua (LogP) y el área polar de superficie (PSA), respectivamente (Daina & Zoete, 2016). En la Figura 2, las antocianinas y la procianidina no se encuentran en la zona de lipofilicidad y

solubilidad idónea para ser absorbido por el intestino, en su administración oral. El resto de moléculas demuestran tener solubilidad idónea para ser absorbido vía oral.

La barrera sangre-cerebro es uno de los mayores obstáculos en el desarrollo de fármacos que deben llegar a zonas del sistema nervioso central (Dahlgren & Lennernäs, 2019). Teniendo en cuenta que la enfermedad del COVID-19 es una enfermedad multisistémica que afecta órganos tales como pulmones, riñón, cerebro, entre otros (Generoso *et al.*, 2021; Tiwari *et al.*, 2021); resulta deseable que las moléculas para tratamiento puedan actuar contra la replicación del virus en el metabolismo. En este caso, la molécula de trans-resveratrol cumple con la condición de ser permeable a la barrera sangre-cerebro, así como su absorción vía intestino, además de cumplir los parámetros de Lipinski como los flavonoides y metilxantinas candidatas al ensayo de docking molecular.

El filtro realizado con las predicciones de las características farmacocinéticas permitió seleccionar las moléculas idóneas para ser administradas en el tratamiento antiviral de SARS-CoV-2, las cuales fueron las metilxantinas (cafeína y teobromina) y los flavonoides (epicatequina, trans-resveratrol y trans-piceido). Sin embargo, las antocianinas y la procianidina son descartadas de las evaluaciones contiguas pues dentro de las predicciones existen violaciones a las reglas de Lipinski además de tener una absorción pobre en el metabolismo.

El docking molecular se llevó a cabo utilizando las moléculas preseleccionadas junto a las proteínas blanco del SARS-CoV-2, donde se calculó la energía de afinidad de los complejos ligando-proteína formados a partir de la simulación. Los modelos generados por Autodock Vina, arrojaron modelos con similitudes entre sí (Apéndice 1) con valores de RMSD que varían en un rango de 1.3 a 15, lo cual es una medida de calidad de reproducción del ensayo, siendo ideal los modelos con RMSD menores a 3 (Ferreira *et al.*, 2015).

El modelamiento por docking nos muestran en su resultado la energía de afinidad dada en unidades de kcal/mol, el cual nos indica que los valores más bajos representan mayor afinidad en el complejo proteína-ligando. El valor de energía de afinidad corresponde a la energía libre de Gibbs (Berry *et al.*, 2015).

Para el análisis de acoplamiento, se consideró a las moléculas de control como el punto de partida para comparar la fuerza del enlace formado con los diferentes ligandos. Las moléculas control de la proteinasa 3CLpro (baicaleína) y la proteinasa tipo papaína PLpro (TTT) correspondían a la estructura cristalográfica ingresada en la base de datos de PDB, es decir las moléculas se encontraban ligadas a la proteína al ser detectada por rayos X (RCSB Protein Data Bank, 2020b, 2020a). Mientras que las moléculas control de ARN polimerasa dependiente de ARN, la helicasa y la glicoproteína spike corresponden a estructuras con capacidad de inhibición de dichas moléculas en particular (Cho *et al.*, 2022; Freidel & Armen, 2021; Gupta *et al.*, 2020; Raubenolt *et al.*, 2022).

Los complejos ligando-proteína simulados mostraron la formación de interacciones hidrofóbicas asociadas con los parches hidrofóbicos de la superficie de las moléculas. A su vez, las interacciones polares entre moléculas también fueron ocurrentes en todos los complejos ligando-proteína. Las interacciones π - π , superposición de anillos aromáticos, son interacciones no covalentes observadas entre ligandos y proteína (Petukh *et al.*, 2013). Esta variación de fuerza de Van der Waals, fue observada entre el trans-picéido, trans-resveratrol y el control TTT con el residuo TYR 264 de la proteinasa tipo papaína.

La proteína 3CLpro es una proteasa de cisteína de tres dominios que juega un rol importante en la transcripción viral y replicación. Para la función catalítica de la proteína, los aminoácidos clave son: CYS 145, GLU 166 e HIS 41 (Gao *et al.*, 2020). En este caso, se observó la formación de enlace de hidrógeno con los residuos clave de 3CLpro con la

epicatequina (GLU 16), el trans-resveratrol (HIS 41) y trans-picéido (CYS 145). Además, los complejos formados con la proteinasa 3CLpro obtuvieron una energía de afinidad similar al control, con -7.2 kcal/mol, donde el trans-picéido superó dicho valor al obtener una energía de afinidad de -8 kcal/mol. Por lo cual, las interacciones del trans-picéido tendrían capacidad de inactivar los residuos clave de la proteinasa 3CLpro.

Otros complejos con mejor energía de afinidad, Figura 3, fueron formados con la helicasa (7NIO) y la proteinasa tipo papaína (PLpro) con valores mayores a -5.7 kcal/mol, las moléculas de epicatequina y trans-picéido logran equiparar los valores del control con afinidades de alrededor de -7.7 a -8.2 kcal/mol. Estructuras como la helicasa y la proteinasa tipo papaína, son un objetivo particularmente atractivo para ser bloqueados, son ideales pues su estructura es bien conservada entre otros virus de la familia de los Nidovirales (Cho *et al.*, 2022; Freidel & Armen, 2021; Osipiuk *et al.*, 2021).

Además, se observó que el complejo formado por la epicatequina con la proteinasa 6M2N, Figura 5, tuvo enlaces de puentes de hidrógeno con residuos de aminoácidos GLU 166, LEU 141 e HIS 163, los cuales pertenecen al sitio de unión de la proteinasa 3CLpro (Gupta *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020). Por tanto, se consideraría que la epicatequina actuaría como inhibidor con capacidad de bloquear a las proteinasas del virus al interactuar con aminoácidos críticos en la estructura de la proteína.

La ARN polimerasa dependiente de ARN es un complejo encargado de la mediación de la replicación, su objetivo es transcribir el ADN en ARN (Ahn *et al.*, 2012). El sitio activo catalítico de RdRp se encuentra en el subdominio de la palma, en los residuos 759 a 761 en el motif C formando un centro catalítico activo (Yin *et al.*, 2020). En el ensayo de docking molecular, se observó la interacción con los residuos catalíticos ASP 760 (trans-resveratrol) y ASP 761 (trans-picéido). La energía de afinidad de los complejos formados nos indica que las

moléculas de epicatequina y trans-picéido siguen el comportamiento de las proteínas anteriormente mencionadas, equiparando los valores con la referencia de control, permitiendo deducir la capacidad inhibitoria de la ARN polimerasa, estructura clave del virus

La glicoproteína spike arrojó los valores de energía de afinidad más bajos, las métricas de eficiencia de ligando menos eficientes además presentó enlaces con residuos de aminoácidos que no correspondían al sitio de unión identificado. El dominio de unión al receptor se encuentra ubicado entre los residuos 449 a 510 (Gupta *et al.*, 2020). De los cuales, se observó que el residuo TYR 494 es el único que interactuó con los ligandos. Demostrando la poca especificidad del *grid size* utilizado como referencia para el ensayo de docking molecular.

Las métricas de eficiencia de ligando se utilizan como descriptores moleculares en el descubrimiento de fármacos, los valores son utilizados como guía mas no como discriminante de las moléculas evaluadas (Hopkins *et al.*, 2014). El uso de medidas como el número de átomos así como otras medidas dependientes del tamaño molecular permite homogeneizar a los componentes dejando a un lado su tamaño y propiedades de ligamiento (Polanski *et al.*, 2017), por lo cual se utilizó los índices de eficiencia de ligando (IEL), índice de eficiencia de superficie (IES) y eficiencia de ligando (EL).

Una métrica alternativa que utiliza LogP, como sustituyente del conteo de átomos pesados, es la eficiencia lipofílica (LipE) y se utiliza para permitir una comparación entre moléculas diferentes en tamaño o lipofilidad (Hopkins *et al.*, 2014). Lo que permite contrastar valores entre las métricas teniendo en consideración la capacidad de los ligandos analizados.

Dentro del análisis de la eficiencia del ligando se propone que el valor tolerable para candidatos a fármacos debe ser mayor a 0.3 kcal/mol, mientras que el índice de eficiencia de ligando sea similar a 27 (Arnott & Planey, 2012). Acorde a los valores de referencia, se observa que, luego de la epicatequina, los alcaloides de cafeína y teobromina alcanzan dichos valores.

Sin embargo, la energía de afinidad, Figura 3, no alcanza los valores del control de ninguno de los complejos formados. Significando que la cafeína y la teobromina tienen capacidad de unirse efectivamente al sitio catalítico, como lo considerado por Rolta y otros (2022), pero no son idóneos para desempeñar la inhibición de las proteínas blanco del SARS-CoV-2.

La eficiencia lipofílica de las moléculas puede ser contrastada con los resultados del diagrama Egan Egg, Figura 2, donde la capacidad de ser absorbida está ligada a la lipofilicidad de la molécula. Siendo moléculas tales como el trans-picéido y la epicatequina, buenos candidatos al superar el índice referencial de 5. Uno de los objetivos, en el desarrollo de fármacos, es el mejoramiento de las propiedades farmacológicas incrementando potencia y disminuyendo lipofilicidad (Chen *et al.*, 2015).

Las moléculas de cacao fino y de aroma (*Theobroma cacao* L.) como ligandos estratégicos para la inhibición de proteínas clave del virus del SARS-CoV-2 presentaron interacciones moleculares en los sitios catalíticos activos de las proteínas.

Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

Se identificaron ocho metabolitos secundarios del cacao fino de aroma con potencial antiviral, acorde a bibliografía.

Se evaluó el potencial farmacológico de las moléculas candidatas obteniendo así que las moléculas de cafeína, teobromina, epicatequina, trans-resveratrol y trans-piceido cumplen con los parámetros de las reglas de Lipinski, lo cual representa aptitud como candidato a fármaco.

Se estimó la energía de enlace de los complejos ligando-proteína de los metabolitos secundarios del cacao con varias proteínas blanco del virus SARS-CoV-2, donde se encontró que el trans-picéido tuvo una fuerte afinidad (-8.0 kcal/mol) con la proteinasa 3CLpro, respecto al control de bacaleína (-7.2 kcal/mol). Además de tener una afinidad de -7.3 kcal/mol y -8.2 kcal/mol frente a la proteinasa tipo papaína y la helicasa, respectivamente.

El trans-resveratrol y la epicatequina secundan a la capacidad de acoplamiento con las proteínas blanco del virus del COVID-19 obteniendo una eficiencia de ligando igual de fuerte que el trans-picéido, en varios de los ensayos con las proteínas blanco, lo que perfila como buenos candidatos a desarrollo de tratamientos antivirales a partir de los mismos.

Se analizó el posicionamiento de los metabolitos secundarios del cacao en la interacción con las proteínas blanco donde se demostró que existen formación de enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos del sitio de unión, así como interacciones hidrofóbicas dentro de la zona de acoplamiento de las cinco proteínas blanco.

Las proteínas blanco que lograron mejores interacciones con los metabolitos secundarios del cacao fino de aroma fueron: helicasa, proteinasa tipo papaína y proteinasa 3CLpro.

Recomendaciones

Se recomienda el estudio de dinámica molecular de los complejos ligando-proteína para verificar la afinidad que existe entre las moléculas a lo largo del tiempo.

Se sugiere el uso de bibliotecas más amplias de metabolitos secundarios de plantas autóctonas al cual se le puede aplicar cribado para optimizar la búsqueda de metabolitos que puedan interactuar con las proteínas blanco del SARS-CoV-2.

Se considera idóneo el desarrollo de pruebas *in vitro* o *in vivo* donde se logre validar el uso de los metabolitos secundarios del cacao fino de aroma como inhibidores de proteínas blanco de SARS-CoV-2.

Capítulo VII: Referencias

- Abad-Zapatero, C. (2007). Ligand efficiency indices for effective drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(4), 469-488. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.4.469>
- Abad-Zapatero, C. (Ed.). (2013). Front-matter. En *Ligand Efficiency Indices for Drug Discovery* (pp. i-iii). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404635-1.00009-8>
- Abba, Y., Hassim, H., Hamzah, H., & Noordin, M. M. (2015). Antiviral Activity of Resveratrol against Human and Animal Viruses. *Advances in Virology*, 2015, e184241. <https://doi.org/10.1155/2015/184241>
- Afoakwa, E. (2016). *Chocolate Science and Technology* (Segunda). Wiley and Sons.
- Ahn, D.-G., Choi, J.-K., Taylor, D. R., & Oh, J.-W. (2012). Biochemical characterization of a recombinant SARS coronavirus nsp12 RNA-dependent RNA polymerase capable of copying viral RNA templates. *Archives of Virology*, 157(11), 2095-2104. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1404-x>
- Ang, L., Lee, H. W., Choi, J. Y., Zhang, J., & Soo Lee, M. (2020). Herbal medicine and pattern identification for treating COVID-19: A rapid review of guidelines. *Integrative Medicine Research*, 9(2), 100407. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2020.100407>
- Arnott, J. A., & Planey, S. L. (2012). The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(10), 863-875. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>
- Asociación Nacional de Exportadores de Cacao e Industrializados del Ecuador. (2019). Cacao Nacional, un producto emblemático del Ecuador. ANECACAO. <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional>
- Attique, S. A., Hassan, M., Usman, M., Atif, R. M., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Bilal, M., & Nawaz, M. Z. (2019). A Molecular Docking Approach to Evaluate the Pharmacological Properties of Natural and Synthetic Treatment Candidates for Use against Hypertension.

International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(6), 923.

<https://doi.org/10.3390/ijerph16060923>

- Baharum, Z., Akim, A. M., Hin, T. Y. Y., Hamid, R. A., & Kasran, R. (2016). *Theobroma cacao*: Review of the Extraction, Isolation, and Bioassay of Its Potential Anti-cancer Compounds. *Tropical Life Sciences Research*, 27(1), 21-42.
- Ballón, W. G., & Grados, R. E. (2019). Acomplamiento molecular: Criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, 7(2), 55-72.
- Berry, M., Fielding, B., & Gamielien, J. (2015). Chapter 27—Practical Considerations in Virtual Screening and Molecular Docking. En Q. N. Tran & H. Arabnia (Eds.), *Emerging Trends in Computational Biology, Bioinformatics, and Systems Biology* (pp. 487-502). Morgan Kaufmann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802508-6.00027-2>
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., & Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 218-228. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.007>
- Carranza, M., Zapata, Y., Gallego, G., Rodríguez, J., Carriel, J., Cruz, N., Medina, S., & Muñoz, J. (2020). Genetic Diversity of Ecuadorian Cocoa from the germplasm bank of Tenguel-Guayas Ecuador based in SNP's. *Bioagro*, 32(2), 75-86.
- Chen, Engkvist, O., & Kogej, T. (2015). Chapter 15—Compound Properties and their Influence on Drug Quality. En C. G. Wermuth, D. Aldous, P. Raboisson, & D. Rognan (Eds.), *The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)* (pp. 379-393). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00015-8>
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418-423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>

- Cheng, P.-W., Ng, L.-T., Chiang, L.-C., & Lin, C.-C. (2006). Antiviral effects of saikosaponins on human coronavirus 229E *in vitro*. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33(7), 612-616. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04415.x>
- Cho, C.-C., Li, S. G., Lalonde, T. J., Yang, K. S., Yu, G., Qiao, Y., Xu, S., & Ray Liu, W. (2022). Drug Repurposing for the SARS-CoV-2 Papain-Like Protease. *ChemMedChem*, 17(1), e202100455. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100455>
- Dahlgren, D., & Lennernäs, H. (2019). Intestinal Permeability and Drug Absorption: Predictive Experimental, Computational and *In Vivo* Approaches. *Pharmaceutics*, 11(8), 411. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080411>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *Chemmedchem*, 11(11), 1117-1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
- Docherty, J. J., Fu, M. M. H., Stiffler, B. S., Limperos, R. J., Pokabla, C. M., & DeLucia, A. L. (1999). Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral Research*, 43(3), 145-155. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(99\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(99)00042-X)
- Ferreira, Ferraz, A. C., Figueiredo, J. E., Lima, C. F., Rodrigues, V. G., Taranto, A. G., Ferreira, J. M. S., Brandão, G. C., Vieira-Filho, S. A., Duarte, L. P., de Brito Magalhães, C. L., & de Magalhães, J. C. (2018). Detection of the antiviral activity of epicatechin isolated from *Salacia crassifolia* (Celastraceae) against Mayaro virus based on protein C homology modelling and virtual screening. *Archives of Virology*, 163(6), 1567-1576. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3774-1>

- Ferreira, L. G., dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, *20*(7), 13384-13421.
<https://doi.org/10.3390/molecules200713384>
- Foloppe, N., & Hubbard, R. (2006). Towards predictive ligand design with free-energy based computational methods? *Current Medicinal Chemistry*, *13*(29), 3583-3608.
<https://doi.org/10.2174/092986706779026165>
- Freidel, M. R., & Armen, R. S. (2021). Mapping major SARS-CoV-2 drug targets and assessment of druggability using computational fragment screening: Identification of an allosteric small-molecule binding site on the Nsp13 helicase. *PLoS ONE*, *16*(2), e0246181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246181>
- Gao, L.-Q., Xu, J., & Chen, S.-D. (2020). *In Silico* Screening of Potential Chinese Herbal Medicine Against COVID-19 by Targeting SARS-CoV-2 3CLpro and Angiotensin Converting Enzyme II Using Molecular Docking. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, *26*(7), 527-532. <https://doi.org/10.1007/s11655-020-3476-x>
- Ge, X.-Y., Li, J.-L., Yang, X.-L., Chmura, A. A., Zhu, G., Epstein, J. H., Mazet, J. K., Hu, B., Zhang, W., Peng, C., Zhang, Y.-J., Luo, C.-M., Tan, B., Wang, N., Zhu, Y., Cramer, G., Zhang, S.-Y., Wang, L.-F., Daszak, P., & Shi, Z.-L. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, *503*(7477), 535-538. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
- Generoso, J. S., Barichello de Quevedo, J. L., Cattani, M., Lodetti, B. F., Sousa, L., Collodel, A., Diaz, A. P., & Dal-Pizzol, F. (2021). Neurobiology of COVID-19: How can the virus affect the brain? *Revista Brasileira De Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)*, *43*(6), 650-664.
<https://doi.org/10.1590/1516-4446-2020-1488>
- Ghildiyal, R., Prakash, V., Chaudhary, V. K., Gupta, V., & Gabrani, R. (2020). Phytochemicals as Antiviral Agents: Recent Updates. En M. K. Swamy (Ed.), *Plant-derived Bioactives:*

Production, Properties and Therapeutic Applications (pp. 279-295). Springer.

https://doi.org/10.1007/978-981-15-1761-7_12

Gossen, J., Albani, S., Hanke, A., Joseph, B. P., Bergh, C., Kuzikov, M., Costanzi, E., Manelfi, C., Storici, P., Gribbon, P., Beccari, A. R., Talarico, C., Spyraakis, F., Lindahl, E., Zaliani, A., Carloni, P., Wade, R. C., Musiani, F., Kokh, D. B., & Rossetti, G. (2021). A Blueprint for High Affinity SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors from Activity-Based Compound Library Screening Guided by Analysis of Protein Dynamics. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 4(3), 1079-1095. <https://doi.org/10.1021/acspsci.0c00215>

Gupta, S., Singh, V., Varadwaj, P. K., Chakravartty, N., Katta, A. V. S. K. M., Lekkala, S. P., Thomas, G., Narasimhan, S., Reddy, A. R., & Reddy Lachagari, V. B. (2020). Secondary metabolites from spice and herbs as potential multitarget inhibitors of SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1-20.

<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1837679>

Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., Thomson, E. C., Harrison, E. M., Ludden, C., Reeve, R., Rambaut, A., Peacock, S. J., & Robertson, D. L. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 409-424. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>

Hopkins, A. L., Keserü, G. M., Leeson, P. D., Rees, D. C., & Reynolds, C. H. (2014). The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(2), 105-121. <https://doi.org/10.1038/nrd4163>

Jain, A. N. (2006). Scoring functions for protein-ligand docking. *Current Protein & Peptide Science*, 7(5), 407-420. <https://doi.org/10.2174/138920306778559395>

John Hopkins University. (2021). *COVID-19 Map*. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

Katzung, B. G. (2018). *Farmacología básica y clínica (14a. Ed.)*. McGraw-Hill Interamericana. <https://books.google.com.ec/books?id=UxRcyQEACAAJ>

- Lee, M.-L., & Schneider, G. (2001). Scaffold Architecture and Pharmacophoric Properties of Natural Products and Trade Drugs: Application in the Design of Natural Product-Based Combinatorial Libraries. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 3(3), 284-289.
<https://doi.org/10.1021/cc0000971>
- Lin, C., Tsai, F.-J., Tsai, C.-H., Lai, C.-C., Wan, L., Ho, T.-Y., Hsieh, C.-C., & Chao, P.-D. L. (2005). Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds. *Antiviral Research*, 68(1), 36-42.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.07.002>
- Lin, L., Hsu, W.-C., & Lin, C.-C. (2014). Antiviral Natural Products and Herbal Medicines. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(1), 24-35.
<https://doi.org/10.4103/2225-4110.124335>
- Lipinski, C. A. (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(1), 235-249.
[https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(00\)00107-6](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00107-6)
- Lipson, S. M., Karalis, G., Karthikeyan, L., Ozen, F. S., Gordon, R. E., Ponnala, S., Bao, J., Samarrai, W., & Wolfe, E. (2017). Mechanism of Anti-rotavirus Synergistic Activity by Epigallocatechin Gallate and a Proanthocyanidin-Containing Nutraceutical. *Food and Environmental Virology*, 9(4), 434-443. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9299-z>
- Liu, Y., Liang, C., Xin, L., Ren, X., Tian, L., Ju, X., Li, H., Wang, Y., Zhao, Q., Liu, H., Cao, W., Xie, X., Zhang, D., Wang, Y., & Jian, Y. (2020). The development of Coronavirus 3C-Like protease (3CLpro) inhibitors from 2010 to 2020. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 206, 112711. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112711>
- Mohammadi Pour, P., Fakhri, S., Asgary, S., Farzaei, M. H., & Echeverría, J. (2019). The Signaling Pathways, and Therapeutic Targets of Antiviral Agents: Focusing on the Antiviral Approaches and Clinical Perspectives of Anthocyanins in the Management of

- Viral Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1207.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01207>
- Monji, F., Al-Mahmood Siddiquee, A., & Hashemian, F. (2020). Can pentoxifylline and similar xanthine derivatives find a niche in COVID-19 therapeutic strategies? A ray of hope in the midst of the pandemic. *European Journal of Pharmacology*, 887, 173561.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173561>
- Muhammed, Y. (2020). Molecular targets for COVID-19 drug development: Enlightening Nigerians about the pandemic and future treatment. *Biosafety and Health*, 2(4), 210-216.
<https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.07.002>
- Niemeyer, D., Mösbauer, K., Klein, E. M., Sieberg, A., Mettelman, R. C., Mielech, A. M., Dijkman, R., Baker, S. C., Drosten, C., & Müller, M. A. (2018). The papain-like protease determines a virulence trait that varies among members of the SARS-coronavirus species. *PLoS Pathogens*, 14(9), e1007296.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007296>
- Ntie-Kang, F., Nyongbela, K. D., Ayimele, G. A., & Shekfeh, S. (2019). "Drug-likeness" properties of natural compounds. *Physical Sciences Reviews*, 4(11).
<https://doi.org/10.1515/psr-2018-0169>
- Oracz, J., Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Budryn, G., & Luzak, B. (2020). Bioavailability and metabolism of selected cocoa bioactive compounds: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(12), 1947-1985.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1619160>
- Osipiuk, J., Azizi, S.-A., Dvorkin, S., Endres, M., Jedrzejczak, R., Jones, K. A., Kang, S., Kathayat, R. S., Kim, Y., Lisnyak, V. G., Maki, S. L., Nicolaescu, V., Taylor, C. A., Tesar, C., Zhang, Y.-A., Zhou, Z., Randall, G., Michalska, K., Snyder, S. A., ... Joachimiak, A. (2021). Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-

- covalent inhibitors. *Nature Communications*, 12(1), 743. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21060-3>
- Othman, A., Jalil, A. M. M., Weng, K. K., Ismail, A., Abd.Ghani, N., & Adenan, I. (2010). Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *African Journal of Biotechnology*, 9(7), 1052-1059. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1219>
- Ottaviani, G., Gosling, D. J., Patissier, C., Rodde, S., Zhou, L., & Faller, B. (2010). What is modulating solubility in simulated intestinal fluids? *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 41(3-4), 452-457. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.07.012>
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X., Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J., & Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*, 11, 1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>
- Parvez, M. K., Al-Dosari, M. S., Abdelwahid, M. A. S., Alqahtani, A. S., & Alanzi, A. R. (2022). Novel anti-hepatitis B virus-active catechin and epicatechin from *Rhus tripartita*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(6), 398. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11325>
- Pasquereau, S., Nehme, Z., Haidar Ahmad, S., Daouad, F., Van Assche, J., Wallet, C., Schwartz, C., Rohr, O., Morot-Bizot, S., & Herbein, G. (2021). Resveratrol Inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 Coronavirus Replication *In Vitro*. *Viruses*, 13(2), 354. <https://doi.org/10.3390/v13020354>
- Petukh, M., Stefl, S., & Alexov, E. (2013). The Role of Protonation States in Ligand-Receptor Recognition and Binding. *Current pharmaceutical design*, 19(23), 4182-4190.

- Pino, S., Aguilar, H., & Sisalema, L. (2018). The Denomination of origin for cocoa arriba. In search of the Holy Grail. *Espacios*, 39(16), 1-15.
- Polanski, J., Tkocz, A., & Kucia, U. (2017). Beware of ligand efficiency (LE): Understanding LE data in modeling structure-activity and structure-economy relationships. *Journal of Cheminformatics*, 9(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13321-017-0236-9>
- Pollastri, M. P. (2010). Overview on the Rule of Five. *Current Protocols in Pharmacology*, 49(1), 9.12.1-9.12.8. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0912s49>
- Quingasía, E., & Riveros, H. (2007). Estudio de Caso: Denominación de Origen «Cacao Arriba». *FAO*.
https://www.fao.org/fileadmin/templates/olq/documents/Santiago/Documentos/Estudios%20de%20caso/Cacao_Ecuador.pdf
- Ramírez, D., & Caballero, J. (2018). Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available Structural Data? *Molecules*, 23(5), 1038. <https://doi.org/10.3390/molecules23051038>
- Raubenolt, B. A., Islam, N. N., Summa, C. M., & Rick, S. W. (2022). Molecular dynamics simulations of the flexibility and inhibition of SARS-CoV-2 NSP 13 helicase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 112, 108122.
<https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2022.108122>
- RCSB Protein Data Bank. (2020a). *RCSB PDB - 6M2N: SARS-CoV-2 3CL protease (3CL pro) in complex with a novel inhibitor*. <https://www.rcsb.org/structure/6M2N>
- RCSB Protein Data Bank. (2020b). *RCSB PDB - 7CMD: Crystal structure of the SARS-CoV-2 PLpro with GRL0617*. <https://www.rcsb.org/structure/7CMD>
- Rolta, R., Salaria, D., Sharma, B., Awofisayo, O., Fadare, O. A., Sharma, S., Patel, C. N., Kumar, V., Sourirajan, A., Baumler, D. J., & Dev, K. (2022). Methylxanthines as Potential Inhibitor of SARS-CoV-2: An *In Silico* Approach. *Current Pharmacology Reports*, 8(2), 149-170. <https://doi.org/10.1007/s40495-021-00276-3>

- Roos, C., Dahlgren, D., Sjögren, E., Tannergren, C., Abrahamsson, B., & Lennernäs, H. (2017). Regional Intestinal Permeability in Rats: A Comparison of Methods. *Molecular Pharmaceutics*, 14(12), 4252-4261. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00279>
- Rusconi, M., & Conti, A. (2010). *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, 61(1), 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.08.008>
- Ryckmans, T., Edwards, M. P., Horne, V. A., Correia, A. M., Owen, D. R., Thompson, L. R., Tran, I., Tutt, M. F., & Young, T. (2009). Rapid assessment of a novel series of selective CB2 agonists using parallel synthesis protocols: A Lipophilic Efficiency (LipE) analysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(15), 4406-4409. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.05.062>
- Salata, C., Calistri, A., Parolin, C., & Palù, G. (2019). Coronaviruses: A paradigm of new emerging zoonotic diseases. *Pathogens and Disease*, 77(9), ftaa006. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa006>
- Samaniego, I. (2016). Los polifenoles en el cacao. *Agrocontrol*, 10, 30-33.
- Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). *NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools*. Database; Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAAA062>
- Shum, K. T., & Tanner, J. A. (2008). Differential Inhibitory Activities and Stabilisation of DNA Aptamers against the SARS Coronavirus Helicase. *ChemBiochem*, 9(18), 3037-3045. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800491>
- Song, P., Yu, X., Yang, W., & Wang, Q. (2021). Natural phytoalexin stilbene compound resveratrol and its derivatives as anti-tobacco mosaic virus and anti-phytopathogenic

- fungus agents. *Scientific Reports*, 11(1), 16509. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96069-1>
- Takahashi, T., Kurebayashi, Y., Tani, K., Yamazaki, M., Minami, A., & Takeuchi, H. (2021). The antiviral effect of catechins on mumps virus infection. *Journal of Functional Foods*, 87, 104817. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104817>
- Tiwari, A., Balan, S., Rauf, A., Kappanayil, M., Kesavan, S., Raj, M., Sivadas, S., Vasudevan, A. K., Chickermane, P., Vijayan, A., John, S. T., CK, S., Krishnan, R. A., & Sudhakar, A. (2021). COVID-19 related multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C): A hospital-based prospective cohort study from Kerala, India. *BMJ Paediatrics Open*, 5(1), e001195. <https://doi.org/10.1136/bmjpo-2021-001195>
- Vázquez-Ovando, A., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L., Betancur-Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(3), 239-254.
- Vugmeyster, Y., Harrold, J., & Xu, X. (2012). Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Studies of Biotherapeutics for Autoimmune and Inflammatory Conditions. *The AAPS Journal*, 14(4), 714-727. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9385-y>
- Wang, H., Xue, S., Yang, H., & Chen, C. (2016). Recent progress in the discovery of inhibitors targeting coronavirus proteases. *Virologica Sinica*, 31(1), 24-30. <https://doi.org/10.1007/s12250-015-3711-3>
- Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., Wang, Q., Xu, Y., Li, M., Li, X., Zheng, M., Chen, L., & Li, H. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(5), 766-788. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>

- Xu, H., Li, J., Song, S., Xiao, Z., Chen, X., Huang, B., Sun, M., Su, G., Zhou, D., Wang, G., Hao, R., & Wang, N. (2021). Effective inhibition of coronavirus replication by *Polygonum cuspidatum*. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 26(10), 789-798.
<https://doi.org/10.52586/4988>
- Yañez, O., Osorio, M. I., Areche, C., Vasquez-Espinal, A., Bravo, J., Sandoval-Aldana, A., Pérez-Donoso, J. M., González-Nilo, F., Matos, M. J., Osorio, E., García-Beltrán, O., & Tiznado, W. (2021). *Theobroma cacao* L. compounds: Theoretical study and molecular modeling as inhibitors of main SARS-CoV-2 protease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 140, 111764. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111764>
- Yin, W., Mao, C., Luan, X., Shen, D.-D., Shen, Q., Su, H., Wang, X., Zhou, F., Zhao, W., Gao, M., Chang, S., Xie, Y.-C., Tian, G., Jiang, H.-W., Tao, S.-C., Shen, J., Jiang, Y., Jiang, H., Xu, Y., ... Xu, H. E. (2020). Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science (New York, N.y.)*, 368(6498), 1499-1504. <https://doi.org/10.1126/science.abc1560>
- Yuriev, E., Agostino, M., & Ramsland, P. A. (2011). Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 24(2), 149-164.
<https://doi.org/10.1002/jmr.1077>
- Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., Becker, S., Rox, K., & Hilgenfeld, R. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.abb3405>
- Zhang, & Wilkinson. (2007). Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.005>
- Zhao, X., Cui, Q., Fu, Q., Song, X., Jia, R., Yang, Y., Zou, Y., Li, L., He, C., Liang, X., Yin, L., Lin, J., Ye, G., Shu, G., Zhao, L., Shi, F., Lv, C., & Yin, Z. (2017). Antiviral properties of

resveratrol against pseudorabies virus are associated with the inhibition of I κ B kinase activation. *Scientific Reports*, 7(1), 8782. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09365-0>

Ziebuhr, J., Snijder, E. J., & Gorbalenya, A. E. (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 4), 853-879. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-4-853>

Capítulo VIII: Apéndices