

Evaluación *in silico* del efecto de compuestos fenólicos de *Pleurotus ostreatus* sobre la enzima 5-lipoxigenasa (5- LOX)

In silico evaluation of the effect of *Pleurotus ostreatus* phenolic compounds on the enzyme 5-lipoxygenase (5-LOX)

Yaixa Beltrán Delgado^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-7149-5069>

Julio Rojas Vargas² <https://orcid.org/0000-0002-8877-1592>

Isaac Morales González² <https://orcid.org/0000-0002-8732-9794>

Humberto Morris Quevedo¹ <https://orcid.org/0000-0002-3916-8594>

¹Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Cuba.

²Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. Cuba.

*Autor para la correspondencia: yaixa@uo.edu.cu

RESUMEN

Introducción: Los hongos comestibles, en particular *Pleurotus ostreatus*, representan una importante fuente de metabolitos bioactivos con propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes y antiinflamatorias. Trabajos recientes han demostrado que extractos y compuestos purificados a partir de esta seta, entre ellos, la fracción rica en fenoles, inhiben el factor nuclear kappa B(NF- κ B), la ciclooxigenasa (COX) y modulan cascadas de señalización relacionadas con el balance redox. De acuerdo con estos antecedentes, dichos compuestos podrían actuar, además, como inhibidores de la enzima 5- lipoxigenasa (5-LOX).

Objetivo: Evaluar el efecto *in silico* de trece compuestos fenólicos presentes en la especie *Pleurotus ostreatus* sobre la enzima 5-LOX, al utilizar como compuesto de referencia la mangiferina.

Métodos: El acoplamiento se llevó a cabo a través del programa AutoDock 4.2 (<http://autodock.scripps.edu>) y la estructura de 5 LOX se obtuvo con la base de datos de proteínas, PDB (www.rcsb.org). Se estimaron la energía libre (ΔG), la constante de disociación (K_i) y la eficiencia de ligando (LE). Se obtuvieron los parámetros de similitud a un fármaco y los relacionados con la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME/T) de los mejores modelos de acoplamiento.

Resultados: Los mejores indicadores de ΔG y K_i , correspondieron a los ácidos homogentísico, clorogénico y gentísico, con valores de ΔG (-11,81; -12,28 y -11,67 kcal/mol) y K_i ($2,19 \cdot 10^{-9}$; $9,99 \cdot 10^{-10}$, $2,79 \cdot 10^{-9}$ M), respectivamente. La eficiencia de ligando alcanzó valores adecuados para estos tres compuestos fenólicos. El modelo de acoplamiento del ácido homogentísico mostró los mejores resultados en cuanto a la similitud a un fármaco y pruebas ADME/T.

Conclusiones: El estudio *in silico* reveló las potencialidades de la fracción rica en fenoles de *P. ostreatus*, y en particular, del ácido homogentísico como inhibidor de la enzima 5-LOX, y justifica el desarrollo de ensayos confirmativos *in vitro/ in vivo* que corroboren sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios.

Palabras clave: acoplamiento molecular; ADME/T; compuestos fenólicos; *in silico* 5 lipoxigenasa; *Pleurotus ostreatus*.

ABSTRACT

Introduction: Edible mushrooms, *Pleurotus ostreatus* in particular, are an important source of bioactive metabolites with immunomodulatory, antioxidant and anti-inflammatory properties. Recent studies have shown that extracts and compounds purified from this mushroom, among them the phenol-rich fraction, inhibit nuclear factor kappa B (NF- κ B), cyclooxygenase (COX), and modulate signaling cascades related to redox balance. According to these antecedents, such compounds could also act as inhibitors of the enzyme 5-lipoxygenase (5-LOX).

Objective: Evaluate the *in silico* effect of 13 phenolic compounds present in the species *Pleurotus ostreatus* on the enzyme 5-LOX using mangiferin as reference compound.

Methods: Docking was carried out with the software AutoDock 4.2 (<http://autodock.scripps.edu>) and the 5-LOX structure was obtained with the protein database PDB (www.rcsb.org). Estimation was performed of free energy (ΔG), dissociation constant (Kd) and ligand efficiency (LE). Drug-likeness parameters were obtained, as well as those related to absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) of the best docking models.

Results: The best ΔG and Kd indicators were homogentisic, chlorogenic and gentisic acids, with ΔG and Kd values of -11.81, -12.28, -11.67 kcal/mol, and $2.19 \cdot 10^{-9}$, $9.99 \cdot 10^{-10}$, $2.79 \cdot 10^{-9}$ M, respectively. Ligand efficiency achieved adequate values for these three phenolic compounds. The docking model for homogentisic acid showed the best results in terms of drug likeness and ADMET tests.

Conclusions: The *in silico* study revealed the potential of the phenol-rich fraction of *P. ostreatus*, homogentisic acid in particular, as an enzyme 5-LOX inhibitor, and justifies the development of confirmatory *in vitro* / *in vivo* assays to corroborate its antioxidant and anti-inflammatory effects.

Keywords: molecular docking; ADMET; phenolic compounds; *in silico*; 5-lipoxygenase; *Pleurotus ostreatus*.

Recibido: 18/03/2020

Aceptado: 10/12/2020

Introducción

El estrés oxidativo es un fenómeno que está implicado en muchos procesos fisiopatológicos, tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, y diabetes, entre otras.⁽¹⁾

En general, el estrés oxidativo y la inflamación están estrechamente relacionados. Como la oxidación de numerosas moléculas causa daño a las células y tejidos, esto puede activar la respuesta inflamatoria.⁽²⁾ Dicha respuesta es iniciada por la

oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, reacción catalizada por tres clases de enzimas: ciclooxigenasas, isoformas de la citocromo P450 y lipoxigenasas.⁽³⁾

En particular, la enzima lipoxigenasa convierte los ácidos araquidónicos, linoleico y otros ácidos grasos poliinsaturados, en metabolitos biológicamente activos, como los leucotrienos, los cuales participan en las respuestas inflamatoria e inmune.⁽⁴⁾

Varios son los estudios en los que se reporta el papel de los leucotrienos en la mediación de la respuesta inflamatoria en enfermedades pulmonares. Actualmente para el caso de la COVID 19, investigadores como *Huang*⁽⁵⁾ plantean que la búsqueda de inhibidores del receptor de leucotrienos o antagonistas de la 5-lipoxigenasa como el zileuton, podría aprovecharse como una estrategia preventiva eficaz e inmediata para mitigar la inflamación pulmonar excesiva en pacientes sintomáticos, que pueden desarrollar una enfermedad grave por Covid-19.

Por esta razón, la inhibición de la lipoxigenasa es una estrategia potencialmente, útil en la prevención de la de enfermedades asociadas a la inflamación como: asma, alergia, artritis reumatoide, osteoporosis y aterosclerosis.⁽⁴⁾

En este sentido, los productos naturales desempeñan un significativo papel en la salud humana, relacionado entre otros aspectos, con la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias.⁽⁶⁾

De ahí que, el consumo de alimentos funcionales/nutracéuticos, como las setas comestibles,⁽⁷⁾ con propiedades antiinflamatorias, hepatoprotectoras, antidiabética y antioxidantes sea una alternativa efectiva para modular estos procesos.⁽⁸⁾

Los hongos comestibles medicinales, han sido consumidos como un alimento funcional, al presentar compuestos bioactivos/nutracéuticos como polisacáridos,⁽⁹⁾ proteínas,⁽¹⁰⁾ compuestos fenólicos,⁽¹¹⁾ lectinas,⁽¹²⁾ terpenos y otros.⁽¹³⁾

Al respecto, se ha demostrado que, los compuestos fenólicos derivados de hongos -comestibles medicinales, muestran actividad antioxidante en sistemas biológicos, actuando como inhibidores de radicales libres, descomponedores de peróxido, inactivadores de metales y secuestradores de oxígeno.⁽¹⁴⁾

Dentro de las especies pertenecientes al grupo de hongos comestibles medicinales (Basidiomicetes) se encuentra *Pleurotus ostreatus*. Dicha especie ocupa el segundo lugar en cuanto a su cultivo y significación económica, dietética y medicinal.⁽¹⁵⁾

Estudios recientes refieren su uso en el desarrollo de alimentos funcionales, fármacos o nutracéuticos de interés para el tratamiento de muchas enfermedades que en el mundo representan un serio problema de salud.⁽¹⁶⁾

En este contexto, ha sido demostrado en esta especie, el efecto inmunomodulador y hepatoprotector,⁽¹⁷⁾ antioxidante,^(18,19,20) antitumoral⁽²¹⁾ y la presencia de compuestos fenólicos con potencial modulador sobre eventos epigenéticos.⁽²²⁾

A partir de estos elementos, el presente trabajo estuvo dirigido a realizar una evaluación *in silico* del efecto de compuestos fenólicos de la seta comestible *Pleurotus ostreatus* sobre la proteína 5- lipoxigenasa (5-LOX), mediante la utilización del acoplamiento molecular y de la estimación de parámetros de similitud a un fármaco y de absorción, distribución, metabolismo, excreción/toxicidad (ADME/T).

La predicción de la inhibición o la activación de determinadas moléculas de interés farmacológico, frente a compuestos bioactivos presentes en las setas comestibles,

reviste gran interés como herramienta complementaria a los estudios *in vitro/in vivo* y la dilucidación de los mecanismos de acción. Es por ello nuestro objetivo evaluar el efecto *in silico* de trece compuestos fenólicos presentes en la especie *Pleurotus ostreatus* sobre la enzima 5-LOX, al utilizar como compuesto de referencia la mangiferina.

Métodos

Ligandos y estructura de la enzima

Los cálculos se realizaron con el cluster del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Oriente. Se utilizó el sistema operativo Linux distribución Debian 7.0.

Se realizó una selección de los compuestos fenólicos encontrados en la composición química de *P. ostreatus*, teniendo en cuenta la revisión de la literatura y estudios de nuestro grupo de investigación.^(17,22) Al respecto, investigadores como *Palacios*,⁽²³⁾ reportan en esta especie, la presencia de ácido *p*-cumárico, ácido felúrico, ácido gálico, ácido gentísico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido homogentísico, mirecitina y ácido protocatecuico. Otros investigadores, refieren, la presencia de ácido cinámico,⁽²⁴⁾ ácido vanílico,⁽²⁵⁾ ácido *p*-hidroxibenzoico, cafeico, ácido siringico y la vanillina.⁽²⁶⁾

Se empleó el programa *ChemBioDraw Professional* 15.0, Cambridge, USA⁽²⁷⁾ para generar las estructuras de los compuestos fenólicos (Tabla 1). Por su parte, el programa, *ChemBio3D Ultra* 12.0, Cambridge, USA⁽²⁷⁾ permitió la optimización de la geometría de dichas moléculas, utilizando el método de mecánica molecular MM2 y MMFF94 (en inglés *Merck Molecular Force Field*).

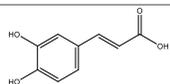
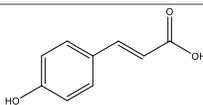
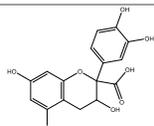
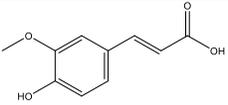
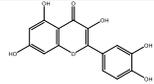
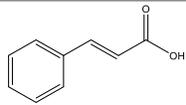
En el presente trabajo se utilizó como compuesto de comparación a la mangiferina (1,3,6,7-Tetrahydroxyxantona-C2-B-D-glucósido), debido a que posee una

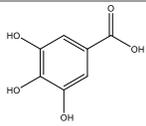
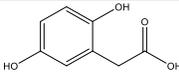
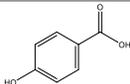
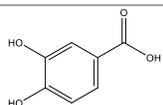
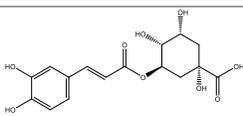
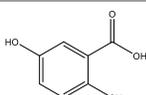
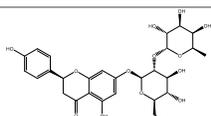
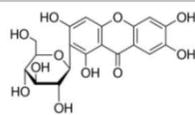
significativa actividad biológica relacionada con la captación de radicales libres,⁽²⁸⁾ así como la inhibición del estrés oxidativo⁽²⁹⁾ y la actividad de la enzima 5-LOX.⁽³⁰⁾

La estructura tridimensional, correspondiente a la difracción de rayos X del cristal de la enzima 5 lipoxigenasa, se obtuvo en formato .pdb de la Base de Datos de Proteínas (PDB, en inglés *Protein Data Bank*) del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*) (NCBI, USA). (PDB: código ID/3V99, resolución (2.252 Å), depositada por Gilbert.⁽³¹⁾

A través del programa UCSF Chimera versión 1.10.227 (California, USA)⁽³²⁾ se identificaron todos los residuos que no pertenecían a la proteína y podían interferir con su centro activo.

Tabla 1 - Fórmula y estructuras químicas de los compuestos fenólicos seleccionados para el estudio de acoplamiento molecular

Compuestos fenólicos	Fórmula	Estructura
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	
Ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	
Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	
Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	
Ácido cinámico	C ₉ H ₈ O ₂	

Ácido gálico	$C_7H_6O_5$	
Ácido homogentísico	$C_8H_8O_4$	
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	$C_7H_6O_3$	
Ácido protocatecuico	$C_7H_6O_4$	
Ácido clorogénico	$C_{16}H_{18}O_9$	
Ácido gentísico	$C_7H_6O_4$	
Naringina	$C_{27}H_{32}O_{14}$	
*Mangiferina	$C_{19}H_{18}O_{11}$	

*Compuesto de referencia

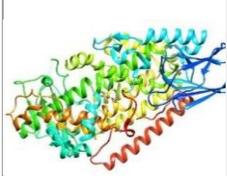
Protocolo de acoplamiento molecular

El estudio de acoplamiento molecular se llevó a cabo con los programas AutoDock 4.2 y AutoDockTools 1.5.6, USA,⁽³³⁾ y la estructura de 5 LOX se obtuvo con la base de datos de proteínas, PDB (www.wwpdb.org). La visualización 3D de las interacciones hidrofóbicas y por puente de hidrógeno de los complejos, se efectuó por el programa UCSF Chimera versión 1.10.227, California, USA.⁽³²⁾

El programa AutoDock requiere de la realización de un pre-cálculo de los mapas *grid* para cada tipo de elemento presente en la macromolécula, ubicando el ligando alrededor de la región de interés (sitio activo) en la macromolécula. En la tabla 2 se muestran las coordenadas y tamaño de la caja Grid del sitio activo para la enzima 5- LOX.

Se utilizó el algoritmo genético Lamarkiano para explorar la mejor conformación espacial de los ligandos, con 50 poses por cada ligando.

Tabla 2 - Estructura 3D de la proteína 5-LOX y parámetros de la caja Grid

PDB ID (Resolución)	Proteína 5- LOX	Coordenadas			Espaciado	Tamaño (puntos)
		X	Y	Z		
3V99 (2.252 Å), Método de difracción de rayos X		20,424	-72,78	-36,688	0,375	60 x 60 x 60

Los parámetros físico- químicos utilizados en la investigación fueron ΔG y K_i . Estos parámetros se relacionan de forma directa. A medida que la energía libre de unión disminuye, la constante de inhibición también decrece, lo cual se traduce en una mayor estabilidad del complejo enzima-ligando. Por otra parte, los cambios de entalpía (ΔH) y de entropía (ΔS), deben ser considerados en la evaluación de la energía de unión. Dichas relaciones se observan en las ecuaciones 1.1 y 1.2, donde $[E]$, $[I]$ y $[EI]$ son las concentraciones de proteína, inhibidor y el complejo proteína-inhibidor, respectivamente; en tanto, $R= 8,314 \text{ Jmol/K}$ es la constante universal de los gases, $T=298\text{K}$ es la temperatura y K_A , la constante de afinidad.

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad \text{Ecuación 1.1}$$

$$K_A = K_i^{-1} = \frac{[EI]}{[E][I]} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Por otro lado, también se tuvo en cuenta el cálculo de la eficiencia del ligando (LE).

La eficiencia del ligando y las propiedades termodinámicas constitutivas de ΔG (ΔH y ΔS), pueden proporcionar información sobre la unión de una molécula con su ligando, que va más allá de simples comparaciones de potencia inhibitoria.⁽³⁴⁾

LE se obtiene al dividir la energía libre de unión de cada molécula entre el número de átomos (n) no hidrógenos, presentes en la estructura, y se describe, según la ecuación 1.3:

$$LE = \frac{\Delta G}{n}$$

Ecuación 1.3

Propiedad de similitud a un fármaco y estudios ADME/T

Dentro del estudio de las propiedades de similitud a un fármaco, se encuentra el cumplimiento por parte de los compuestos estudiados, de las condiciones de la regla de *Lipinski*⁽³⁵⁾. Esta regla define cinco rangos de parámetros fisicoquímicos: peso molecular ≤ 500 , número de enlaces donores de hidrogeno ≤ 5 , número de enlaces aceptores de hidrogeno ≤ 10 , lipofilidad (Log P) ≤ 5 y refractividad molar entre 40 a 130 Å². Estos parámetros se verificaron a través de la metodología SwissADME (<http://www.swissadme.ch>).⁽³⁶⁾

Para la determinación de los parámetros farmacológicos y farmacodinámicos ADME/T (absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad) en los ligandos que mostraron los mejores modelos de acoplamiento con la enzima de estudio, se utilizó el programa ADMET lab.⁽³⁷⁾

Resultados

Simulación de acoplamiento molecular

Según el análisis realizado en la literatura, los residuos de aminoácidos que se reportan como activos en la 5-LOX⁽³¹⁾ son: Tyr-558, Phe-555, Asn-554, His-367, His-372, Ile-406, Ala 410 y Phe-177, que están rodeados del centro metálico de Fe²⁺.

Los parámetros del acoplamiento molecular de los compuestos fenólicos seleccionados de *Pleurotus ostreatus* y la enzima 5-LOX, se muestran en la tabla 3. Los resultados revelaron que los compuestos fenólicos muestran una buena afinidad hacia la enzima.

Tabla 3 - Predicción de la energía libre de unión, la constante de inhibición y la eficiencia de ligando de compuestos fenólicos y la enzima 5 LOX

Compuestos fenólicos	ΔG (Kcal/mol)	Ki (M)	LE (kcal/mol/átomo no H)
Ácido cafeíco	-11,44	2,08 10 ⁻⁸	-0,88
Ácido <i>p</i> -cumárico	-11,50	3,70 10 ⁻⁹	-0,95
Catequina	-11,57	3,29 10 ⁻⁹	-0,55
Ácido ferúlico	-7,05	6,83 10 ⁻⁹	-0,50
Quercetina	-11,20	6,17 10 ⁻⁹	-0,51
Ácido cinámico	-11,37	4,61 10 ⁻⁹	-1,03
Ácido gálico	-10,72	1,39 10 ⁻⁸	-0,89
Ácido homogentísico	-11,81	2,19 10 ⁻⁹	-0,98
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	-11,25	5,68 10 ⁻⁹	-1,13
Ácido protocatecuico	-11,31	5,09 10 ⁻⁹	-1,03
Ácido clorogénico	-12,28	9,99 10 ⁻¹⁰	-0,49
Ácido gentísico	-11,67	2,79 10 ⁻⁹	-1,06
Naringina	-5,40	1,11 10 ⁻⁵	-0,13
*Mangiferina	-5,26	1,38 10 ⁻⁴	-0,18

*Compuesto de referencia; en negrita se destacan los mejores valores en el acoplamiento.

Ello está sustentado en los valores de energía libre de unión (ΔG) y constante de inhibición (Ki). Los intervalos de los valores de energía de unión estuvieron entre

-12,28 y -5,26 kcal/mol y los de la constante de inhibición de $9,99 \cdot 10^{-10}$ a $1,38 \cdot 10^4$ M.

En la tabla 3, se observaron además, los valores de Eficiencia de Ligando (LE) de todos los compuestos fenólicos evaluados. Los valores se encontraron en un rango entre -0,13 y -1,13 kcal/mol/átomo no hidrógeno.

Por su parte, los mejores modelos de acoplamiento se presentan en la tabla 4. Se constata que los compuestos fenólicos: ácido homogentísico, clorogénico y gentísico, presentaron mejores valores de ΔG , con cuatro, diez y cinco interacciones por puente de hidrógeno, respectivamente, mientras que la mangiferina presentó seis.

Tabla 4 - Interacciones observadas entre los mejores modelos de acoplamiento de los compuestos fenólicos y la proteína 5-LOX

Compuestos fenólicos	PDBID	Interacciones tipo Puente-H	Interacciones hidrofóbicas
Ácido homogentísico	3V99	HIS372 [O...HN]; HIS367 [OH...N]; ASN554 [OH...N]; ASN554 [O...HN]	VAL671; LEU607; ALA672
Ácido clorogénico	3V99	HIS367 [O...HN]; HIS367 [OH...N]; HIS372 [O...HN]; GLN363[OH...O]; GLN363[OH...O]; ASN554 [OH...O]; ASN554 [OH...O]; ASN554 [OH...N]; ALA672[OH...O]; HIS550[O...HN]	LEU368; VAL671
Ácido gentísico	3V99	ASN554 [OH...O]; GLN557[O...HN]; HIS372 [O...HN]; HIS550[O...HN]; ALA672[OH...O]	LEU607
Mangiferina	3V99	HIS372 [OH...N]; HIS367 [O...HN]; HIS550[OH...N]; ALA672[OH...O]; ASN554 [OH...O]; ASN554 [OH...O]	VAL671; GLN557; LEU607; LEU368; THR364; GLN363

En negrita se destacan los residuos de aminoácidos presentes en el centro activo de la enzima de *P. ostreatus*, el compuesto de comparación y la proteína 5-LOX. A (ácido homogentísico), B (ácido clorogénico), C (ácido gentísico), D (mangiferina).

En la siguiente figura se muestran las interacciones 3D de estos mejores modelos de acoplamiento.

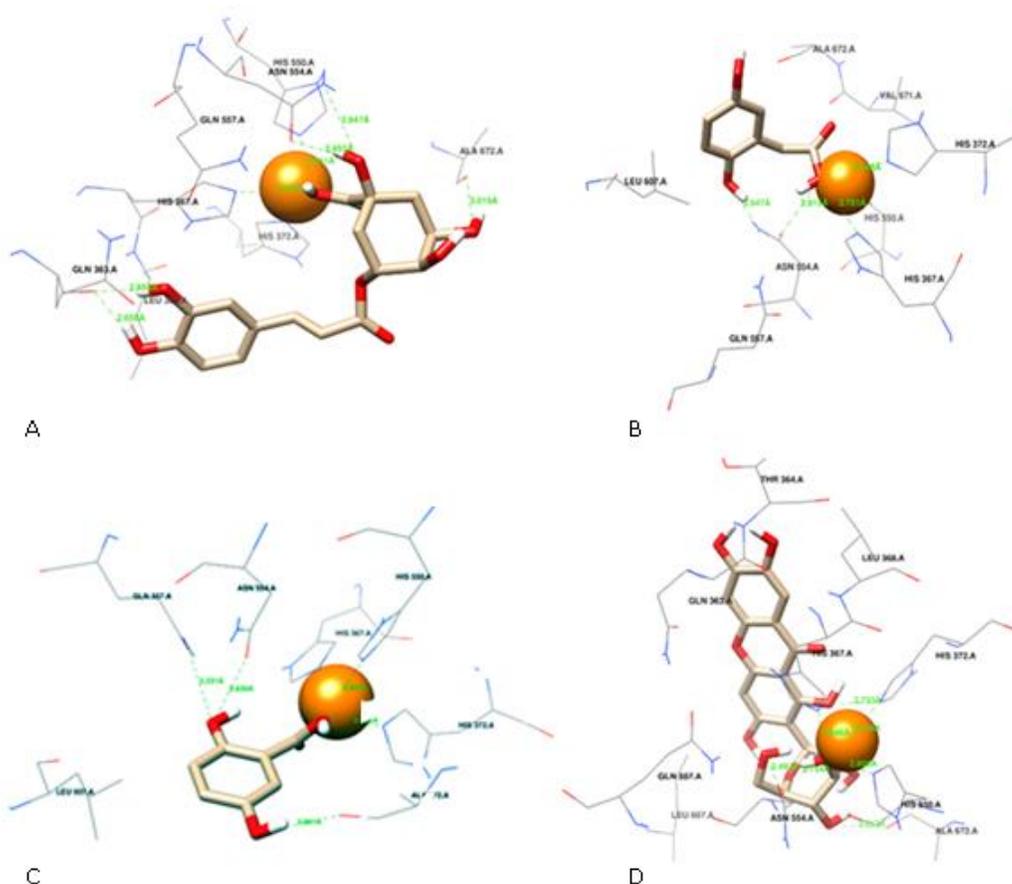


Fig. - Interacción 3D de los mejores modelos de acoplamiento entre los compuestos fenólicos, el compuesto de comparación y la proteína 5-LOX. A (ácido homogentísico), B (ácido clorogénico), C (ácido gáltico), D (mangiferina).

Propiedades de similitud a un fármaco y estudios ADME/T

La evaluación de las cinco reglas de Lipinski en los modelos de acoplamiento seleccionados para la proteína 5 LOX se muestra en la siguiente tabla. Se observa que, los ligandos seleccionados mostraron un peso molecular por debajo de 500 g/mol.

En cuanto al número de enlaces donores de hidrógenos, el ácido clorogénico y la mangiferina, presentaron valores de 6 y 8, respectivamente; por lo que estuvieron

por encima de lo requerido para el parámetro (≤ 5). También la mangiferina, superó el número enlaces hidrógenos aceptores (≤ 10), con un valor de 11.

Por otro lado, los valores de la superficie topológica polar (TPSA, Å^2) evidencian que dos de los ligandos (ácido homogentísico y ácido gentísico), presentaron valores aceptables de TPSA; en cambio, el ácido clorogénico con 164,75 Å^2 y la mangiferina con 201,28 Å^2 , no se comportan de la misma forma, pues sus valores sobrepasan los establecidos para este parámetro.

Por su parte, la refractividad molar, reportó valores dentro de los límites establecidos para todos los ligandos seleccionados, entre 40 y 130. Los valores de la solubilidad Log S, estuvieron entre (-1,62 a -2,44) (Tabla 5).

Tabla 5 - Parámetros estimados de similitud a un fármaco para los compuestos fenólicos de *P. ostreatus* con mejores modelos de acoplamiento

COMPUESTOS				
Propiedades de similitud a un fármaco	Ácido homogentísico	Ácido gentísico	Ácido clorogénico	Mangiferina
Peso molecular (g/mol)	168,15	154,12	354,31	422,34
Log Po/w consenso	0,65	0,74	-0,42	-0,77
Log S	-1,66	-2,33	-1,62	-2,44
Número de enlaces H aceptores	4	4	9	11
Número de enlaces H donores	3	3	6	8
Refractividad molar	42,03	37,45	83,50	100,70
Regla de Lipinski	Sí	Sí	Sí	No
Regla de Ghose	Sí	No	No	No
Regla de Veber	Sí	Sí	No	No
Regla de Egan	Sí	Sí	No	No
Regla de Muegge	No	No	No	No
Puntuación de la biodisponibilidad	0,56	0,56	0,11	0,17
TPSA (Å^2)	77,76	77,76	164,75	201,28
Número de enlaces rotables	2	1	5	2

Los resultados derivados del análisis de ADME/T de la presente investigación, se muestran en la tabla 6. La evaluación permitió determinar las propiedades farmacodinámicas de los fenoles seleccionados al interactuar con la enzima de estudio.

Tabla 6 - Resultados de la evaluación *in silico* de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (ADME/T) de los ligandos fenólicos de *P. ostreatus* con mejores modelos de acoplamiento y la enzima 5 LOX

Clase	Propiedades	Ácido homogentísico	Ácido gentísico	Ácido clorogénico	Mangiferina
Absorción	Permeabilidad Caco-2	-5,118	-5,099	-6,58*	-6,512*
	Inhibidor Pgp	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor
	Sustrato Pgp	No sustrato	No sustrato	No sustrato	No sustrato
	Absorción Intestinal Humana (HIA)	HIA positivo	HIA negativo	HIA negativo	HIA negativo
Distribución	Unión proteínas plasmáticas	35,14%	36,48%	50,68 %	67,43 %
	Barrera hematoencefálica (BBB)	BBB positivo	BBB negativo	BBB positivo	BBB positivo
Metabolismo	Inhibidor CYP450 1 A2	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor
	Sustrato CYP450 1 A2	No sustrato	No sustrato	No sustrato	No sustrato
	Inhibidor CYP450 3 A4	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor
	Sustrato CYP4503 A4	No sustrato	No sustrato	Sustrato	No sustrato
	Inhibidor CYP450 2 C9	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor
	Sustrato CYP450 2 C9	Sustrato	Sustrato	No sustrato	No sustrato
	Inhibidor CYP450 2 C19	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor
	Sustrato CYP450 2 C19	Sustrato	No sustrato	No sustrato	No sustrato
	Inhibidor CYP450 D6	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor
	Sustrato CYP450 D6	No sustrato	No sustrato	No sustrato	No sustrato
Excreción	T1/2 (h)	0,49	0,36	0,44	1,26
Toxicidad	Bloqueadores hERG	No bloqueadores	No bloqueadores	No bloqueadores	No bloqueadores
	Hepatotoxicidad humana	H-HT negativo	H-HT negativo	H- HT positivo	H-HT negativo
	Mutagenicidad AMES	AMES negativo	AMES negativo	AMES negativo	AMES positivo
	Sensibilización cutánea	No sensible	No sensible	No sensible	No sensible
	Lesión hepática inducida por fármacos (DILI)	DILI negativo	DILI negativo	DILI negativo	DILI positivo

	Dosis diarias máximas recomendadas (FDAMDD)	FDAMDD positivo	FDAMDD positivo	FDAMDD negativo	FDAMDD positivo
--	---	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

Discusión

La 5 lipoxigenasa (5-LOX), es una enzima clave que cataliza el primer paso de la biosíntesis de leucotrienos. Los inhibidores específicos de la 5- lipoxigenasa, pueden ser considerados como potenciales fármacos para varias enfermedades relacionadas con patologías inflamatorias.⁽³⁸⁾

Los resultados del presente trabajo, mostraron que los fenoles derivados de la seta *P. ostreatus*, de manera general se acoplaron satisfactoriamente con la enzima 5-LOX, teniendo una adecuada interacción con los residuos del sitio activo.

Cabe señalar que los fenoles - ácido homogentísico, clorogénico y gentísico - presentan una gran variedad de interacciones por puente de hidrógeno, siendo comunes tres residuos de aminoácidos reportados en el sitio activo de la proteína (Asn-554, His-367 y His-372). El ácido clorogénico, en particular, presentó una K_i muy pequeña, lo que sugiere un mejor acoplamiento con el sitio activo de la enzima como se mostró en la tabla 3.

En estudios realizados por *Lee*,⁽³⁹⁾ se observó que cuatro especies de la familia *Hymenochatacea*, una especie de la familia *Tricholomatacea* y dos especies de *Boletaceae*, mostraron potentes actividades de inhibición en más de un 50 % hacia la lipoxigenasa. Específicamente *Collybiama culata*, *Tylophilus neofelleus*, *Strobilomyces confusus*, *Phellinus gilvus*, *P. linteus*, *P. baumii* e *Inonotus mikadoi*, a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, alcanzaron actividades inhibitorias de la lipoxigenasa en porcentos de 73,3; 51,6; 52,4; 66,7; 59,5; 100 y 85,2, respectivamente.

Los valores en cuanto a los parámetros físicos- químico evaluados en los ácidos homogentísico y gentísico, resultaron promisorios para estudios futuros en cuanto a su potencial actividad farmacológica. De manera general, la potencial actividad inhibitoria 5- LOX de los compuestos fenólicos estudiados, podría estar relacionada con la disminución de la peroxidación lípidica y menores valores de malonildialdehido (MDA) detectados en modelos *in vitro* de membrana de eritrocitos, donde se han evaluado extractos acuosos de *P. ostreatus*.⁽¹⁶⁾

En el presente estudio, se compararon, además, los resultados de los mejores modelos de acoplamiento entre los fenoles de *Pleurotus ostreatus* y la enzima de estudio, respecto a los valores obtenidos con el compuesto de referencia (mangiferina).

La farmacología de la mangiferina ha ganado gran atención debido a su función protectora contra el daño oxidativo a diversos tejidos. Se ha demostrado, que la mangiferina reduce la expresión de varios mediadores inflamatorios. Las propiedades antioxidantes de esta sustancia también pueden contribuir a su actividad antiinflamatoria y a su efecto hepatoprotector.⁽⁴⁰⁾ La mangiferina puede inhibir citoquinas inflamatorias, como el TNF α , la producción de óxido nítrico y la expresión de NF κ B, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.⁽⁴¹⁾ Además, modula diversos factores de transcripción, incluyendo NF κ B y Nrf-2, y la expresión múltiple de cascadas de señalización proinflamatoria.

Se ha postulado que el enlace C-glucosilo y los grupos hidroxilo en la mangiferina, contribuyen significativamente a su actividad de eliminación de radicales libres.⁽⁴²⁾

Por otra parte, según los valores definidos por *Hopkins*,⁽⁴³⁾ la eficiencia del ligando (LE), (excelentes LE > -0,4, buenos LE > -0,3 y malos LE \leq -0,2), se observó que en el caso de los mejores modelos del acoplamiento entre los compuestos fenólicos y la proteína 5-LOX, los ácidos homogentísico, clorogénico y gentísico (Tabla 3),

presentaron valores de LE excelente. Estos resultados brindan información de la fortaleza de la unión entre los ligandos y la enzima.

Por otro lado, al analizar los mejores modelos de acoplamiento de los compuestos fenólicos con la proteína 5-LOX, se constató que el ácido clorogénico mostró valores que indicaron una fortaleza de unión mayor. Esto puede estar basado en la existencia de diez interacciones por puente de hidrógeno y dos electrostáticas con el Fe^{2+} , que se encuentran más cerca del sitio activo de la proteína.

Los ácidos homogentísico, clorogénico y gentísico presentaron varias interacciones por puente de hidrógeno. Fueron los más comunes los tres residuos de aminoácidos reportados como activos (Asn-554, His-367 y His-372) como se pudo observar (Tabla 4).

En la tabla 5, evidenciamos que todos los ligandos de los mejores modelos de acoplamiento con la enzima evaluada, tuvieron valores ≤ 10 , lo cual puede suponer una mayor flexibilidad conformacional.

Por otro lado, los valores de la superficie topológica polar (TPSA) fueron elevados en dos de los compuestos: ácido clorogénico y el compuesto de referencia, la mangiferina, lo cual afectaría la disponibilidad de absorción de los mismos.

El número de enlaces donores de hidrógenos (≤ 5), enlaces aceptores de hidrógenos (≤ 10) y la refractividad molar más baja fue apreciada en dos de los compuestos: ácido homogentísico y ácido clorogénico. Los resultados reflejaron que el ácido homogentísico fue el ligando en el que se verificaron casi todas las reglas evaluadas: *Lipinski*, *Veber*, *Ghose* y *Egan*, por lo que pudiera ser un candidato para evaluaciones farmacológicas futuras.

Con respecto a la utilización de los parámetros ADME/T (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad), existen numerosos factores que influyen en

la biodisponibilidad de los fármacos; estos pueden ser fisicoquímicos y biológicos. Los fisicoquímicos comprenden las propiedades intrínsecas del fármaco, como pKa, tamaño molecular, lipofilidad y solubilidad; por su parte, los biológicos incluyen la permeabilidad de la membrana gástrica e intestinal, tiempo de tránsito, pH de la luz y tasa de flujo sanguíneo de la mucosa, entre otros.⁽⁴⁴⁾

En este sentido, la prueba de la permeabilidad en células Caco-2 es una medida indirecta de la absorción intestinal humana. De manera que permitiría predecir si la absorción intestinal y el metabolismo podrían reducir la disponibilidad de un fármaco o molécula en el organismo.⁽⁴⁵⁾

Los parámetros de absorción reflejaron que, los mejores valores de permeabilidad con las células Caco 2, fueron para los compuestos ácido clorogénico y mangiferina, al encontrarse por encima del valor reportado en la literatura (> - 5,15). Al respecto, *Llauradó* y otros,⁽⁴⁶⁾ evaluaron el efecto antitumoral selectivo de varios extractos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp, con diferentes polaridades, en el crecimiento de diferentes líneas celulares tumorales (U937, N2A y células tumorales Caco2, comparadas con células Vero), lo cual es una evidencia experimental de la permeabilidad *in vitro* de las células Caco 2 frente a estos preparados en cuya composición están presentes los compuestos fenólicos (138 mg/ 100 g).

Todos los compuestos evaluados resultaron no inhibidores y no sustrato de la glicoproteína P, una proteína transportadora de membrana asociada al fenómeno de resistencia a múltiples fármacos.

La absorción intestinal o HIA (por sus siglas en inglés) en cierta medida podría ser un indicador alternativo para la biodisponibilidad oral y, por lo tanto, también desempeña un papel importante en la evaluación preclínica de medicamentos. En este sentido, solo el ácido homogentísico, resultó positivo a este marcador.

Con respecto a la distribución, los porcentajes de unión a proteínas plasmáticas estuvieron por debajo del 90 % en todos los ligandos, mientras que tres de los compuestos (ácido homogentísico, ácido clorogénico y la mangiferina), resultaron positivos en cuanto a la barrera hematoencefálica. Es conocido que, cuanto menos unido esté un fármaco a las proteínas plasmáticas, más fácilmente podrá atravesar las membranas celulares o difundirse, lo que puede condicionar la distribución y eliminación del mismo.

Por otro lado, el metabolismo, mostró que, ninguno de los ligandos, incluido el compuesto de referencia, la mangiferina, fueron inhibidores de las isoformas de la enzima CYP450. Sin embargo, el ácido homogentísico resultó ser sustrato de dos de ellas (CYP450 2C9 y CYP450 2C19). El ácido gentísico, fue sustrato de la CYP450 C9 y el ácido clorogénico de la CYP450 3 A4.

Con respecto a la toxicidad, ninguno de los compuestos, resultaron bloqueadores de los canales hERG. Solo el ácido clorogénico mostró ser positivo a la posible hepatotoxicidad humana. En este sentido, estudios realizados por *Llauradó*,⁽¹⁷⁾ refirieron el restablecimiento de la función hepática en ratones BALB/C malnutridos y administrados por vía oral con un extracto crudo de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*. En dicho estudio *in vivo* no se evidenciaron manifestaciones de hepatotoxicidad.

Dichos investigadores constataron en el perfil de HPLC, la presencia de compuestos fenólicos, específicamente el ácido homogentísico. Este tipo de fenol se reporta como un buen candidato para la captación del radical 1- hidroxietil, y útil en la protección del hígado después del consumo de etanol.⁽⁴⁷⁾

Ninguno de los compuestos causó sensibilización cutánea y la mayoría, excepto el ácido clorogénico, pueden ser recomendados para una dosis máxima diaria.

Si bien los parámetros a considerar dentro de los estudios de toxicidad son variados, lo más importante es que los resultados apunten a un fármaco o producto que sea seguro desde el punto de vista de su aplicación.

Muchos agentes terapéuticos potenciales pueden no tener éxito en los ensayos clínicos debido a que sus parámetros ADME/T (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) no son favorables, además de no verificarse sus indicadores de similitud a un fármaco. De ahí que los estudios *in silico* constituyan herramientas útiles para futuros ensayos *in vitro/ in vivo*, así como para la realización de ensayos clínicos.

Conclusiones

El estudio predictivo *in silico* del acoplamiento molecular, las propiedades de similitud a un fármaco y las propiedades farmacodinámicas (ADME/T) revelaron las potencialidades de la fracción rica en fenoles de *Pleurotus ostreatus*, y en particular, del ácido homogentísico, como inhibidor de la enzima 5-LOX. Ello justifica el desarrollo de estudios confirmativos *in vitro/ in vivo* que corroboren sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto VLIR-IUC (Consejo de Universidades Flamencas-Programa de Cooperación Universitario para el Desarrollo mediante VLIR-UOS), en el contexto del Programa de Cooperación Institucional Universitaria con la Universidad de Oriente por haber facilitado la instalación y uso del HPC (*High Performance Computing*).

Referencias bibliográficas

1. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, *et al.* Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Front Physiol.* 2020;11:694-9.
2. Christie W, Harwood J. Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. *Essays Biochem.* 2020;64:401-21.
3. Smith ML, Murphy RC. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways. In: Ridgeway ND, McLeod RS, editors. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 6th ed. New York: Elsevier; 2016. p. 260-96.
4. Sinha SM, Doble M, Manju SL. 5-Lipoxygenase as a drug target: A review on trends in inhibitors structural design, SAR and mechanism based approach. *Biorg Med Chem.* 2019;27(17):3745-59.
5. Huang C. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506.
6. Kishore N, Kumar P, Shanker K, Verma AK. Human disorders associated with inflammation and the evolving role of natural products to overcome. *Eur J Med Chem.* 2019;179:272-309.
7. Taofiq O, Martins A, Barreiro MF, Ferreira ICFR. Anti-inflammatory Potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends Food Sci Technol.* 2016;50:193-210.
8. Sajon R, Sana S, Rana S, Rahman M, Mostarin Z. Mushrooms: Natural factory of anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and nutrition. *J Pharmacogn Phytochem.* 2018;7(1):464-75.
9. Ruthes AC, Smiderle FR, Lacomini M. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. *Carbohydr Polym.* 2016;136:358-75.

10. El Enshasy HA, Hattikaul R. Mushroom immunomodulators. Unique molecules with unlimited applications. *Trends Biotechnol.* 2013;31(12):668-77.
11. Heleno SA, Martins A, João M, Queiroz RP, Ferreira ICFR. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds. A review. *Food Chem.* 2015;173:501-13.
12. Singh RS, Walia AK, Kennedy JF. Mushroom lectins in biomedical research and development. *Int J Biol Macromol.* 2020;151:1340-50.
13. Dinesh R. The role of antioxidants and ROS scavenging machinery in wild mushrooms. In: Singh J, Gehlot P. editors. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.* UK: Elsevier; 2020. p 245-51.
14. Sánchez C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synth Syst Biotechnol.* 2017;2(1):13-22.
15. Piska K, Sułkowska-Ziaja K, Muszyńska B. Edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) - its dietary significance and biological activity. *Acta Sci Pol-Hortoru.* 2017;16(1):151-61.
16. Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y, Lebeque Y, Bermúdez RC, García N, *et al.* The use of mushrooms in the development of functional foods, drugs and nutraceuticals. In: Ferreira I, Barros L, Morales P. Editors. *Wild Plants, Mushrooms and Nuts: Functional Food Properties and Applications*, 1st ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.; 2017. p 123-57.
17. Llauradó G, Beltrán Y, Morris HJ, Marcos E, Diaz U, Marcos J, *et al.* Restoration of liver function in malnourished mice orally administered with *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies extract. *J Pharm Pharmacogn Res.* 2020;8(1):32-42.
18. Beltrán Y, Morris H, Reynaldo E, Quevedo Y, Bermúdez RC. Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2013;32(2):121-9.
19. Beltrán Y, Morris H, Aguirre RI, Quevedo Y, Armando T, Vázquez R, *et al.* Phenolic content and in vitro antioxidant activities of fruiting bodies extracts

- from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *J Int Soc Antioxid Nutr Health*. 2015;1(1).
20. Beltrán Y, Rojas JA, Morales I, Morris HJ. Acoplamiento molecular de compuestos fenólicos de *Pleurotus ostreatus* con proteínas del balance redox. *Rev Cubana Quím*. 2019;32(3):336-53.
21. Morris HJ, Hernández E, Llauradó G, Tejedor MC. In vitro antiproliferative effects on NB4 human leukemia cells and physicochemical screening of *Pleurotus* sp. (higher Basidiomycetes) mycelia from Cuba. *Int J Med Mushr*. 2014;16:239-45.
22. Aguirre R, Cutiño L, Peña J, Morris H, Beltrán Y, Llauradó G, *et al*. An in silico approach for evaluating the antitumor and epigenetic modulating potential of phenolic compounds occurring in edible and medicinal mushrooms. *Int J Phytocos Nat Ingred*. 2018;5(1):6.
23. Palacios I, Lozano M, Moro C, D'arrigo M, Rostagno MA, Martínez JA, *et al*. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chem*. 2011;128:674-8.
24. Muszynska B, Sulkowska-Ziaja K, Ekiert H. Phenolic acids in selected edible basidiomycota species: *Armillaria mellea*, *Boletus badius*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus* and *Pleurotus ostreatus*. *Acta Sci Pol-Hortoru*. 2013;12:107-16.
25. Gasecka M, Mleczek M, Siwulski M, Niedzielski P. Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *Eur Food Res Technol*. 2015;226:737-43.
26. Oke F, Aslim B. Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. *Food Chem*. 2011;128(3):613-9.
27. Evans DA. History of the Harvard ChemDraw project. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2014;53(42):11140-45.
28. Muruganandan S, Srinivasan K, Gupta S, Gupta PK, Lal J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2005;97(3):497-501.

29. Ghosal S, Rao G, Saravanan V, Misra N, Rana D. A plausible chemical mechanism of the bioactivities of mangiferin. *Indian J Chem B*. 1996;35(6):561-6.
30. Sethiya NK, Mishra SH. Investigation of Mangiferin, as a Promising Natural Polyphenol Xanthone on Multiple Targets of Alzheimer's Disease, *J Biol Act Prod Nat*. 2014;4(2):111-9.
31. Gilbert NC, Rui Z, Neau DB, Waight MT, Bartlett SG, Boeglin WE, *et al*. Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663. *FASEB J*. 2012;26:3222-29.
32. Ferrin T, Couch G, Pettersen E, Goddard T, Meng E, Yang Z, *et al*. UCSF Chimera. San Francisco, USA: University of California; 2010.
33. Sanner MF. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J Mol Graphics Mod*. 1999;17:57-61.
34. Meneses L, Cuesta S. Determinación computacional de la afinidad y eficiencia de enlace de antiinflamatorios no esteroideos inhibidores de la ciclooxigenasa 2. *Rev Ecuat Med Cienc Biol*. 2015;36(1-2):17-25.
35. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;46(1-3):3-26.
36. Daina A, Michielin O, Zoete V. Swiss ADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 2017;7:42717.
37. Dong J, Wang N, Yao Z, Zhang L, Cheng Y, Ouyang D, *et al*. ADMET lab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *J Cheminformatics*. 2018;10:29.
38. Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier JP. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(6):501-9.
39. Lee SW, Song JG, Hwang BS, Kim DW, Lee YJ, Woo EE, *et al*. Lipoxygenase inhibitory activity of Korean indigenous mushroom extracts and

- isolation of an active compound from *Phellinus baumii*. *Mycrobiology*. 2014;42(2):185-8.
40. Vyas A, Syeda K, Ahmad A, Padhye S, Sarkar FH. Perspectives on medicinal properties of mangiferin. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12:412-25.
41. Saha S, Rashid K, Sadhukhan P, Agarwal N, Sil PC. Attenuative role of mangiferin in oxidative stress-mediated liver dysfunction in arsenic-intoxicated murines. *Biofactors*. 2016;42:515-32.
42. Karuppanan M, Krishnan M, Padarthi P, Namasivayam E. Hepatoprotective and Antioxidant Effect of *Mangifera Indica* Leaf Extracts against Mercuric Chloride-induced Liver Toxicity in Mice. *Euroasian J Hepatogastroenterol*. 2014;4:18-24.
43. Hopkins AL, Keserü GM, Leeson PD, Rees DC, Reynolds CH. The Role of Ligand Efficiency Measures in Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(2):105-21.
44. Lin J, Masayo Yamazaki M. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(1):59-98.
45. Van Breemen R, Yongmei Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*. 2005;1(2):175-85.
46. Llauradó G, Farnet Da Silva AM, Hersens D, Gaime-Perraud I, Morris HJ, Moukha SM. In vitro comparative study of the influence of mycochemical composition of *Pleurotus* sp. crude extracts on the growth of tumoral cell lines. *Comunicaciones de la 21 Conferencia de Química*. Santiago de Cuba, Cuba. 2014. Diciembre 3-5.
47. Medina ME, Galano A, Trigos A. On the scavenging ability of homogentisic acid and ergosterol towards free radicals derived from ethanol consumption. *J Physical Chem B*. 2018;122(30):7514-21.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Yaixa Beltrán Delgado: Conceptualización, selección de la muestra, análisis formal, investigación, recursos, visualización, procesamiento de la información, redacción del borrador y redacción, revisión y edición de la versión final del documento.

Julio Rojas Vargas: Conceptualización, análisis formal, investigación, recursos, visualización, procesamiento de la información con el programa computacional, redacción del borrador y redacción, revisión y edición de la versión final del documento.

Isaac Morales González: Conceptualización, análisis formal, investigación, recursos, visualización, procesamiento de la información con el programa computacional,

Humberto Morris Quevedo: Conceptualización, análisis formal, investigación, visualización, procesamiento de la información, redacción del borrador y redacción, revisión y edición de la versión final del documento.