



Original

DESARROLLO DE UNA FÓRMULA ALIMENTICIA CON CBD PARA MITIGAR LOS SÍNTOMAS DEL COVID-19.

DEVELOPMENT OF A FOOD FORMULA WITH CBD TO MITIGATE THE SYMPTOMS OF COVID-19.

Alejandro Mauricio Vargas Upegui¹
Jennifer Paola Vergara Alzate²

³Diana Rivera Ciro
⁴Gustavo Rafael Hernández Sandoval

RESUMEN

Explorar biocompuestos presentes en todo tipo de reinos de la naturaleza puede ayudarnos a mitigar los síntomas presentados por la infección del virus COVID-19 que propició la pandemia del año 2020 y que costó millones de vidas a nivel mundial. **Objetivo:** La presente investigación busca el desarrollo de una fórmula alimenticia a partir de biocompuestos, que permita combatir los síntomas del COVID-19. **Materiales y métodos:** mediante una búsqueda bibliográfica de artículos con estudios in vitro, in silico y clínicos, una estimación de parámetros Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME), estudios en modelos celulares y herramientas como el acoplamiento molecular frente a 11 blancos proteicos virales, fue posible la selección de los biocompuestos más óptimos a través de una Red Neuronal Artificial. Posteriormente, se realizó una búsqueda bibliográfica para validar el cumplimiento de los parámetros de la legislación nacional, en su uso para fórmulas alimenticias, productos fitoterapéuticos y su seguridad en alimentos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), dando como resultado la identificación de 3 compuestos seleccionados (CBD, Ácido Eicosapentaenoico y Quercetina). Se seleccionó el Cannabidiol (CBD) para la realización de ensayos de viabilidad celular y de actividad antiviral frente al COVID-19 dado que este compuesto cumple con la legislación nacional para su implementación y se encuentra aprobado por la FDA en un medicamento de humanos, para tratar formas raras y graves de la epilepsia. **Resultados y Conclusión:** Estos ensayos in vitro dieron como resultado la no citotoxicidad y una actividad antiviral del 92% a una concentración de CBD de 6µM. El CBD se implementó posteriormente en una formulación alimenticia en polvo desarrollada por la unidad de investigación y desarrollo de la compañía ALSEC Alimentos Secos S.A.S., la cual permite mitigar los síntomas del COVID-19 y cumple con una actividad antiviral superior a la del principio activo solo.

Palabras claves:

Cannabidiol, Citotoxicidad, Actividad Antiviral, Acoplamiento molecular, Red neuronal Artificial, ADME, fórmula alimenticia.

ABSTRACT

Exploring biocompounds present in all types of kingdoms of nature can help us mitigate the symptoms presented by the COVID-19 virus infection that caused the 2020 pandemic and cost millions of lives worldwide. **Objective:** This research seeks the development of a food formula from biocompounds, which allows combating the symptoms of COVID-19. **Materials and methods:** through a bibliographic search of articles with in vitro, in silico and clinical studies, an estimation of Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion (ADME) parameters, studies in cellular models and tools such as molecular docking against 11 protein targets. viral, the selection of the most optimal biocompounds was possible through an Artificial Neural Network. Subsequently, a bibliographic search was carried out to validate compliance with the parameters of national legislation, in its use for food formulas, phytotherapeutic products and its safety in foods approved by the Food and Drug Administration (FDA), resulting in the identification of 3 selected compounds (CBD, Eicosapentaenoic Acid and Quercetin). Cannabidiol (CBD) was selected to carry out cell viability and antiviral activity tests against COVID-19 given that this compound complies with national legislation for its implementation and is approved by the FDA in a human medicine, for rare and severe forms of epilepsy. **Results and Conclusion:** These in vitro assays resulted in noncytotoxicity and an antiviral activity of 92% at a CBD concentration of 6µM. The CBD was subsequently implemented in a powdered food formulation developed by the research and development unit of the company ALSEC Productos Secos S.A.S., which allows mitigating the symptoms of COVID-19 and has an antiviral activity superior to that of the active ingredient alone.

Key words

Cannabidiol, Cytotoxicity, Antiviral Activity, Molecular Docking, Artificial Neuronal Network, ADME, Dietary Formula.



INTRODUCCIÓN

El virus SARS-CoV-2 con origen en Wuhan-China denominado por la OMS como COVID-19, es el virus que ha generado la pandemia a nivel mundial durante los años 2019 a 2022 (WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, s. f.). Aunque los coronavirus ya han sido identificados por la ciencia, esta mutación ha sido especial debido a su fácil propagación y que gran parte de los afectados son asintomáticos, además de su alta probabilidad de generar afecciones de salud en vías respiratorias en poblaciones vulnerables como son los adultos mayores y personas con comorbilidades (Rodríguez-Morales et al., 2020). Estas afecciones se traducen en hospitalizaciones prolongadas o incluso en la muerte de pacientes.

Frente a la premura del desarrollo acelerado de las vacunas dada la gran cantidad de contagiados a nivel mundial, las diferentes casas farmacéuticas se han visto limitadas para realizar estudios clínicos con un adecuado seguimiento y rigurosidad, puesto que el proceso suele tomar años para determinar la seguridad en pacientes; viéndose en la obligación de distribuir vacunas que han presentado efectos adversos en algunos pacientes (Shahcheraghi et al., 2021; Beatty et al., 2021)

Por esta razón, mediante este estudio se plantea la alternativa de utilizar biocompuestos presentes en la naturaleza como son los metabolitos secundarios presentes en las plantas (Singh, 2015), compuestos del reino animal, reino fungí entre otros, como posibles principios activos de una

fórmula alimenticia desarrollada para mitigar los síntomas asociados a esta afección viral.

Biocompuestos como el cannabidiol (CBD) presente en la planta conocida como Cannabis Sativa (Machado Bergamaschi et al., 2011), han despertado un gran interés en el mundo científico por características como actividad antiinflamatoria (Hobbs et al., 2020), antiepiléptico (Karaźniewicz-Łada et al., 2021), ansiolítico (Zuardi et al., 2017), antidepresivo (Silote et al., 2019), anticancerígeno (Koltai & Shalev, 2022) y antiviral (Pitakbut et al., 2021); evidenciadas mediante estudios in vitro, in vivo y clínicos. Además de contar con la aprobación de entes gubernamentales nacionales e internacionales que permiten su incorporación en determinados productos farmacéuticos brindando versatilidad en la utilización del biocompuesto (White, 2019). El desarrollo de una fórmula alimenticia permite la funcionalización de los alimentos para mitigar los síntomas presentados por el virus COVID-19 apoyando al sistema de salud nacional y reforzando el sistema inmune del consumidor (Khodadadi H. et al. 2020; Bialia M., et al. 2020).

METODOLOGÍA

Búsqueda de Proteínas Virales del COVID-19

La partícula viral del COVID-19 contiene una hebra de ARN (+) envuelta en una nucleocápside helicoidal (N) (Fehr & Perlman, 2015), un exterior con una proteína de

Tabla 1

Proteínas virales y blancos celulares asociados a la infección del virus COVID-19

	Código PDB	Blanco Celular o Viral	Referencias
1	5E84	BiP unión ATP	(Yang et al., 2015)
2	5X29	Proteína de envoltura (E)	(Surya et al., 2018)
3	6BB5	Oxiglobulina humana	(Terrell et al., 2018)
4	1R4L	ACE 2	(Towler et al., 2004)
5	5MIM	Receptor celular Furina	(Dahms et al., 2017)
6	7BQY	MPro	(Jin et al., 2020)
7	7BV2	NSPS	(Yin et al., 2020)
8	6YI3	Nucleocapside (N)	(Dinesh et al., 2020)
9	6W02	PIPro	(Michalska et al., 2020)
10	6VXX	Espiga (S)	(Walls et al., 2020)
11	5CE1	Receptor celular TMPRSS2	(Pendiente de publicación)

Nota: Las estructuras 3D de cada proteína viral o receptores celulares se descargaron en formato (PDB) mediante la base de datos online Protein Data Bank utilizada para la preparación de estudios in silico asociadas con diferentes tipos de afecciones en animales y humanos (Berman, 2000).

espiga (S) (Zhu et al., 2020) que le da la apariencia de corona, 16 proteínas no estructurales (NSPS) (Chan et al., 2020), 6 ORFS además de la proteína (M) (Hu et al., 2003) y envoltura (E) (Cao et al., 2021).

Se buscó en la literatura sobre el ciclo de replicación y el proceso de infección de la célula huésped con el virus COVID-19 (Shereen et al., 2020), se identificaron en artículos científicos 11 blancos virales proteicos en proceso de pre infección, post infección y asociados a receptores presentes en células huésped.

Estudio in silico de acoplamiento molecular

El análisis in silico de acoplamiento molecular, es un estudio en el cual se aproxima a una determinada área de la proteína, un biocompuesto para determinar la afinidad y las interacciones químicas entre el biocompuesto y el área estudiada. Esta área puede estar asociada a una determinada función celular o proteica que puede ser inhibida por un biocompuesto de estudio.

Para realizar el estudio de acoplamiento molecular se requiere de la estructura 3D de la proteína a estudiar, obtenida previamente, y la estructura 3D de los biocompuestos que se descargó en formato .SDF mediante la base de datos online Pubchem (Kim et al., 2015, Kim et al., 2018). Las estructuras moleculares de los biocompuestos fueron optimizadas mediante el software Avogadro 1.2.0 (Hanwell et al., 2012) con un campo de fuerza MMFF94 a un pH de 7,4. Las proteínas virales descargadas en formato .PDB fueron tratadas con el software libre UCSF Chimera 1.16 (Pettersen et al., 2004) con el cual se retiraron los interferentes como sales, cofactores, solventes y aquellas cadenas que no participan del estudio mejorando la precisión del acoplamiento molecular.

Con las estructuras 3D de las 11 proteínas y los biocompuestos seleccionados se realizó el estudio de acoplamiento molecular mediante el software libre Autodock 4.2 (Morris et al., 2009) que genera un complejo proteína-ligando dando como resultado 10 conformaciones por complejo al cual se asignó una energía de afinidad determinada por el número de interacciones débiles presentes en el mismo.

Finalmente, con el software MGLtools 1.5.7 se asignaron las cargas de Kollman a cada proteína y se da entrada al archivo de la proteína y el ligando para correr el programa de acoplamiento molecular.

Los resultados obtenidos se tabularon en la base de datos mostrando los valores de energía final (kcal/mol) y por pa-

rámetro como son la constante de inhibición (KI), energía relacionada a fuerzas de Van der Waals, desolvatación, interacciones débiles y el RMSD para determinar que conformación de complejos obtenidos presentan la mejor interacción frente a diferentes blancos virales y celulares.

Búsqueda de Biocompuestos

Se realizó una búsqueda de biocompuestos de diferentes reinos y orígenes en artículos científicos utilizando bases de datos online como son ScienceDirect, Springerlink, Pubmed, GoogleScholar, Elsevier, Scielo y Taylor and Francis Online; así mismo se corrobora si presentan estudios in silico, in vitro, in vivo o clínicos frente al virus COVID-19, permitiendo plantear un posible mecanismo de acción de los biocompuestos en caso de estar reportado. Utilizando la información recopilada se construyó una base de datos con biocompuestos de interés mediante la identificación de su estructura molecular y parámetros LADME asociados a una posible administración por vía oral mediante el cumplimiento de las cinco reglas de Lipinski (Lipinski, 2004). Estos parámetros fueron obtenidos por la herramienta online SwissADME perteneciente al Molecular Modeling Group del Swiss Institute of Bioinformatics (Daina et al., 2017), que mediante el código SMILES (Weininger, 1988) del biocompuesto arroja como resultado aquellos parámetros asociados a las reglas de Lipinski y su cumplimiento.

Parámetros como la toxicidad y los derivados de los estudios in vitro en diferentes modelos celulares, son vitales para determinar si pueden presentarse afecciones en seres humanos; por tanto, es importante la implementación de herramientas como la del sitio online PreADMET (Lee et al., 2003), para predecir los parámetros asociados a la toxicidad en diferentes modelos in vitro e in vivo, a través de la estructura molecular del biocompuesto para aquellos que no presentan estudios reportados en la literatura.

Red Neuronal Artificial

La programación de la Red Neuronal Artificial se realizó a través del lenguaje de programación de Python (Krogh, 2008), utilizando como parámetros de entrada las propiedades físicas, químicas y farmacológicas de los biocompuestos preseleccionados, además de las energías de afinidad entre las proteínas y los ligandos obtenidos de los cálculos de acoplamiento molecular. El porcentaje de precisión de la Red Neuronal Artificial programada fue superior al 86% dando como resultado los seleccionados como posible compuesto activo frente al virus COVID-19.

Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad se determinó mediante el ensayo de MTT (Supino, 1995), el cual se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol realizada por la enzima mitocondrial succinato-des-hidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido ampliamente usado para medir la supervivencia y actividad antiviral; de esta manera, la cantidad de formazán es directamente proporcional a la viabilidad celular.

Inicialmente, las células se sembraron a una densidad de 1x10⁵ células/pozo en una placa de 96 pozos en 200 µL de DMEM con 10% de FBS y se cultivaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Luego, las células fueron tratadas con diferentes diluciones del compuesto, a partir de una concentración determinada. Cuarenta y ocho horas después del tratamiento, se retiró el sobrenadante y se adicionó la solución de MTT (0.5 mg/ml). Después de 2h de incubación se adicionaron 130 µL/pozo de DMSO. Posteriormente, las placas se dejaron en agitación durante 15 minutos y finalmente se llevaron a un espectrofotómetro a 550nm para su análisis. Se incluyeron controles sin tratamiento, en los cuales la viabilidad celular se asumió como del 100%. Cada condición experimental fue evaluada por triplicado en 2 experimentos independientes (n=6).

Actividad Antiviral

Para los ensayos antivirales se evaluaron las concentraciones de los compuestos que mostraron menos del 20% de citotoxicidad (Díaz et al., 2020). Se sembraron 1x10⁵ células VERO E6/pozo en placas de 96 pozos durante 24 horas. Luego, diluciones no citotóxicas del compuesto fueron adicionadas a las células VERO E6, en réplicas de 3 pozos, por 1 hora. Después de este tiempo, se retiró el compuesto y las células fueron infectadas con el virus SARS-CoV-2 a una MOI de 0.01 por 1h. Después de este tiempo, el remanente de virus que no logró ingresar a las células se retiró y fue reemplazado por un medio de cultivo fresco y por nuevas diluciones del compuesto, estos cultivos se incubaron entre 48 a 72 horas a 37°C con 5% de CO₂. Finalmente, se evaluó la viabilidad celular por el método de MTT, el cual fue descrito anteriormente. Cada condición experimental fue evaluada por triplicado en 2 experimentos independientes (n=6).

El porcentaje de AAV se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ AAV} = 100 \times [(A-B) / (C-B)]$$

Donde

A: Densidad óptica (DO) de las células infectadas y tratadas con el compuesto.

B: DO de las células infectadas no tratadas (control positivo de infección).

C: DO de las células no infectadas ni tratadas (control negativo de infección).

Los compuestos y dosis que mostraron una actividad antiviral significativa en la prueba de tamizaje fueron adicionalmente verificados por plaqueo a partir de los sobrenadantes. El porcentaje de inhibición de la replicación viral fue calculado respecto al control de células infectadas no tratadas con el compuesto.

Desarrollo de la formulación Alimenticia

Para el desarrollo de la fórmula alimenticia se preparó una emulsión con una mezcla de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados principalmente omegas 3 (Gutiérrez et al., 2019) y 6 (Fisher & Harbige, 1997) por su efecto inmunomodulador reportado en la literatura, el cual permite combatir las infecciones en el organismo. Esta emulsión se elaboró con fibra prebiótica, estabilizante coloidal, proteína vegetal y antioxidantes, además del edulcorante natural no calórico (Alonso, 2010), importante para la aceptación sensorial del producto por parte de los consumidores. Posteriormente se pasa al equipo de secado por aspersión, el cual permite obtener un producto en polvo con un tamaño de partícula determinado y bajo contenido de agua, incrementando la durabilidad y manteniendo las características sensoriales y nutricionales de los compuestos.

Posteriormente el producto en polvo obtenido del proceso de secado de los aceites, se mezcla con vitaminas (A, D, E, B12, C, ácido fólico), minerales (Cu, Mg, Se, Zn), CBD (proveedores nacionales) y fructooligosacáridos (Gombart et al., 2020; World Health Organization, 2007). Finalmente, se adiciona una mezcla de probióticos como son *Lactobacillus rhamnosus* 1x10⁹, *Bifidobacterium lactis* 1x10⁹ y *Lactobacillus plantarum* 1x10⁹, microorganismos que al ser administrados en cantidades adecuadas mejoran la salud del huésped potenciando la respuesta inmune frente a afecciones respiratorias (Infusino et al., 2020). Estas mezclas de vitaminas, minerales y probióticos se realizaron luego del análisis de diferentes fuentes bibliográficas y del asesoramiento técnico por parte de los proveedores. Las cantidades suministradas deben ser de acuerdo a la cantidad diaria recomendada (RDA) estipulada en la resolución 3803 de 2016. Durante la etapa del mezclado

se agregaron los demás ingredientes de la formulación, como el anticompactante y los sabores que facilitan unas características sensoriales en el perfil de sabor del producto en función de la aceptación general por parte del consumidor final.

Mediante un estudio realizado en 50 personas sanas durante la administración diaria de 10 mg por día de CBD en el producto en polvo en humanos por un periodo de tiempo de 14 días, se determinó la percepción de la mejoría de síntomas en la población de estudio.

RESULTADOS

Con la búsqueda bibliográfica se identificaron al menos 305 biocompuestos de todo tipo de reinos, a los cuales se les predijo los parámetros LADME de cada uno de ellos mediante el sitio web SwissADME. Como resultado de esta búsqueda bibliográfica se obtuvo la información de aquellos estudios que se le han realizado a los biocompuestos tanto *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, y las concentraciones asociadas a la inhibición viral en el modelo celular seleccionado, la evaluación del compuesto aislado o en sinergia con otros compuestos químicos. Además de la revisión de patentes de desarrollo vinculadas a los biocompuestos; también se determinó si presentaban toxicidad en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* mediante el sitio web preADMET para la viabilidad de una posible evaluación *in vitro* o preclínica. Otro parámetro que se tuvo en cuenta fueron las energías de afinidad que, obtenidas mediante cálculos de acoplamiento molecular, permiten predecir una posible interacción y generar una hipótesis del sitio de unión del biocompuesto a nivel celular.

Estos resultados fueron importantes ya que permitieron desarrollar una base de datos de los biocompuestos para su implementación en un futuro y generar los parámetros de entrada para la Red Neuronal Artificial y seleccionar los mejores biocompuestos que presentan actividad antiviral. La Red Neuronal Artificial dio como resultado un total de 80 biocompuestos y se redujeron a 10 biocompuestos bajo los siguientes criterios de selección: si el biocompuesto es aprobado por la FDA como fármaco o alimento, ya sea como ingrediente activo o secundario; si cuenta con estudios preclínicos; si se encuentra en la base de datos de DailyMED o Market Insights para determinar si existen suplementos dietarios, alimentos o fármacos que contengan el biocompuesto en su composición como ingrediente activo o secundario; si se encuentra de forma natural en Latinoamérica; si se encuentra en la lista de Agentes Biocidas de la ECHA; si se encuentra en la base de datos del INVIMA como ingrediente de suplementos

Tabla 2

Biocompuestos seleccionados para la incorporación en la formulación alimenticia

Código pubchem (CID)	Nombre
446284	Ácido Eicosapentaenoico
5281855	Ácido Elágico
445858	Ácido Ferúlico
525	Ácido Málico
5281792	Ácido Rosmarínico
64945	Ácido Ursólico
5280450	Acido Alfa Linoleico
644019	Cannabidiol (CBD)
5280343	Quercetina
445154	Resveratrol

Nota: En la tabla se encuentran los códigos de identificación en la plataforma PubChem de los biocompuestos seleccionados para la fórmula alimenticia junto con el nombre de los mismos.

dietarios o productos fitoterapéuticos. Además, se consideró el caso en el que se obtuvieran registros del aceite esencial o extracto vegetal o del compuesto puro. Los 10 biocompuestos seleccionados, se listan en la tabla 2.

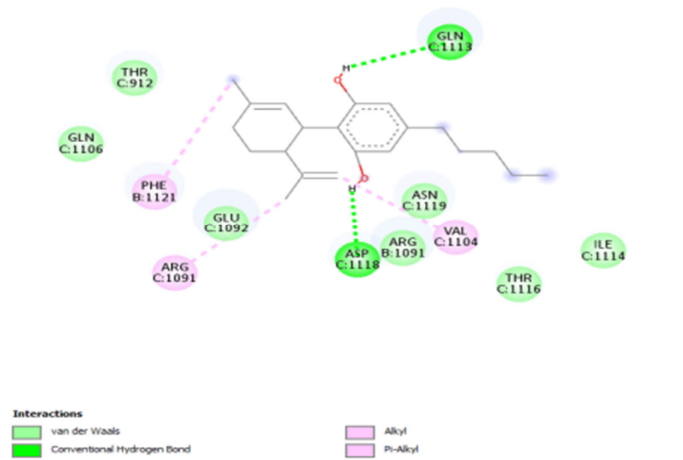
Adicionalmente, se consideraron aquellos biocompuestos que se encontraban en la base de datos de registros sanitarios de medicamentos del INVIMA como componente activo, obteniéndose como resultado tres biocompuestos: ácido eicosapentaenoico, cannabidiol (CBD) y quercetina.

De estos tres compuestos el único que cumple con todo lo anteriormente mencionado es el cannabidiol (CBD), el cual presenta una mejor afinidad con la proteína de espiga (S) con una energía de afinidad de -8.42 kcal/mol en la cadena C (Figura 1.) postulando un posible efecto inhibitorio, evitando la entrada a la célula huésped.

Una vez identificado el CBD mediante los estudios *in silico* de acoplamiento molecular, se procede a realizar estudios *in vitro* como son estudios de citotoxicidad y de actividad antiviral en células Vero-E6.

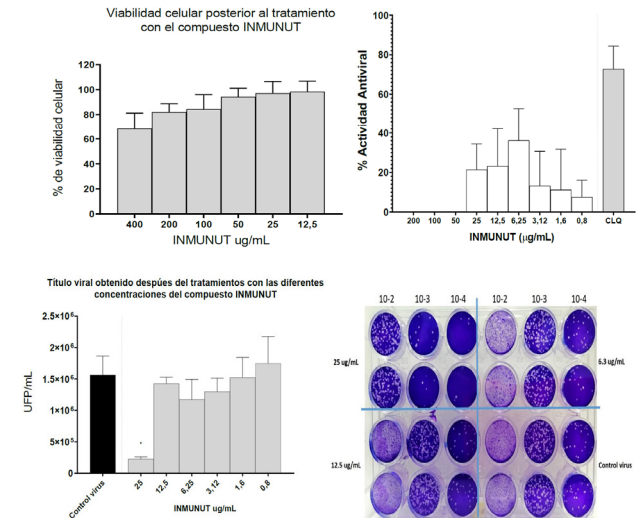
Los estudios de citotoxicidad MTT del cannabidiol dieron como resultado la no citotoxicidad en concentraciones entre 0.375 - 6 μ M, observándose proliferación celular frente al control, indicando que este biocompuesto favorece el crecimiento en la población celular del modelo Vero-E6. Con las concentraciones no citotóxicas ya identificadas se

Figura 1
Interacciones del CBD frente a la proteína S de COVID-19.



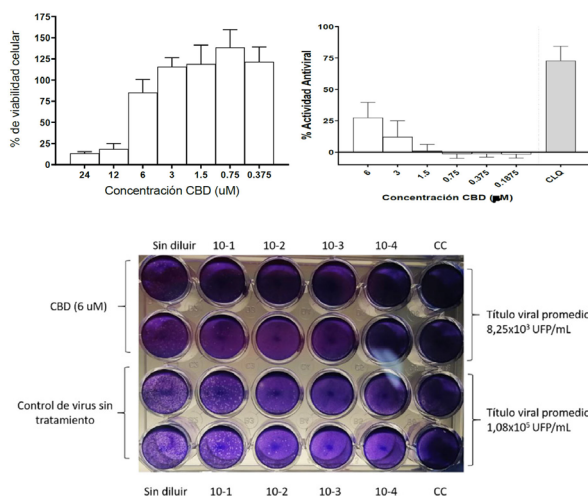
Nota: La figura representa la estructura molecular del CBD junto con el tipo de interacciones principales frente a la proteína S del COVID-19.

Figura 3
Resultados análisis in vitro para la formula alimenticia



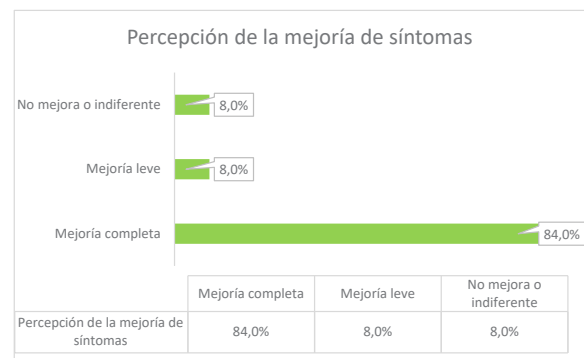
Nota: Ensayo de viabilidad celular (Parte superior izquierda), Actividad antiviral (Parte superior derecha), Titulo viral (parte inferior izquierda) y plaqueo (Parte inferior derecha) para la formula alimenticia Inmunut.

Figura 2
Resultados análisis in vitro para el CBD puro



Nota: En la figura se observa los resultados del ensayo de citotoxicidad (Parte superior izquierda), Actividad antiviral (Parte superior Derecha) y Plaqueo (Parte inferior) para el CBD puro

Figura 3
Resultados cuestionario de percepción de mejoría de síntomas



Nota: En la figura se observan los resultados del cuestionario cualitativo que fue realizado a los individuos objeto de estudio sobre la percepción de la mejoría respecto a los síntomas que presentaban producto de la infección ocasionada por el COVID-19

complementa con un estudio de actividad antiviral donde se obtiene que en una concentración $6\mu\text{M}$ presentó una actividad antiviral del 92% (Figura 2), lo cual corresponde a una tercera parte del control positivo con cloroquina, fármaco utilizado en enfermedades autoinmunes y anti-malárico.

El proceso de microencapsulación fue llevado a cabo mediante secado por aspersión utilizando la mezcla de aceites de maíz, linaza y girasol que son utilizados como vehículo y fuente de ácidos grasos poliinsaturados ricos en omegas 3 y 6, junto con emulsificantes, estabilizantes, entre otros. Durante el proceso de mezclado se pesan los macronutrientes del secado, (aceites, carbohidratos y proteínas), junto con los demás ingredientes como vitaminas, minerales, CBD, proteína láctea, estabilizantes, antioxidantes, probióticos y saborizantes; obteniendo la fórmula alimenticia en polvo denominada INMUNUT con el principio activo y antiviral de cannabidiol (CBD). Esta fórmula en polvo se obtiene mediante la técnica de secado por aspersión desarrollado por la compañía ALSEC Alimentos Secos S.A.S que cuenta con una experiencia de 15 años y con su unidad de investigación y desarrollo reconocido por Minciencias (Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación de Colombia).

Posterior al desarrollo de la fórmula alimenticia se le realizaron estudios in vitro en un modelo celular de células Vero-E6 donde estudios de citotoxicidad muestran un efecto no citotóxico en concentraciones inferiores $200\mu\text{g}/\text{ml}$. La actividad antiviral del producto en polvo por su parte dio como resultado una inhibición de 75% en una concentración del $25\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figura 3.). Esto comprueba que la fórmula alimenticia presenta actividad antiviral inferior en comparación con la actividad antiviral evaluada en el compuesto aislado de CBD, pero presenta una mejora en la biodisponibilidad del biocompuesto activo además de presentar una funcionalización de un alimento.

Adicionalmente, las pruebas sensoriales realizadas con un panel de expertos revelaron que además de la adición del saborizante a Vainilla, es necesaria para proveer un mejor perfil sensorial; considerando el enmascaramiento de los sabores característicos de las vitaminas y minerales utilizados en la formulación. A su vez, esta evaluación permitió la caracterización del sabor del producto en polvo dentro de un perfil lácteo, característico de los productos utilizados en el proceso de microencapsulación del secado por aspersión.

Dado que no existe claridad sobre la relación entre las dosis de CBD, sus niveles plasmáticos y su correspondiente efecto en la respuesta inmune, no es posible deter-

minar con certeza una dosis adecuada para esta prueba de aceptabilidad y adherencia. Teniendo en cuenta que en los ensayos in vitro el CBD inhibió la replicación viral a una concentración de $6\mu\text{M}$; se estimó que esto podría equivaler a una dosis de $0,15\text{ mg}/\text{kg}/\text{día}$ en humanos, lo cual correspondería a una dosis de $9,18\text{ mg}/\text{día}$ en un adulto de 60 kg ; por lo tanto, aproximamos la dosis a 10 mg . Es importante aclarar que esto es una estimación imprecisa dado que serían necesarios estudios en modelos animales para tener una mejor aproximación, para ser implementado en humanos.

Esta dosis se considera baja, por lo tanto, se espera que tenga un efecto inmunomodulador más no antiinflamatorio. En Colombia, el uso de CBD en grado farmacéutico (Neviot®) fue aprobado este año para el tratamiento co-ayudante de epilepsia refractaria en personas mayores de 2 años a una dosis de $10\text{ a }20\text{ mg}/\text{kg}/\text{día}$ (Strasser et al., 2016). Es decir que, para un adulto con un peso de 60 kg , la dosis más baja sería de 60 mg , lo cual es seis veces mayor que la propuesta en este estudio. Por lo tanto, se consideró que la dosis de $10\text{ mg}/\text{día}$ propuesta en este ensayo es segura.

Para los análisis relacionados con la aceptación, la adherencia y la tolerancia que presentaron los consumidores objeto de estudio; se realizaron cuestionarios cualitativos que permitieron identificar los efectos de mitigación de síntomas asociados a la infección por el virus COVID-19, en función de la percepción del grado de gravedad de la sintomatología captada por las personas que consumieron el producto y que se encontraban infectadas por el virus en cuestión, mostrando una percepción de mejoría completa de los síntomas en un 84% de la población de estudio, estos resultados se observan en la Figura 4. Corroborando los análisis in silico e in vitro realizados con anterioridad.

DISCUSIÓN

El CBD como ingrediente activo en la formulación de un alimento funcional, mostró tener efectos positivos relacionados a su capacidad como agente antiviral frente al virus COVID-19, en las evaluaciones in vitro realizadas en un modelo celular utilizando células Vero-E6 y en ensayos in silico que involucran las simulaciones de acoplamiento molecular, con proteínas involucradas en el proceso de infección del virus a la célula huésped. No obstante, estos estudios presentan una limitante respecto a la proyección del comportamiento de la matriz alimenticia en los procesos de digestión en seres vivos y sus posibles efectos secundarios, por tanto, se hace necesario la realización de estudios in vivo y clínicos que permitan dar cuenta la

viabilidad de la formulación alimentaria como tratamiento seguro para la prevención y mitigación de los síntomas asociados a infecciones por virus como el SARS-cov-2.

CONCLUSIONES

Mediante el uso de la ciencia, tecnología e innovación, se desarrolló una fórmula alimenticia que presenta una inhibición antiviral frente al COVID-19 con un 75% de actividad antiviral en estudios *in vitro*. Esta fórmula alimenticia presenta una menor actividad antiviral en comparación con el compuesto activo CBD (inhibición viral del 92%) pero al tener una menor concentración de CBD y tener un potencial nutracéutico permiten explorar la funcionalización de los alimentos.

La identificación de este principio activo fue llevada a cabo mediante el desarrollo de una base de datos de biocompuestos, la implementación de un estudio *in silico* de acoplamiento molecular y la programación de una Red Neuronal Artificial que facilitó la identificación de posibles biocompuestos para el desarrollo de la fórmula alimenticia. Se identificó una posible ruta de inhibición que presentó una afinidad en la proteína de espiga (S) evitando la entrada del virus a una célula huésped.

El desarrollo de este prototipo de fórmula alimenticia en polvo permitirá en un futuro, el desarrollo de otros alimentos con actividad terapéutica, potencial frente a diferentes afecciones a la salud humana, recalcando el compromiso social de la compañía ALSEC Alimentos Secos S.A.S y sus investigadores. Su implementación como fórmula alimenticia está en fase de aprobación por parte del INVIMA para que en un futuro pueda ser comercializada y contribuya a aliviar los síntomas de personas afectadas por el virus COVID-19.

RECONOCIMIENTOS

Al ser un proyecto vinculado Sistema de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación SENNOVA con el número 84478 se agradece Minciencias y al Sena por financiar esta investigación, a la sede del Sena de Rionegro y la saluda a los cuales se les hizo el proceso de transferencia del conocimiento del proyecto. Al área de investigación y desarrollo de la compañía ALSEC Alimentos Secos S.A.S que con su capital humano hizo posible el desarrollo de la fórmula alimenticia.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alonso, O & Copello, M. (2008). Reflexiones De Los Estu Beatty, A. L., Peyser, N. D., Butcher, X. E., Cocohoba, J. M., Lin, F., Olgin, J. E., Pletcher, M. J., & Marcus, G. M. (2021). Analysis of COVID-19 Vaccine Type and Adverse Effects Following Vaccination. *JAMA Network Open*, 4(12), e2140364. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.40364>
- Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Cao, Y., Yang, R., Lee, I., Zhang, W., Sun, J., Wang, W. & Meng, X. (2021). Characterization of the SARS CoV 2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Science*, 30(6), 1114–1130. <https://doi.org/10.1002/pro.4075>
- Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/2221751.2020.1719902>
- Dahms, S. O., Jiao, G. S. & Than, M. E. (2017). Structural Studies Revealed Active Site Distortions of Human Furin by a Small Molecule Inhibitor. *ACS Chemical Biology*, 12(5), 1211–1216. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01110>
- 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). <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Díaz, F. J., Aguilar-Jiménez, W., Flórez-Álvarez, L., Valencia, G., Laiton-Donato, K., Franco-Muñoz, C., Álvarez-Díaz, D., Mercado-Reyes, M. & Rugeles, M. T. (2020). Aislamiento y caracterización de una cepa temprana de SARS-CoV-2 durante la epidemia de 2020 en Medellín, Colombia. *Biomédica*, 40(Supl. 2), 148–158. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5834>
- Dinesh, D. C., Chalupska, D., Silhan, J., Koutna, E., Nencika, R., Veverka, V. & Boura, E. (2020). Structural basis of RNA recognition by the SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein. *PLOS Pathogens*, 16(12), e1009100. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009100>
- FDA news. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/la-fda-emite-cartas-de-advertencia-companias-que-venden-ilegalmente-productos-con-cbd-y-delta-8-thc#:~:text=La%20FDA%20no%20ha%20aprobado,raras%20y%20graves%20de%20epilepsia>.

- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*, 1-23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Fisher, B. A. & Harbige, L. S. (1997). Effect of omega-6 lipid-rich borage oil feeding on immune function in healthy volunteers. *Biochemical Society Transactions*, 25(2), 343S-343S. <https://doi.org/10.1042/bst025343s>
- Gombart, A. F., Pierre, A. & Maggini, S. (2020). A Review of Micronutrients and the Immune System—Working in Harmony to Reduce the Risk of Infection. *Nutrients*, 12(1), 236. <https://doi.org/10.3390/nu12010236>
- Gutiérrez, S., Svahn, S. L. & Johansson, M. E. (2019). Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5028. <https://doi.org/10.3390/ijms20205028>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Khodadadi H.; Lopes Salles E.; Jarrahi A.; Chibane F.; Costigliola V.; Yu J.; r Vaibhav K.; Hess D.; Krishnan. Dhandapani K.; and Baban B. (2020). Cannabidiol Modulates Cytokine Storm in Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by Simulated Viral Infection Using Synthetic RNA. *Cannabis and Cannabinoid Research*. Sep 2;5(3):197-20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32923657>.
- Hobbs, J. M., Vazquez, A. R., Remijan, N. D., Trotter, R. E., McMillan, T. V., Freedman, K. E., Wei, Y., Woelfel, K. A., Arnold, O. R., Wolfe, L. M., Johnson, S. A. & Weir, T. L. (2020). Evaluation of pharmacokinetics and acute anti-inflammatory potential of two oral cannabidiol preparations in healthy adults. *Phytotherapy Research*, 34(7), 1696-1703. <https://doi.org/10.1002/ptr.6651>
- Hu, Y., Wen, J., Tang, L., Zhang, H., Zhang, X., Li, Y., Wang, J., Han, Y., Li, G., Shi, J., Tian, X., Jiang, F., Zhao, X., Wang, J., Liu, S., Zeng, C., Wang, J. & Yang, H. (2003). The M Protein of SARS-CoV: Basic Structural and Immunological Properties. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 1(2), 118-130. [https://doi.org/10.1016/s1672-0229\(03\)01016-7](https://doi.org/10.1016/s1672-0229(03)01016-7)
- Infusino, F., Marazzato, M., Mancone, M., Fedele, F., Mastroianni, C. M., Severino, P., Ceccarelli, G., Santinelli, L., Cavarretta, E., Marullo, A. G. M., Miraldi, F., Carnevale, R., Nocella, C., Biondi-Zoccai, G., Pagnini, C., Schiavon, S., Pugliese, F., Frati, G. & d’Ettore, G. (2020). Diet Supplementation, Probiotics, and Nutraceuticals in SARS-CoV-2 Infection: A Scoping Review. *Nutrients*, 12(6), 1718. <https://doi.org/10.3390/nu12061718>
- Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., Zhang, B., Li, X., Zhang, L., Peng, C., Duan, Y., Yu, J., Wang, L., Yang, K., Liu, F., Jiang, R., Yang, X., You, T., Liu, X., . . . Yang, H. (2020). Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 582(7811), 289-293. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>
- Karąźniewicz-Łada, M., Główką, A. K., Mikulska, A. A. & Główką, F. K. (2021). Pharmacokinetic Drug–Drug Interactions among Antiepileptic Drugs, Including CBD, Drugs Used to Treat COVID-19 and Nutrients. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9582. <https://doi.org/10.3390/ijms22179582>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2018). PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D1102-D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., & Bryant, S. H. (2015). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202-D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Koltai, H. & Shalev, N. (2022). Anti-Cancer Activity of Cannabis sativa Phytocannabinoids: Molecular Mechanisms and Potential in the Fight against Ovarian Cancer and Stem Cells. *Cancers*, 14(17), 4299. <https://doi.org/10.3390/cancers14174299>
- Krogh, A. (2008). What are artificial neural networks? *Nature Biotechnology*, 26(2), 195-197. <https://doi.org/10.1038/nbt1386>
- Lee, S. K., Lee, I. H., Kim, H. J., Chang, G. S., Chung, J. E., & No, K. T. (2003). The PreADME Approach: Web-based program for rapid prediction of physico-chemical, drug absorption and drug-like properties. *EuroQSAR 2002 Designing Drugs and Crop Protectants: processes, problems and solutions*, 2003, 418-420
- Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
- Machado Bergamaschi, M., Helena Costa Queiroz, R., Waldo Zuardi, A. & Alexandre S. Crippa, J. (2011). Safety and Side Effects of Cannabidiol, a Cannabis sativa Constituent. *Current Drug Safety*, 6(4), 237-249. <https://doi.org/10.2174/157488611798280924>
- Michalska, K., Kim, Y., Jedrzejczak, R., Maltseva, N. I., Stols, L., Endres, M. & Joachimiak, A. (2020). Crystal structures of SARS-CoV-2 ADP-ribose



- phosphatase: from the apo form to ligand complexes. *IUCrJ*, 7(5), 814-824. <https://doi.org/10.1107/s2052252520009653>
- Bialia M.; Broers B.; Bessona M.; Demeulesa J. Cannabinoids and COVID-19. *Medical Cannabis and Cannabinoids*. 2020 Dec; 3(2): 111–115. Published online 2020 Aug 19. doi: 10.1159/000510799
- Molinspiration Cheminformatics. (2020, 1 junio). Molinspiration Cheminformatics. Recuperado 8 de agosto de 2022, de <https://www.molinspiration.com>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Bellew, R. K., Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pitakbut, T., Nguyen, G. N. & Kayser, O. (2021). Activity of THC, CBD, and CBN on Human ACE2 and SARS-CoV1/2 Main Protease to Understand Antiviral Defense Mechanism. *Planta Medica*, 88(12), 1047-1059. <https://doi.org/10.1055/a-1581-3707>
- R Singh. (2015). Medicinal Plants: A Review. *Journal of Plant Sciences*, 3(1), 50. <https://doi.org/10.11648/j.jps.s.2015030101.18>
- Rodriguez-Morales, A. J., Bonilla-Aldana, D. K., Balbin-Ramon, G. J., Rabaan, A. A., Sah, R., Paniz-Mondolfi, A., ... & Esposito, S. (2020). History is repeating itself: Probable zoonotic spillover as the cause of the 2019 novel Coronavirus Epidemic. *Infez Med*, 28(1), 3-5.
- Shahcheraghi, S. H., Ayatollahi, J., Aljabali, A. A., Shastri, M. D., Shukla, S. D., Chellappan, D. K., Jha, N. K., Anand, K., Katari, N. K., Mehta, M., Satija, S., Dureja, H., Mishra, V., Almutary, A. G., Alnuqaydan, A. M., Charbe, N., Prasher, P., Gupta, G., Dua, K., . . . Tambuwala, M. M. (2021). An overview of vaccine development for COVID-19. *Therapeutic Delivery*, 12(3), 235-244. <https://doi.org/10.4155/tde-2020-0129>
- Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N. & Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 24, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
- Silote, G. P., Sartim, A., Sales, A., Eskelund, A., Guimarães, F., Wegener, G. & Joca, S. (2019). Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 98, 104-116. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.04.006>
- Strasser, B., Geiger, D., Schauer, M., Gostner, J., Gatterer, H., Burtscher, M. & Fuchs, D. (2016). Probiotic Supplements Beneficially Affect Tryptophan–Kynurenine Metabolism and Reduce the Incidence of Upper Respiratory Tract Infections in Trained Athletes: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*, 8(11), 752. <https://doi.org/10.3390/nu8110752>
- Supino, R. (1995). MTT Assays. In *In Vitro Toxicity Testing Protocols*, 137-149. <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:137>
- Surya, W., Li, Y. & Torres, J. (2018). Structural model of the SARS coronavirus E channel in LMPG micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(6), 1309-1317. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.02.017>
- Terrell, J. R., Gumpfer, R. H. & Luo, M. (2018). Hemoglobin crystals immersed in liquid oxygen reveal diffusion channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(2), 1858-1863. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.038>
- Towler, P., Staker, B., Prasad, S. G., Menon, S., Tang, J., Parsons, T., Ryan, D., Fisher, M., Williams, D., Dales, N. A., Patane, M. A. & Pantoliano, M. W. (2004). ACE2 X-Ray Structures Reveal a Large Hinge-bending Motion Important for Inhibitor Binding and Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17996-18007. <https://doi.org/10.1074/jbc.m311191200>
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T. & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Weininger, D. (1988). SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 28(1), 31-36. <https://doi.org/10.1021/ci00057a005>
- Weiss, S. R., & Leibowitz, J. L. (2011). Coronavirus Pathogenesis. *Advances in Virus Research*, 85–164. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385885-6.00009-2>
- White, C. M. (2019). A Review of Human Studies Assessing Cannabidiol's (CBD) Therapeutic Actions and Potential. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 59(7), 923-934. <https://doi.org/10.1002/jcph.1387>
- WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. (2022, 5 agosto). World Health Organization (WHO). Recuperado 8 de agosto de 2022, de <https://covid19.who.int>



- World Health Organization. (2007). By World Health Organization Guidelines on food fortification with micro-nutrients Paperback - March 2007. WHO
- Yang, J., Nune, M., Zong, Y., Zhou, L. & Liu, Q. (2015). Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP. *Structure*, 23(12), 2191-2203. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.10.012>
- 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*, 368(6498), 1499-1504. <https://doi.org/10.1126/science.abc1560>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>
- Zuardi, A., de Souza Crippa, J., Hallak, J., Campos, A. & Guimarães, F. (2017). The Anxiolytic Effects of Cannabidiol (CBD). *Handbook of Cannabis and Related Pathologies*, e131-e139. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800756-3.00097-1>

NOTAS

¹Ingeniero Mecánico. Correo: mauricio.vargas@alsec.com.co.

²Magister en ciencia y tecnología de alimentos.

³Maestría en Innovación Alimentaria y Nutrición. Correo: diana.rivera@alsec.com.co

⁴Doctor en Ingeniería. Correo: gustavo.hernandez@alsec.com.co

