

Vol. 27 Núm. 1 (2025): Vol.27 Num.1 2025



REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA

Colombian Journal of Biotechnology

VOLUMEN 27 - NÚMERO 1 ENERO - JUNIO 2025, BOGOTÁ D.C., COLOMBIA



Imagen generada por IA que representa la integración entre bioprocesos e inteligencia artificial: el ADN y el cerebro simbolizan la biotecnología y la IA, el monitor con la mano robotizada representa la simulación, el monitoreo y el control por IA en los bioprocesos representados por el biorreactor realizada por el Doctor Luis Miguel Serrano Hernández, profesor Instituto de Biotecnología - IBUN, (2025)

MERCADOS | INVESTIGACIÓN | AVANCE CIENTÍFICO | DESARROLLO EN TECNOLOGÍA

Instituto de Biotecnología
Sede Bogotá

www.ibun.unal.edu.co



Editorial

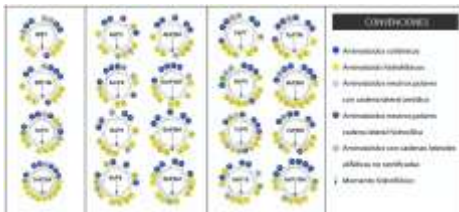


- Bioprocesses in the Era of Artificial Intelligence *Los Bioprocesos en la era de la Inteligencia Artificial*
Luis Miguel Serrano-Bermúdez

1-4

PDF

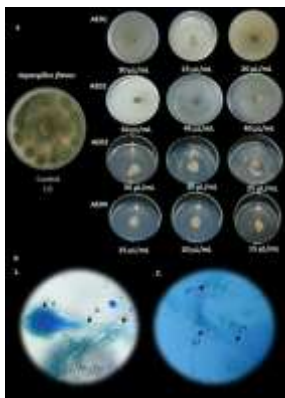
Artículos de Investigación



- Diseño de péptidos antimicrobianos in silico mediante el análisis de proteomas de virus, bacterias y hongos *In silico design of antimicrobial peptides through the analysis of viruses, bacteria and fungi proteomes*

5-15

PDF

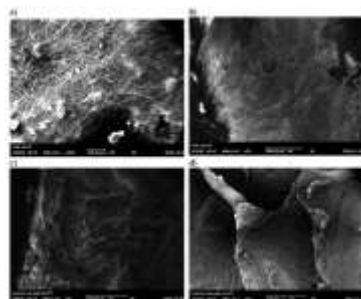


Evaluación del efecto inhibitorio de aceites esenciales sobre *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc., hongos autóctonos del cultivo de cacao
Evaluation of the inhibitory effect of essential oils on Aspergillus flavus and Fusarium solani (Mart.)Sacc., native fungi of cocoa cultivation

Raquel Amanda Villamizar Gallardo, Oscar Orlando Ortíz Rodríguez

16-25

PDF



Obtención de enzimas celulasas a partir de residuos agroindustriales por fermentación sumergida
Obtaining cell enzymes from agroindustrial waste by submersible fermentation

Edwin Daniel Mejía Florian, Nikol Daniela Delgado Monroy, Ana María Arismendy Pabón, Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza, Mónica Liliana Reyes Galvis

26-36

PDF



Análisis In Silico de la molécula OmcZ presente en los Nanocables Proteicos Conductores de Electricidad en *Geobacter*

sulfurreducens In Silico Analysis of Electrically Conductive Protein Nanowires in *Geobacter* spp. and OmcZ Gene in *G. sulfurreducens*.

Laura Andrea Acero Páez, Duverney Gaviria Arias

37-48

PDF

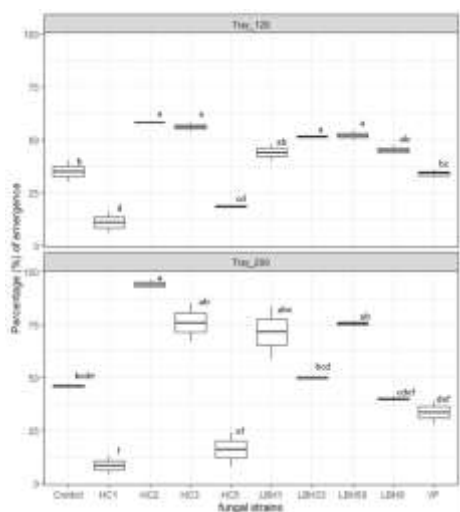


Producción de enzimas fúngicas M6P21 a partir de residuos de piña (Ananas Comosus) y maracuyá (Passiflora Edulis): Aprovechamiento biotecnológico para la valorización de subproductos agroindustriales Production of fungal enzymes from M6P21 using pineapple (*Ananas comosus*) and passion fruit (*Passiflora edulis*) waste: Biotechnological utilization for the valorization of agro-industrial by products

Mauren Cecilia Osorio Diaz, Luis Eliecer Oviedo Zumaqué, Licet Vanessa Durango Castilla

49-62

PDF



Effect of fungal microorganisms on promoting the growth of pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under controlled conditions

Efecto de microorganismos fúngicos en la promoción del crecimiento de plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en condiciones controladas

María Valeria Fernández Contreras , Verónica Rodríguez, Luberto Argenis Sánchez , Rossana Teresa Timaure, Alexis Valerio Valery Ramirez

63-71

- [PDF \(English\)](#)

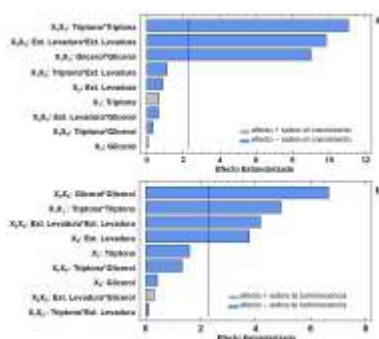


- Optimizing ex vitro Acclimatization of *Cinchona* spp.: Towards the establishment of an industrial crop in Colombia
- ## Optimización de la aclimatación ex vitro de *Cinchona* spp.: Hacia el establecimiento de un cultivo industrial en Colombia

Juan David Saavedra Correa, Silvia Lizette Bustamante Rodriguez, Robert Theiler

72-80

- [PDF \(English\)](#)



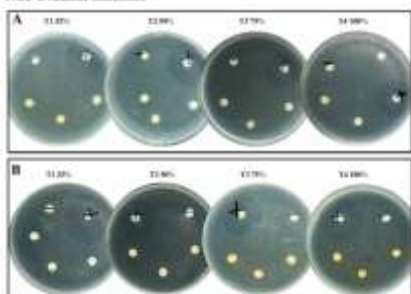
- Optimización del crecimiento y la luminiscencia de *Vibrio harveyi* CBM-992 en función de las concentraciones de nutrientes
- ## Optimization of growth and luminescence of *Vibrio harveyi* CBM-992 as a function of nutrient concentrations

Ayamey Pérez Oduardo, Eudalys Ortiz Guilarte, Thais Renee Chong Almaguer, María Victoria Iglesias Rodríguez, Carlos Álvarez Valcárcel, Gladys Margarita Lugioyo Gallardo, Roberto Núñez Moreira

81-92

PDF

FASE 4: Análisis estadístico



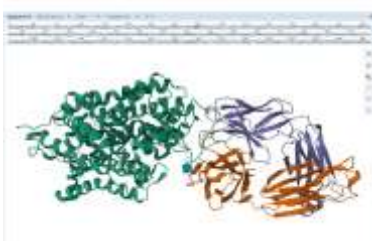
Efecto inhibidor de los extractos oleaginosos de *Coffea arabica* y *Ananas comosus* sobre *Enterococcus faecalis*
Inhibiting effect on oleaginous extracts of Coffea arabica and Ananas comosus on Enterococcus faecalis

Nelson Alfonso Vega Contreras, María Angélica Farfan Casadiego, Angie Lisandra García Pabón

93-102

PDF

5HEZ | pcd_000356z



Análisis y aplicación del acoplamiento molecular de serotonina para la caracterización de dianas terapéuticas en trastornos depresivos
Analysis and application of molecular docking of serotonin for the characterization of therapeutic targets in depressive disorders

Willington Londoño, Julio Cesar Caicedo Eraso

103-118

PDF

Los Bioprocesos en la era de la Inteligencia Artificial

Luis Miguel Serrano-Bermúdez*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.120748

Los bioprocesos son una rama de la biotecnología enfocada en el empleo de bioinsumos (células o sus derivados) y tecnologías para la producción y purificación de bioproductos de interés comercial a partir de materias primas. Estos bioproductos pueden clasificarse en *commodities*, como probióticos o biocombustibles, y *specialties*, como anticuerpos monoclonales o terapias génicas. Por otro lado, los avances científicos y tecnológicos han impulsado el desarrollo de la inteligencia artificial (IA), una herramienta disruptiva que forma parte de la Revolución 4.0 y que está transformando múltiples sectores, integrándose incluso en la vida cotidiana. En este contexto, la IA también tiene el potencial para ser integrada en los bioprocesos para mejorar indicadores clave relacionados con el bioproducto y las materias primas, como la producción, la productividad, el rendimiento y la conversión.

La IA, en particular mediante el aprendizaje automático (*Machine Learning*, ML) y el aprendizaje profundo (*Deep Learning*, DL), se está posicionando como una herramienta útil para abordar desafíos inherentes a los bioprocesos. Entre estos desafíos se encuentran la complejidad de los sistemas biológicos, la variabilidad de las materias primas y la necesidad de optimizar múltiples parámetros interdependientes. Las principales aplicaciones de la IA en bioprocesos incluyen por un lado el modelado, la simulación y la optimización de distintas etapas del bioproceso, que van desde el pretratamiento (*upstream processing*), pasando por el cultivo en el biorreactor hasta la purificación (*downstream processing*). Por otro lado, la IA ha sido empleada en el desarrollo de estrategias para la detección, el monitoreo y el control de bioprocesos.

Las técnicas de IA más utilizadas en el modelado, la simulación y la optimización de bioprocesos incluyen redes neuronales artificiales (*Artificial Neural Networks*, ANN), máquinas de vectores de soporte (*Support Vector Machines*, SVM), lógica difusa (*Fuzzy Logic*, FL), algoritmos genéticos (*Genetic Algorithms*, GA) y optimización por enjambre de partículas (*Particle Swarm Optimization*, PSO), cada una con sus ventajas y limitaciones. La aplicación más relevante de la IA en el modelado es la predicción del crecimiento microbiano y la formación de bioproductos y coproductos en el biorreactor en función de diversas variables, como las fuentes de carbono y nitrógeno. Además, la IA ha sido utilizada para predecir la producción y productividad a escalas superiores a partir de ensayos prototipo.

Referente a la optimización de bioprocesos, la IA ha demostrado ser útil no solo en el biorreactor, sino también en todas las operaciones unitarias del bioproceso, incluyendo intercambiadores de calor, separación y purificación mediante destilación, extracción, intercambio iónico y cromatografía. En este sentido, técnicas como PSO y modelos multi-objetivo han sido clave en la identificación de condiciones óptimas del bioproceso, permitiendo incluso su integración con ANN y GA, las cuales han sido empleadas para modelar el biorreactor.

Además, la IA ha avanzado en el desarrollo de tecnologías de detección y monitoreo. Por ejemplo, se ha estudiado la combinación de la IA con métodos basados en espectroscopia, como la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy*, NIRS) y la espectroscopia UV-Vis, para el análisis cualitativo y cuantitativo de componentes en tiempo real, como la concentración de metabolitos. De forma similar, el análisis de imágenes mediante redes neuronales convolucionales (*Convolutional Neural Networks*, CNN) ha demostrado ser útil para la detección de espuma en biorreactores o la predicción de la madurez del compost. Una estrategia innovadora en este campo es el uso de sensores blandos asistidos por IA, los cuales emplean sensores de bajo costo y alta precisión, como pH-metros y sensores de oxígeno disuelto, para monitorear parámetros como la concentración de biomasa y el crecimiento en biorreactores, así como los niveles de demanda química de oxígeno (DQO) en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR).

* Bioprocesses and Bioprospecting Group, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Carrera 30 No. 45-03, Bogotá D.C., Colombia. lmserranob@unal.edu.co.

Otro campo en el que la IA ha mostrado progresos significativos es el control de bioprocesos, el cual está estrechamente vinculado con las tecnologías de monitoreo. Un ejemplo de ello es el desarrollo de estrategias basadas en redes neuronales artificiales, recurrentes y profundas (ANN, *Recurrent Neural Networks* - RNN, *Deep Neural Networks* - DNN, respectivamente) para la optimización dinámica y el control en tiempo real de variables, como mecanismo de alimentación de sustrato en biorreactores de lote alimentado. Estas estrategias incluyen el ajuste de trayectorias óptimas y la implementación de sistemas de control con retroalimentación. Adicionalmente, la lógica difusa ha demostrado ser eficaz en el desarrollo de estrategias de control en escenarios con alta incertidumbre. Estos avances sugieren que las estrategias de control asistidas por IA mejorarán la estabilidad, eficiencia y productividad de los bioprocesos industriales.

A pesar de su potencial, la implementación de la IA en bioprocesos enfrenta desafíos importantes. La calidad y cantidad de datos disponibles para entrenar modelos de ML son factores críticos, mientras que la obtención de datos en condiciones industriales sigue siendo un reto. Además, la interpretabilidad de modelos complejos, como las DNN, puede ser limitada, lo que dificulta su adopción en entornos industriales. Otros desafíos incluyen la convergencia prematura en la optimización, el sobreajuste en redes neuronales y los altos costos computacionales. Asimismo, la aplicación industrial de la IA en bioprocesos sigue siendo incipiente debido a la falta de hardware especializado y a la necesidad de mayor validación experimental.

No obstante, estos desafíos representan oportunidades para continuar avanzando en la integración de la IA en los bioprocesos a través de soluciones innovadoras. Por ejemplo, en el modelado y la simulación, los modelos híbridos combinan la IA con modelos mecanicistas del biorreactor, la población o la célula. Esta integración mejora la precisión de las predicciones del bioproceso y reduce la carga computacional. Un ejemplo de modelos mecanicistas aplicados a biorreactores son los modelos cinéticos convencionales de “caja negra”, como el modelo de Monod. Por otro lado, un ejemplo de un modelo mecanicista celular es un modelo de biología de sistemas construido a partir de datos ómicos, como los genómicos, transcriptómicos o proteómicos. Asimismo, la integración de IA con modelos de dinámica de fluidos computacional (*Computational Fluid Dynamics*, CFD) es un área prometedora para optimizar tanto el diseño de biorreactores como el escalamiento de bioprocesos. Finalmente, la formación de profesionales con conocimientos en IA y en bioprocesos será clave para la implementación efectiva de estas tecnologías en la industria, impulsando la transición hacia bioprocesos más eficientes, sostenibles y sustentables.

Resumiendo, la integración de la inteligencia artificial en los bioprocesos representa una oportunidad tecnológica con el potencial de optimizar la producción, reducir costos y mejorar los tiempos de operación en la industria biotecnológica. A pesar de los desafíos existentes, el desarrollo de enfoques híbridos y la creciente accesibilidad a herramientas computacionales permitirán una adopción más eficiente de la IA en este campo. Para ello, será fundamental contar con talento humano capacitado que facilite su implementación y maximice su impacto. Estos avances contribuirán al desarrollo de bioproductos que fortalezcan la bioeconomía de manera más sostenible y sustentable.

Bibliografía

Cheng Y., Bi X., Xu Y., Liu Y., Li J., Du G., Lv X., Liu L. *Artificial intelligence technologies in bioprocess: Opportunities and challenges*. Bioresource Technology, (2023). 369.

Bioprocesses in the Era of Artificial Intelligence

*Luis Miguel Serrano-Bermúdez**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.120748

Bioprocesses are a branch of biotechnology focused on the use of bioinputs (cells or their derivatives) and technologies for the production and purification of commercially relevant bioproducts from raw materials. These bioproducts can be classified into commodities, such as probiotics or biofuels, and specialties, such as monoclonal antibodies or gene therapies. On the other hand, scientific and technological advances have driven the development of artificial intelligence (AI), a disruptive tool that is part of the Fourth Industrial Revolution and is transforming multiple sectors, even integrating into daily life. In this context, AI also has the potential to be integrated into bioprocesses to improve key indicators related to the bioproduct and raw materials, such as production, productivity, yield, and conversion.

AI, particularly through machine learning (ML) and deep learning (DL), is positioning itself as a useful tool for addressing challenges inherent to bioprocesses. These challenges include the complexity of biological systems, the variability of raw materials, and the need to optimize multiple interdependent parameters. The main applications of AI in bioprocesses include, on one hand, modeling, simulation, and optimization of different stages, ranging from upstream processing to bioreactor cultivation and downstream processing. On the other hand, AI has been employed in developing strategies for detection, monitoring, and control of bioprocesses.

The most widely used AI techniques in bioprocess modeling, simulation, and optimization include artificial neural networks (ANN), support vector machines (SVM), fuzzy logic (FL), genetic algorithms (GA), and particle swarm optimization (PSO), each with its advantages and limitations. The most relevant AI application in modeling is the prediction of microbial growth and bioproduct and coproduct formation in the bioreactor based on various variables, such as carbon and nitrogen sources. Furthermore, AI has been used to predict production and productivity at larger scales based on prototype trials.

Regarding bioprocess optimization, AI has proven useful not only in the bioreactor but also in all unit operations of the bioprocess, including heat exchangers, separation, and purification through distillation, extraction, ion exchange, and chromatography. In this regard, techniques such as PSO and multi-objective models have been key in identifying optimal bioprocess conditions, even allowing their integration with ANN and GA, which have been used to model the bioreactor.

Moreover, AI has advanced in the development of detection and monitoring technologies. For instance, the combination of AI with spectroscopy-based methods, such as near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) and UV-Vis spectroscopy, has been studied for real-time qualitative and quantitative analysis of components such as metabolite concentration. Similarly, image analysis using convolutional neural networks (CNN) has proven useful for detecting foam in bioreactors or predicting compost maturity. An innovative strategy in this field is the use of AI-assisted soft sensors, which employ low-cost, high-precision sensors, such as pH meters and dissolved oxygen sensors, to monitor parameters like biomass concentration and growth in bioreactors, as well as chemical oxygen demand (COD) levels in wastewater treatment plants (WWTPs).

* Bioprocesses and Bioprospecting Group, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Carrera 30 No. 45-03, Bogotá D.C., Colombia. lserranob@unal.edu.co

Another field where AI has shown significant progress is bioprocess control, which is closely linked to monitoring technologies. An example is the development of strategies based on artificial, recurrent, and deep neural networks (ANN, RNN, and DNN, respectively) for dynamic optimization and real-time control of variables such as substrate feeding mechanisms in fed-batch bioreactors. These strategies include optimal trajectory adjustment and the implementation of feedback control systems. Additionally, fuzzy logic has proven effective in developing control strategies in highly uncertain scenarios. These advances suggest that AI-assisted control strategies will enhance the stability, efficiency, and productivity of industrial bioprocesses.

Despite its potential, AI implementation in bioprocesses faces significant challenges. The quality and quantity of data available for training ML models are critical factors, while data acquisition under industrial conditions remains a challenge. Furthermore, the interpretability of complex models, such as DNNs, can be limited, hindering their adoption in industrial environments. Other challenges include premature convergence in optimization, overfitting in neural networks, and high computational costs. Additionally, the industrial application of AI in bioprocesses remains incipient due to the lack of specialized hardware and the need for further experimental validation.

Nevertheless, these challenges present opportunities to continue advancing AI integration in bioprocesses through innovative solutions. For instance, in modeling and simulation, hybrid models combine AI with mechanistic models of the bioreactor, population, or cell. This integration improves the accuracy of bioprocess predictions and reduces computational load. An example of mechanistic models applied to bioreactors includes conventional "black-box" kinetic models, such as the Monod model. On the other hand, an example of a cellular mechanistic model is a systems biology model built from omics data, such as genomic, transcriptomic, or proteomic data. Additionally, AI integration with computational fluid dynamics (CFD) models is a promising area for optimizing both bioreactor design and bioprocess scaling. Finally, training professionals with expertise in AI and bioprocesses will be key to effectively implementing these technologies in industry, driving the transition towards more efficient, sustainable, and environmentally friendly bioprocesses.

In summary, the integration of artificial intelligence into bioprocesses represents a technological opportunity with the potential to optimize production, reduce costs, and improve operational times in the biotechnology industry. Despite existing challenges, the development of hybrid approaches and the increasing accessibility of computational tools will enable more efficient AI adoption in this field. To achieve this, it will be essential to have skilled professionals who can facilitate its implementation and maximize its impact. These advances will contribute to the development of bioproducts that strengthen the bioeconomy in a more sustainable and environmentally friendly manner.

References

Cheng Y., Bi X., Xu Y., Liu Y., Li J., Du G., Lv X., Liu L. Artificial intelligence technologies in bioprocess: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, (2023). 369.

Diseño de péptidos antimicrobianos *in silico* mediante el análisis de proteomas de virus, bacterias y hongos

In silico design of antimicrobial peptides through the analysis of viruses, bacteria and fungi proteomes

Jairo Alexander Morillo Garces*, Sergio Orduz**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.114445

RESUMEN

Debido a la creciente resistencia de microorganismos patógenos a los antibióticos, se ha visto la necesidad de encontrar nuevos compuestos antimicrobianos como opciones de tratamiento. En respuesta, se han adoptado enfoques alternativos, entre los cuales se encuentran los péptidos antimicrobianos (PAMs) que son parte natural del sistema inmunológico de todos los organismos. Existen estudios que han demostrado las ventajas que presentan los PAMs en comparación con los antibióticos habituales como su actividad de amplio espectro, mecanismos de acción y selectividad hacia las células bacterianas sobre las células huésped y menor probabilidad de generar resistencia. Razones por las cuales esta investigación se enfocó en la identificación, selección, modificación y evaluación *in silico* de los PAMs encontrados en el proteoma de virus, bacterias y hongos mediante el uso de herramientas bioinformáticas y de inteligencia artificial específicas, que estimaron parámetros como estructura, función, posible modo de acción, capacidad hemolítica, toxicidad, capacidad de unión a membrana, y su capacidad antimicrobiana. Lo que sugiere que los nuevos péptidos encontrados en este estudio sean candidatos a futuros ensayos *in vitro* e *in vivo* como una alternativa efectiva a los antibióticos tradicionales.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, inteligencia artificial, resistencia antimicrobiana, bioinformática.

ABSTRACT

With the increasing resistance of pathogenic organisms to antibiotics, the need to find new antimicrobial compounds as treatment options has increased. In response, alternative approaches have been adopted, among which are antimicrobial peptides (AMPs). AMPs are a natural part of the immune system of all organisms. Several studies have shown that AMPs have a great advantage compared to usual antibiotics based on their broad-spectrum activity, mechanisms of action, and selectivity to bacterial cells over host cells, and less likely to generate resistance. For these reasons, this research aimed at the identification, selection, modification, and *in silico* evaluation of AMPs found in the proteome of viruses, bacteria, and fungi through the use of specific bioinformatics and artificial intelligence tools that assessed parameters such as structure, function, possible mode of action, hemolytic capacity, toxicity, membrane binding capacity, and mainly its antimicrobial capacity. Whence, the novel peptides found in this research are expected to be candidates for future *in vitro* and *in vivo* trials as an effective alternative to traditional antibiotics.

Keywords: Antimicrobial peptides, artificial intelligence, antimicrobial resistance, bioinformatics.

Recibido: mayo 27 de 2024

Aprobado: marzo 10 de 2025

* Zootecnista, M.Sc., en Ciencias-Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. jmorillo@unal.edu.co
ORCID 0000-0002-5315-1123

** Biol., M.Sc., Ph.D. Profesor Titular, Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Carrera 65 No 59^a-110. 050034. sorduzp@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

En los últimos ochenta años, los antibióticos han desempeñado un papel crucial en la preservación de la vida y la salud humana, así como en el impulso de la producción animal, lo que ha tenido un impacto significativo en el desarrollo socioeconómico. No obstante, el uso indebido de estos medicamentos ha exacerbado el problema de la resistencia bacteriana, lo que representa una amenaza creciente. La resistencia compromete la eficacia de los tratamientos y puede conducir al fracaso terapéutico y al aumento, tanto de la morbilidad como de la mortalidad, lo que a su vez se traduce en costos sanitarios más elevados. La Organización Mundial de Sanidad Animal estimó que el consumo mundial de antibióticos veterinarios alcanzó las 76.704 toneladas en 2018 (Gehring *et al.*, 2023). Además, se estimó que el consumo mundial de antibióticos en entornos clínicos aumentó de 9,8 dosis diarias definidas (DDD) por 1000 habitantes por día en el año 2000 a 14,3 DDD por 1000 habitantes por día en el 2018 (Browne *et al.*, 2021). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2021 ha señalado que la resistencia a los antimicrobianos figura entre las diez principales amenazas para la salud pública a nivel global. El abuso y el uso excesivo de antimicrobianos son los factores primordiales que impulsan la selección de patógenos resistentes a los medicamentos. La falta de antimicrobianos eficaces compromete los avances de la medicina moderna en el tratamiento de infecciones, especialmente durante procedimientos quirúrgicos importantes. Con el incremento de la resistencia a los antibióticos, se vuelven más frecuentes las infecciones difíciles de tratar, lo que contribuye al aumento de la mortalidad. Por lo que se requieren nuevas alternativas a los antimicrobianos tradicionales.

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son reconocidos como moléculas con actividad antimicrobiana, con baja toxicidad y baja probabilidad de generar resistencia. (Makhlynets y Caputo, 2021). Algunos PAMs pueden actuar con un efecto letal directo, mientras que otros tienen actividad como antibiofilm, neutralización de toxinas o actividad inmunomoduladora. En el primer caso, su principal modo de acción es la alteración de la integridad de la membrana (Weeks *et al.*, 2021). Los PAMs tienen aplicaciones en áreas agrícolas, biológicas, médicas y fisiológicas, además de tener uso potencial en producción animal (Xiao *et al.*, 2015). En enero de 2025, la base de datos de péptidos antimicrobianos APD3 reporta 5099 péptidos, incluidos 3306 péptidos antimicrobianos naturales.

La bioinformática ha surgido como respuesta al crecimiento exponencial de datos generados por técnicas de

secuenciación de proteínas y de genomas, lo que ha llevado a la construcción de bases de datos y al desarrollo de algoritmos informáticos eficientes (Ebrahimi *et al.*, 2023). Estas bases de datos contienen información diversa, desde funciones y estructuras, hasta similitudes de secuencias y estructuras tridimensionales de moléculas (Radusky, 2017). La bioinformática ha evolucionado rápidamente y se ha convertido en una herramienta crucial en diversas áreas, como biología molecular, química computacional, genética, farmacología, agricultura y medicina (Patel *et al.*, 2021). Por otra parte, los péptidos antimicrobianos ofrecen una alternativa farmacéutica prometedora, pero pueden ser sensibles a condiciones ambientales, tener potencial de toxicidad y ser costosos de producir (Pfalzgraff *et al.*, 2018). Para su aplicación clínica es esencial desarrollar análogos sintéticos estables que superen estas limitaciones. Con el objetivo de acelerar este proceso y reducir costos, este estudio describe la selección, análisis y modificación *in silico* de péptidos antimicrobianos encontrados en proteomas de virus, bacterias y hongos, utilizando herramientas bioinformáticas y de inteligencia artificial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de proteomas y de posibles PAMs

Se seleccionaron proteomas de virus, bacterias y hongos de UniProtKB (The Universal Protein Knowledgebase, 2024) para ser analizadas con PepMultiFinder 2.0 (Branch *et al.*, 2022a) con las variables de búsqueda seleccionadas de acuerdo a la metodología de Duque-Salazar *et al.* (2020), salvo el tamaño de los péptidos, ya que el costo de síntesis es menor para péptidos más cortos cuando se realizan ensayos *in vitro*. Además, los péptidos pequeños tienen menos probabilidad de ser degradados por proteasas. La clasificación de los péptidos como posibles PAMs se realizó con herramientas de inteligencia artificial disponibles en CAMPR3 (Waghu e Ilicula-Thomas, 2020), AmpClass 1.0 (Branch *et al.*, 2022b) y AMP Scanner Vr.2 (Veltri *et al.*, 2018). Se seleccionaron péptidos con probabilidad antimicrobiana igual o superior al 98%.

Evaluación de seguridad, índice de inestabilidad de los péptidos y anclaje en membranas

Los péptidos seleccionados se evaluaron en las plataformas HAPPENN (Timmons y Hewage, 2023) y HEMOPI-3 (Chaudhary *et al.*, 2016) valorando su capacidad hemolítica y la predicción de la toxicidad se realizó en TOXINPRED (Gupta *et al.*, 2013). En ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) se evaluó el índice de inestabilidad de los péptidos, también se estimó la predicción de anclajes anfipáticos en membranas con AMPHIPASEEK (Sapay *et al.*, 2006) y en AllerTOP v.2 (Dimitrov *et al.*, 2014), se realizó la predicción de alergenidad.

Modificación de los péptidos antimicrobianos

Se seleccionaron y modificaron 10 péptidos, con el objetivo de mejorar sus propiedades fisicoquímicas con ayuda de TYPE-PEPTIDE (Tamayo *et al.*, 2018) y de Heli-Quest (Gautier *et al.*, 2008), identificando sus principales propiedades fisicoquímicas. Las modificaciones no abarcaron más del 50% de los aminoácidos de cada péptido verificando que conservaran sus efectos citotóxicos, antimicrobianos, no hemolíticos y no alergénicos.

Predicción de la actividad antimicrobiana con patógenos específicos y determinación de estructura 3D

Finalmente, los péptidos resultantes se analizaron en la plataforma DBAASP v3, (Pirtskhalava *et al.*, 2021) para predecir el potencial antimicrobiano de los PAMs contra microorganismos patógenos particulares y se utilizó AlphaFold2 (Mirdita *et al.*, 2022) para predecir la estructura 3D de los péptidos y sus homólogos modificados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Organismos evaluados y péptidos resultantes

Para evaluar la eficacia del análisis de proteomas y asegurar un análisis confiable y preciso, se estableció como mínimo examinar 150,000 proteínas. Este umbral permitió la selección de 65 proteomas que dieron lugar a un total de 195,258 proteínas para ser analizadas mediante herramientas bioinformáticas. De este total, 126,167 fueron de bacterias, 58,748 de hongos y 10,343 de virus.

Se analizaron los proteomas con PepMultiFinder 2.0, que identificaron 741,791 péptidos, 468,620 de bacterias, 249,065 de hongos y 24,106 de virus. Estos péptidos se evaluaron utilizando los clasificadores de CAM-PR3, AmpClass 1.0 y AMP Scanner Vr.2, estableciendo como criterio que la mayoría de los algoritmos de cada clasificador tuviera una probabilidad mayor o igual al 98%; como resultado se seleccionaron 318 péptidos.

Tabla 1. Péptidos seleccionados en el análisis bioinformático de proteomas con PepMultiFinder 2.0 y su información de origen.

Nombre	Péptido	Organismo de origen	Nombre del organismo	Nº de proteínas	Código del proteoma en UniProt	Nº de péptidos encontrados
BfP1	GGIFKKT F ALLKKI	Virus	<i>Brevibacillus fago Emery</i>	102	UP000015097	217
OvP2	LVLKKLKKLIK QLPNA</td><td>Virus</td><td><i>Orpheovirus IHUMI-LCC2</i></td><td>1.199</td><td>UP000236316</td><td>2.354</td></tr><tr><td>AbP3</td><td>GLKRALTL FKWI	Bacteria	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	9.474	UP000318527	22.402
AmP4	LRLFKGS I KAFIK	Bacteria	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	4.467	UP000001572	15.904
BsP5	FSKAFGW V KKIF	Bacteria	<i>Bacillus safensis</i>	3.746	UP000325032	18.284
BsP6	IGKRIKKY I VWL V	Bacteria	<i>Bacillus safensis</i>	3.746	UP000325032	18.284
FpP7	LKKLSA A FKKLVA	Hongo	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	13.806	UP000015241	52.044
CsP8	IGGRSVKWLKKL I VT A	Hongo	<i>Cochliobolus sativus</i>	12.174	UP000016934	53.267
MrP9	VPKVLG L LKKVFAKR	Hongo	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	17.976	UP000017559	72.088
MrP10	LKKFGKALFK P LI	Hongo	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	17.976	UP000017559	72.088

Tabla 2. Predicción de la actividad antimicrobiana de los péptidos encontrados en el análisis bioinformático con los algoritmos de inteligencia artificial disponibles en AMP Scanner Vr.2, CAMPR3, y AmpClass 1.0.

Péptido	AMP Scanner Vr.2	CAMPR3				AmpClass 1.0				
		Support Vector Machine (SVM)	Random Forest	Artificial Neural Network (ANN)	Discriminant Analysis	Regresión Logística	Red Neuronal	Árbol de Decisión	Bosque Aleatorio	XGBoost
BfP1	0,99	1,00	0,97*	AMP	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	1,00
OvP2	1,00	0,99	0,97*	AMP	1,00	0,97*	0,99	0,99	0,97*	1,00
AbP3	0,99	0,99	0,99	AMP	0,97*	0,96*	0,97*	0,98	0,97*	1,00
AmP4	1,00	0,96*	1,00	AMP	0,99	0,98	0,99	0,99	0,98	1,00
BsP5	1,00	0,98	0,98	AMP	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	1,00
BsP6	0,99	1,00	0,99	AMP	0,98	0,95*	0,98	0,99	0,99	1,00
FpP7	0,98	0,98	0,97*	AMP	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00
CsP8	1,00	0,99	0,99	AMP	0,99	0,95*	0,98	0,99	0,96*	1,00
MrP9	1,00	0,98	0,99	AMP	1,00	0,98	0,99	0,99	0,98	1,00
MrP10	1,00	0,97*	0,99	AMP	1,00	0,96*	0,99	0,99	0,99	1,00

* Valores por debajo del punto de corte (0,98) que representan de manera integral alto valor predictivo y en conjunto con los otros predictores estimados cumplen con las propiedades requeridas para considerarse como péptidos antimicrobianos.

Para predecir la bioseguridad de los péptidos, se utilizó HAPPENN para identificar posibles efectos hemolíticos, eliminando 85 péptidos. Luego, se aplicó HEMOPI-3, confirmando que los 233 péptidos restantes son considerados no hemolíticos. Se utilizaron otras herramientas para evaluar toxicidad y estabilidad. TOXINPRED, determinó que ninguno de los 233 péptidos tuvo una probabilidad significativa de ser tóxico, mientras que ProtParam reveló que 14 péptidos eran potencialmente inestables. Para evaluar la probabilidad de anclaje en membranas, se utilizó AMPHIPASEEK, identificando 85 péptidos con alta probabilidad de anclaje, los 134 que se descartaron tenían una capacidad media o baja de unirse a membranas. Además, se evaluó el potencial de alergenicidad con AllerTOP v.2, donde se descartaron 28 péptidos con esta característica.

Para mantener únicamente los péptidos con baja similitud a los ya reportados, se descartaron péptidos con similitud superior al 70% con péptidos antimicrobianos conocidos en APD3, resultando en la eliminación de 20

péptidos. Luego, los 37 restantes se evaluaron con DBAASP v3 para predecir su potencial antimicrobiano. Después de este análisis, solo se seleccionaron 10 péptidos con las características deseadas para ser considerados PAMs, que se pueden visualizar en las Tablas 1 y 2.

Los péptidos BsP5 y MrP9 tuvieron probabilidad de ser PAMs mayor o igual al 98% en todos los clasificadores de CAMPR3, AmpClass 1.0 y AMP Scanner Vr.2, mientras que los otros ocho tuvieron probabilidades de ser antimicrobianos mayores o iguales al 98% en la mayoría de los predictores. Los péptidos seleccionados se nombraron con las primeras letras del nombre científico del organismo de origen y se les asignó un número de referencia para una mejor organización (Tabla 1).

Evaluación de la capacidad hemolítica y de toxicidad de los péptidos seleccionados

Timmons y Hewage (2020) encontraron que la hidrofobicidad cuantificada parece ser crítica para la actividad hemolítica, y que generalmente las secuencias más hi-

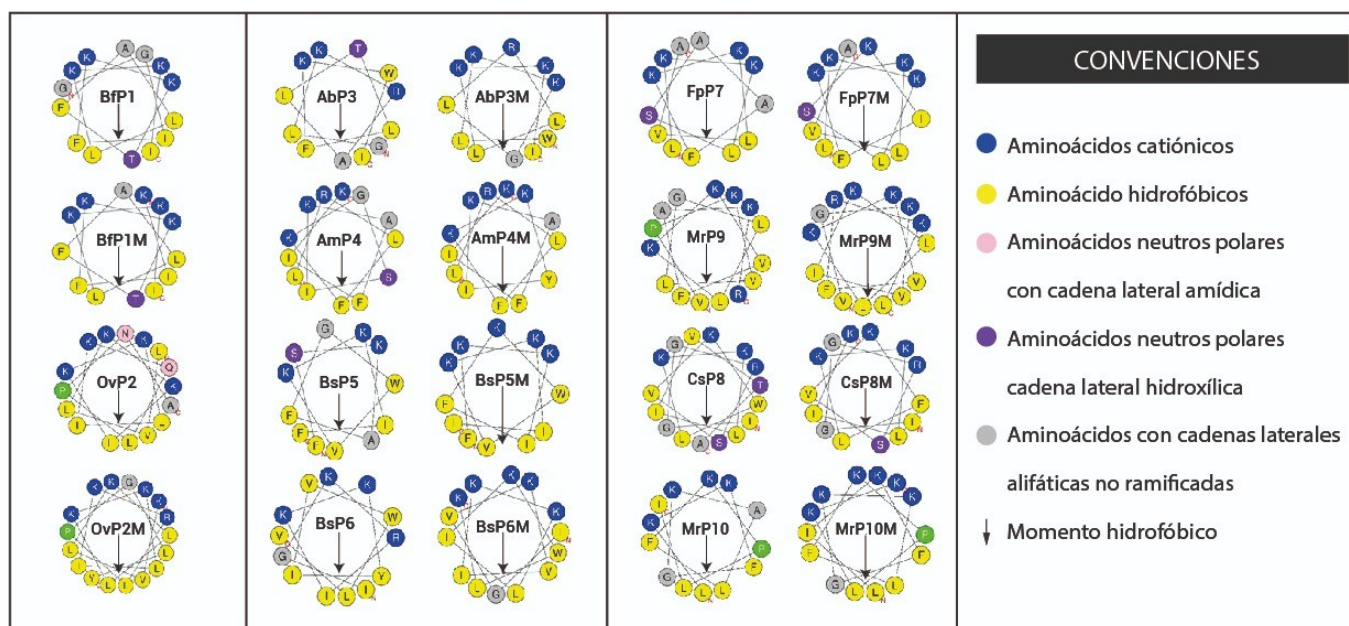


Figura 1. Rueda helicoidal de los péptidos originales y de los modificados obtenidas con HeliQuest, donde se aprecia la distribución de los aminoácidos en un círculo hipotético.

drofóbicas son más hemolíticas que las secuencias menos hidrofóbicas. Además, encontraron que debido a su composición en diferentes lugares del péptido son indicadores de tendencia hemolítica. Revisando estos criterios, se encontró que los 10 péptidos seleccionados en este estudio poseen en su estructura entre 50% y 60% de hidrofobicidad, y la porción hidrofílica con aminoácidos catiónicos como R y K, pero también con S, T y G, lo que probablemente ayude a que la predicción de hemolicidad sea baja.

En la evaluación de toxicidad se determinó que probabilidad de los péptidos de ser tóxicos fue nula. Este hallazgo coincide con estudios similares, como el de Khabbaz *et al.* (2021), quienes con un conjunto de datos desarrollaron un modelo de aprendizaje que extrae PAMs con baja toxicidad para aplicaciones clínicas y con Madrazo y Campos (2022), quienes utilizaron herramientas bioinformáticas para predecir péptidos antimicrobianos no tóxicos. Estos resultados destacan la importancia de evaluar la toxicidad de los péptidos como un obstáculo crítico para el uso clínico.

Índice de inestabilidad de los péptidos y anclaje en membranas

De los 10 péptidos seleccionados, la predicción del índice de inestabilidad más alta fue para BsP6 y MrP9 con valores de 24,21 y 26,93, respectivamente. El análisis estadístico de varias proteínas sugiere que su estabilidad está influenciada principalmente por su estructura prima-

ria, incluyendo la presencia de ciertos dipéptidos. Otros factores como la estructura secundaria, los puentes disulfuro y la unión a ligandos también afectan la estabilidad de las proteínas en el organismo (Gasteiger *et al.*, 2005). En cuanto al anclaje en membranas, todos los péptidos seleccionados y modificados tuvieron resultados admisibles.

Predicción *in silico* de la probabilidad de los péptidos como alérgenos

Algunos PAMs poseen propiedades alérgicas que no deben pasarse por alto, especialmente cuando se considera su posible uso médico (Guryanova y Ovchinnikova, 2022). Arora *et al.* (2020), investigaron 19 clases de proteínas pertenecientes a 11 familias de plantas con potencial alérgico utilizando herramientas bioinformáticas, incluyendo AllerTOP v.2, sus resultados indicaron que solo dos de ellas podrían tener efectos alérgicos. En este contexto, ninguno de los 10 péptidos seleccionados se consideró alérgico de acuerdo con AllerTOP v.2.

Modificaciones de los péptidos

La modificación de los 10 péptidos seleccionados se realizó teniendo en cuenta sus propiedades fisicoquímicas como carga, longitud, porcentaje de hidrofobicidad, índice de Boman, punto isoeléctrico y la rueda helicoidal que se puede visualizar y analizar en los programas TYPE-PEPTIDE y HeliQuest; además se tuvieron en cuenta los parámetros iniciales predichos.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos originales y de los modificados.

Péptido	Secuencia original y modificada	% de similitud (APD3)	Longitud	Carga	pI*	% hidrofobicidad	Índice de Boman
BfP1	GGIFKKT F ALLKKI	43.75%	14	4	11.3	50	-0.33
BfP1M	KIFKKT F ALLKKI	53.85%	13	5	11.4	53.85	0.22
OvP2	LVLK K LKKLIK Q LPNA	50%	16	5	11.4	50	0.28
OvP2M	KVLK L LKKLIK R LPGLY	52.94%	17	6	11.4	47.06	0.20
AbP3	GLK R ALT L FKWI	46.67%	12	3	12	58.33	0.07
AbP3M	WLK K GL R LLKKI	53.33%	12	5	12.1	50	0.77
AmP4	LRLFK G SIKAFIK	47.06%	13	4	12	53.85	0.51
AmP4M	LRLFK K YIKAFIK	43.75%	13	5	11.3	53.85	0.75
BsP5	FSK A FGWVKKIF	38.46%	13	5	12.1	53.85	0.92
BsP5M	FKK I FKVWVKII	50%	12	5	11.4	58.33	0.06
BsP6	IGK R IKKYIVWL V	42.86%	13	4	11.2	53.85	0.05
BsP6M	IGV K VIKKLIKWL K	47.06%	14	5	11.4	57.14	-0.59
FpP7	LKKLS A AFKKLVA	50%	13	4	11.3	61.54	-0.12
FpP7M	LKKLS K IFKKLVA	53.85%	13	5	11.4	53.85	0.2
CsP8	IGGRSVK W LKKLIV T A	38.1%	16	4	12	50	0.24
CsP8M	IGGRSVK F LKKLIK	47.06%	14	5	12.1	42.86	0.85
MrP9	V P KVLGLLKKV F AK R	52.94%	15	5	12.1	53.33	0.30
MrP9M	V G KVILLKKV F RKL	50%	15	6	12.1	53.33	0.46
MrP10	L K KFGK A LFKPL I	46.15%	13	4	11.3	53.85	-0.48
MrP10M	L I KFGK L FKPL K K	53.33%	14	6	11.5	42.86	0.48

*pI= Punto isoeléctrico

Como primer paso, se visualizaron y analizaron las ruedas helicoidales de cada péptido con HeliQuest (Figura 1). Cada aminoácido es representado por un círculo de color, lo cual nos permite apreciar la distribución catiónica e hidrofóbica en las caras opuestas del círculo, en tanto mejor distribuidos se encuentren en cada una de las caras de la hélice, mejor será su anfipaticidad. En este primer análisis se realizó un mapa que conduce a la primera apreciación de los péptidos, identificando los posibles aminoácidos que podrían ser sustituidos, intercambiados, adicionados o eliminados con el fin de generar un nuevo péptido con una correcta formación de las dos caras del péptido (Figura 1). Una de las propiedades clave relacionadas con la actividad biológica de cualquier secuencia es la anfipaticidad, descrita como la distribución topográfica de los residuos polares e hidrofóbicos, lo que resulta en una separación espacial más o menos marcada en la estructura de los PAMs activos. En una conformación helicoidal, los residuos polares/cargados e hidrofóbicos se agrupan en lados opuestos, a través de un cilindro hipotético, alrededor del cual se enrolla la hélice (Rončević *et al.*, 2019).

También se empleó TYPE-PEPTIDE para analizar la distribución de aminoácidos en los péptidos, permitiendo ajustes en su configuración. La herramienta

ofrece visualización 2D y muestra los cambios en los parámetros fisicoquímicos de los péptidos en tiempo real. Se aseguró que las modificaciones realizadas no afectaran negativamente las propiedades del péptido original, como se muestra en la Tabla 3 y se relacionan todas las modificaciones (letras en color rojo) que se realizaron a cada péptido.

El objetivo final del diseño de PAMs es optimizar la selectividad, la eficacia, la estabilidad, la formulación y la administración de los péptidos con el objetivo de mejorar su actividad farmacológica (Wang, 2010). En estudios previos, Hincapié *et al.* (2018), utilizaron herramientas bioinformáticas y algoritmos de inteligencia artificial de CAMPR3 para identificar y mejorar péptidos antimicrobianos a partir del análisis de proteínas, donde encontraron que 2 de 12 PAMs diseñados mostraron concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) entre 3 y 20 μ M contra al menos 3 especies de bacterias. Duque-Salazar *et al.* (2020), validaron *in vitro* una estrategia computacional similar y obtuvieron 11 péptidos con probabilidad del 97% para ser considerados como antimicrobianos. En ensayos *in vitro* se encontró que 10 de los 11 PAMs diseñados tuvieron CIMs entre 4 y 64 μ M contra al menos una especie bacteriana. Finalmente, Monsalve *et al.* (2024), analizaron proteo-

Tabla 4. Determinación de la probabilidad como antimicrobianos de los péptidos modificados en diferentes plataformas de inteligencia artificial.

Péptido	AMP Scanner Vr2	CAMPR3				AmpClass 1.0				
		Support Vector Machine (SVM)	Random Forest	Artificial Neural Network (ANN)	Discriminant Analysis	Regresión Logística	Red Neuronal (%)	Árbol de Decisión	Bosque Aleatorio	XgBoost
BfP1M	0,97*	0,98*	0,99**	AMP	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99**	1,00
OvP2M	1,00	0,96*	0,99**	AMP	1,00	0,99**	0,99	0,99	0,99**	1,00
AbP3M	1,00**	1,00**	0,99	AMP	0,99**	0,99*	0,99**	0,99	1,00**	1,00
AmP4M	0,99*	0,99**	0,99*	AMP	1,00**	0,99*	0,99	0,99	0,99**	1,00
BsP5M	1,00	1,00**	0,97*	AMP	1,00**	0,99**	0,99	0,99	1,00**	1,00
BsP6M	1,00**	1,00	0,99	AMP	1,00**	0,99**	0,99**	0,99	0,99	1,00
FpP7M	1,00**	0,96*	1,00**	AMP	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00
CsP8M	1,00	0,99	0,99	AMP	1,00	0,99**	0,99**	0,99	0,98**	1,00
MrP9M	1,00	0,98	0,97*	AMP	1,00	0,99**	0,99	0,99	0,99	1,00
MrP10M	1,00	1,00**	0,99	AMP	1,00	0,99**	0,99	0,99	0,98*	1,00

*Valores inferiores al péptido original. ** valores superiores al péptido original. M= modificado

mas de ocho especies, identificando alrededor de 500,000 péptidos con PepMultiFinder 1.0, que fueron evaluados con CAMPR3, AMP Scanner Vr.2 y AmpClass 1.0, con probabilidad $\geq 97\%$; y se encontró que 10 de los 18 PAMs tuvieron CIMs entre 0.89 y 15 μM en al menos tres especies bacterianas. En resumen, estas estrategias computacionales demostraron ser rápidas y efectivas para diseñar nuevos PAMs, logrando obtener moléculas activas y potentes sin un uso significativo de recursos y de tiempo.

Como resultado de las modificaciones en la secuencia de los PAMs de este estudio (Tabla 3) se mantuvieron las propiedades fisicoquímicas en los rangos propuestos, teniendo una distribución hidrofóbica más definida, mejorando su anfipaticidad y manteniendo, en su mayoría, la integridad del péptido original en al menos 50%. Para llegar a estos resultados se realizaron cambios que ayudaron a equilibrar las propiedades anfipáticas del péptido y una estructura helicoidal definida, que se ve favorecida por la presencia de residuos estabilizadores de hélice distribuidos a lo largo de la secuencia como L, A y K; además, el agrupamiento de residuos hidrofóbicos en

un lado de la hélice, favorece la inserción en la bicapa de la membrana objetivo (Rončević *et al.*, 2019).

Las modificaciones realizadas en la secuencia de los péptidos mantienen una predicción de actividad antimicrobiana en la mayoría de los predictores (Tabla 4). Destacan particularmente AbP3M, AmP4M, BsP6M, CsP8M y MrP10M, que en algunos algoritmos lograron superar los valores de predicción de 0.98 reportados para el péptido original, siendo este valor predictivo óptimo en nuestro estudio. Otros péptidos también mostraron valores similares, aunque en algunos casos se observó una ligera disminución en este umbral óptimo de 0.98, sin embargo, no por debajo de 0.95, un valor aún considerado aceptable. Este fenómeno se evidenció en los péptidos BfP1M, OvP2M, BsP5M, FpP7M y MrP9M. A pesar de ello, estos péptidos continúan siendo fuertes candidatos para ser considerados como PAMs.

Al realizar el análisis de predicción de la capacidad hemolítica, toxicidad y alergenidad de los péptidos modificados se encontró que están en el rango establecido para considerarlos como no hemolíticos, no tóxicos y

Tabla 5. Predicción de la actividad antimicrobiana de los péptidos originales y modificados con la plataforma DBAASP v3, utilizando el método Machine Learning.

Péptido	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
	Valor Predictivo	Clase	Valor Predictivo	Clase	Valor Predictivo	Clase	Valor Predictivo	Clase
BfP1	0.58	Activo	0.56	No Ac	0,68	Activo	0.59	Activo
BfP1M	0.78	Activo	0.7	Activo	0.83	Activo	0.64	Activo
OvP2	0.66	Activo	0.91	Activo	0.5	Activo	0.63	No Ac
OvP2M	0.87	Activo	0.9	Activo	0.63	Activo	0.56	Activo
AbP3	0.64	Activo	0.58	Activo	0.85	Activo	0.75	Activo
AbP3M	0.77	Activo	0.78	Activo	0.87	Activo	0.52	Activo
AmP4	0.72	Activo	0.74	Activo	0.57	Activo	0.63	Activo
AmP4M	0.65	Activo	0.72	Activo	0.54	Activo	0.6	Activo
BsP5	0.67	Activo	0.78	Activo	0.62	Activo	0.73	Activo
BsP5M	0.81	Activo	0.96	Activo	0.78	Activo	0.62	Activo
BsP6	0.57	Activo	0.55	Activo	0.77	Activo	0.58	Activo
BsP6M	0.53	Activo	0.81	Activo	0.55	Activo	0.67	No Ac
FpP7	0,69	Activo	0,63	Activo	0.76	Activo	0.5	Activo
FpP7M	0.79	Activo	0.93	Activo	0.85	Activo	0.53	No Ac
CsP8	0.59	Activo	0.55	Activo	0.61	Activo	0.59	Activo
CsP8M	0,61	Activo	0.81	Activo	0.63	Activo	0.51	No Ac
MrP9	0.59	Activo	0.74	Activo	0.52	Activo	0.55	Activo
MrP9M	0.61	Activo	0.9	Activo	0.67	Activo	0.58	No Ac
MrP10	0.5	Activo	0.51	Activo	0.61	Activo	0.51	Activo
MrP10M	0.58	Activo	0.83	Activo	0.53	Activo	0.65	No Ac

Si el resultado de la prueba es "activo", significa que el microorganismo en cuestión se inhibirá con un MIC < 25 µg/ml y por el contrario si el resultado es "no activo" (No Ac) implica que los microorganismos probablemente no sean sensibles al efecto inhibitorio del péptido a 100 µg/ml.

tampoco alergénicos, solamente el péptido AmP4M tuvo un valor levemente superior a 0.3 en la plataforma HAPPENN, pero es un valor permisible para que no sea considerado como hemolítico. Los resultados del índice de inestabilidad concuerdan con los péptidos originales, ya que todos los péptidos fueron clasificados como estables. Después de obtener los resultados óptimos para los péptidos modificados se observaron nuevamente en

la plataforma HeliQuest, donde se comprobó que la representación helicoidal de cada péptido mejora de manera significativa la separación de las caras hidrofílicas e hidrofóbicas (Figura 1).

Predicción de la actividad antimicrobiana específica

Los péptidos se evaluaron en la plataforma DBAASP v3 para predecir el potencial antimicrobiano contra espe-

cies como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Tabla 5).

Si el resultado de la prueba es “activo”, significa que el microorganismo en cuestión se inhibirá con un MIC < 25 µg/ml y por el contrario si el resultado es “no activo” (No Ac) implica que los microorganismos probablemente no sean sensibles al efecto inhibitorio del péptido a 100 µg/ml.

DBAASP v3 en una de sus metodologías utiliza el método Machine Learning descrito por Vishnepolsky et al. (2022), que está basado en propiedades computarizadas para secuencias de PAMs y características de genomas, calculadas para una especie microbiana objetivo entre las cuales están *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* y *S. aureus* ATCC 25923 con aplicación de algoritmos de aprendizaje automático para identificar los PAMs. Con relación a estos resultados Kim et al., (2020) utilizaron diferentes herramientas de inteligencia artificial para desarrollar el péptido PA2-GNU7 con alta especificidad para *P. aeruginosa*, actuando sobre la porina OprF para eliminar selectivamente las células, mientras que Maturana et al., (2020) estudiaron el péptido P6.2, que mostró amplia actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*. Al-Khdhairawi et al., (2023) utilizaron diversos algoritmos de inteligencia artificial, entre los cuales se encuentra DBAASP v3, para predecir 18 péptidos activos contra *K. pneumoniae*, de los cuales ocho fueron considerados no tóxicos ni hemolíticos.

El valor predictivo de la actividad antimicrobiana evaluada mediante Machine Learning (Tabla 5) se basa en la precisión de las predicciones en comparación con datos experimentales. Se utiliza una escala del 0 al 1, donde valores más cercanos a 1 indican mayor precisión. Los resultados que se muestran tanto para los 10 péptidos originales, como para los 10 péptidos modificados tienen un valor predictivo igual o superior a 0.5, lo que indica una alta precisión en la predicción de la actividad antimicrobiana. En los péptidos originales se encontró que BfP1 y OvP2 no tenían efecto sobre las cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923 respectivamente, después de las modificaciones tuvo un efecto contrario, por lo cual ahora tienen una mayor probabilidad de ser activos sobre todas las cepas bacterianas en estudio, mientras que hubo un efecto opuesto en los péptidos modificados BsP6M, FpP7M, CsP8M, MrP9M y MrP10M que no son activos frente a la cepa *S. aureus* ATCC 25923, pero los péptidos originales si lo fueron, no obstante siguen siendo péptidos con un alto potencial antimicrobiano (Tabla 5).

Estructura tridimensional de los péptidos originales y modificados

Se utilizó el programa AlphaFold2 junto con ColabFold para determinar la estructura tridimensional de los péptidos. Esta combinación, acelerada por MMseqs2, permite predecir cerca de 1000 estructuras al día. Se encontró que tanto los péptidos originales como los modificados adoptan una estructura de alfa-hélice, importante para las interacciones con las membranas de los patógenos, por lo tanto, se validan las modificaciones realizadas para mejorar la separación de los aminoácidos polares cargados y los hidrofóbicos. La distribución de aminoácidos influye en la estabilidad de la hélice y en la interacción péptido-membrana. Se ha determinado que la conformación de hélice anfipática es crucial para la interacción y la selectividad de los péptidos, y que las modificaciones pueden afectar este equilibrio delicado (Ciurac et al., 2019).

CONCLUSIONES

La metodología utilizada para identificar PAMs mediante herramientas *in silico* se ajustó para su desarrollo, aplicando límites rigurosos para aumentar la probabilidad de éxito. La selección de herramientas bioinformáticas avanzadas permitió buscar, diseñar y perfeccionar PAMs cortos, de manera eficiente, obteniendo 10 péptidos con probabilidad igual o superior a 98 % de ser clasificados como antimicrobianos y además 5 péptidos modificados con alta probabilidad de tener actividad antibacteriana con las cepas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* y *S. aureus* ATCC 25923. Las estrategias computacionales y de inteligencia artificial involucradas ofrecen la posibilidad de seleccionar, modificar y predecir PAMs de manera ágil, rentable y confiable, potenciando su aplicabilidad en diversas áreas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto de investigación Hermes 55740 de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Khdhairawi, A., Sanuri, D., Akbar, R., Lam, S. D., Sugumar, S., Ibrahim, N., Chieng, S., & Sairi, F. (2023). Machine learning and molecular simulation ascertain antimicrobial peptide against *Klebsiella pneumoniae* from public database. *Computational Biology and Chemistry*, 102, 107800. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem>.

- Arora, R., Kumar, A., Singh, I. K., & Singh, A. (2020). Pathogenesis related proteins: A defensin for plants but an allergen for humans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 659–672. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.223>.
- Branch, J.W., Orduz, S., Ceballos, A.M., Mera, C.A., Orrego, A. 2022a. PepMultiFinder 2.0. Un algoritmo para buscar péptidos bioactivos en proteomas o listas de secuencias de proteínas. Dirección Nacional de Derechos de Autor. Ministerio del Interior. Registro 13-91-434. Septiembre 12, 2022.
- Branch, J. W., Orduz, S., Ceballos, A. M., Mera, C. A., Orrego, A., Cardona, P., & Muñoz, J. (2022). AmpClass 1.0: Una herramienta informática para la predicción de la actividad antimicrobiana de péptidos [Software]. Dirección Nacional de Derechos de Autor, Ministerio del Interior.
- Browne, A. J., Chipeta, M. G., Haines-Woodhouse, G., Kumaran, E. P., Hamadani, B. H. K., Zarea, S., ... & Dolecek, C. (2021). Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *The Lancet Planetary Health*, 5(12), e893–e904. [https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(21\)00280-1](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(21)00280-1)
- Chaudhary, K., Kumar, R., Singh, S., Tuknait, A., Gautam, A., Mathur, D., Anand, P., Varshney, G., & Raghava, G. (2016). A web server and mobile app for computing hemolytic potency of peptides. *Scientific Reports*, 6, 22843. <https://doi.org/10.1038/srep22843>.
- Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., & Lu, J. R. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 537, 163–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>.
- Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D. R., & Doytchinova, I. (2014). AllerTOP v.2 - A server for in silico prediction of allergens. *Journal of Molecular Modeling*, 20(6), 2278. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>.
- Duque-Salazar, G., Mendez-Otalvaro, E., Ceballos-Arroyo, A. M., & Orduz, S. (2020). Design of antimicrobial and cytolytic peptides by computational analysis of bacterial, algal, and invertebrate proteomes. *Amino Acids*, 52(10), 1403–1412. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02900-w>.
- Ebrahimi, F., Dehghani, M., & Makkizadeh, F. (2023). Analysis of Persian bioinformatics research with topic modeling. *BioMed Research International*, 2023, 3728131. <https://doi.org/10.1155/2023/3728131>.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein Analysis Tools on the ExPASy Server* 571–571. From: *The Proteomics Protocols Handbook Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. <http://www.expasy.org/tools/>
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*, 24(18), 2101–2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>.
- Gehring, R., Mochel, J. P., & Schmerold, I. (2023). Understanding the background and clinical significance of the WHO, WOH, and EMA classifications of antimicrobials to mitigate antimicrobial resistance. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1153048. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1153048>.
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., & Raghava, G.P.S. (2013). *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS ONE*, 8(9), e73957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>.
- Guryanova, S. V., & Ovchinnikova, T.V. (2022). Immunomodulatory and allergenic properties of antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2499. <https://doi.org/10.3390/ijms23052499>.
- Hincapié, O., Giraldo, P., & Orduz, S. (2018). *In silico* design of polycationic antimicrobial peptides active against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111, 1871–1882. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1080-2>.
- Khabbaz, H., Karimi-Jafari, M. H., Saboury, A. A., & BabaAli, B. (2021). Prediction of antimicrobial peptides toxicity based on their physico-chemical properties using machine learning techniques. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04468-y>.
- Kim, H., Jang, J. H., Kim, S. C., & Cho, J. H. (2020). Development of a novel hybrid antimicrobial peptide for targeted killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 185, 111814. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech>.
- Madrazo, A. L., & Campos, M. R. S. (2022). *In silico* prediction of peptide variants from chia (*S. hispanica* L.) with antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potential. *Computational Biology and Chemistry*, 98, 107695. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2022.107695>.
- Makhlynets, O., & Caputo, G. (2021). Characteristics and therapeutic applications of antimicrobial peptides. *Biophysics Reviews*, 2(1), 011301. <https://doi.org/10.1063/5.0035731>.
- Maturana, P., Gonçalves, S., Martinez, M., Espeche, J. C., Santos, N. C., Semorile, L., Maffia, P. C., & Hollmann, A. (2020). Interactions of “de novo” designed peptides with bacterial membranes: Implications in the antimicrobial activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1862(11), 183443. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem>.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Met-*

- hods*, 19(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>.
- Monsalve, D., Mesa, A., Mira, L. M., Mera, C., Orduz, S., & Branch-Bedoya, J. W. (2024). Antimicrobial peptides designed by computational analysis of proteomes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 117(1), 55. <https://doi.org/10.1007/s10482-024-01946-0>.
- Organización Mundial de la Salud. (2021). Resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- Patel, H., Bhatt, D., Shakhreliya, S., Lam, N. L., Maurya, R., & Singh, V. (2021). An introduction and applications of bioinformatics. *Advances in Bioinformatics*, 1-14.
- PepMultiFinder 2.0 [Internet]. Available from: <https://ciencias.medellin.unal.edu.co/gruposdeinvestigacion/prospeccionydisenobiomoleculas/herramientas/pepmultitools.html>.
- Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., & Weind, G. (2018). Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 281. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00281>.
- Pirtskhalava, M., Amstrong, A.A., Grigolava, M., Chubidze, M., Alimbarashvili, E., Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D.E., & Tartakovsky, M. (2021). DBAASP v3: Database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D288–D297. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>.
- Radusky, L. (2017). Herramientas bioinformáticas para el análisis estructural de proteínas a escala genómica. [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires]
- Ronèevia, T., Puizina, J., & Tossi, A. (2019). Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era? In *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5713. <https://doi.org/10.3390/ijms20225713>.
- Salem, M., Keshavarzi Arshadi, A., & Yuan, J.S. (2022). AMPDeep: hemolytic activity prediction of antimicrobial peptides using transfer learning. *BMC Bioinformatics*, 23(1), 1-17. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1615895/v1>.
- Sapay N, Guermeur Y, & Deléage G (2006). Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-255>.
- Tamayo S, Castañeda CA, Orduz S. (2018). Type-Peptide 1.0. Herramientas computacionales pedagógicas para el estudio, diseño y optimización de péptidos antimicrobianos basada en sus propiedades físico-químicas. Dirección Nacional de Derechos de Autor. Ministerio del Interior. Registro 13-70-274. Diciembre 5, 2018
- Timmons, P., & Hewage, C. (2020). HAPPENN is a novel tool for hemolytic activity prediction for therapeutic peptides which employs neural networks. *Scientific Reports*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67701-3>
- UniProtKB [Internet]. Available from: <https://www.uniprot.org/>
- Veltri, D., Kamath, U., & Shehu, A. (2018). Deep learning improves antimicrobial peptide recognition. *Bioinformatics*, 34(16), 2740–2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty179>
- Vishnepolsky, B., Grigolava, M., Managadze, G., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D.E., Tartakovsky, M., & Pirtskhalava, M. (2022). Comparative analysis of machine learning algorithms on the microbial strain-specific AMP prediction. *Briefings in Bioinformatics*, 23(4), bbac233. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac233>
- Waghu, F. H., & Idicula-Thomas, S. (2020). Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: Applications and beyond. *Protein Science*, 29(1), 36–42. <https://doi.org/10.1002/pro.3714>
- Wang, G. S. (2010). Structural studies of antimicrobial peptides provide insight into their mechanisms of action. *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies*, 141-168. <https://doi.org/10.1079/9781845936570.0141>
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Weeks, R., Algburi, A., & Chikindas, M. (2021). Antimicrobial peptides and peptidomimetics for the control of antimicrobial resistance. *Sustainable Agriculture Reviews 49: Mitigation of Antimicrobial Resistance Vol 2. Natural and Synthetic Approaches*, 205-249. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58259-3_7
- Xiao, H., Shao, F., Wu, M., Ren, W., Xiong, X., Tan, B., & Yin, Y. (2015). The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0018-z>.

Evaluación del efecto inhibitorio de aceites esenciales sobre *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., hongos autóctonos del cultivo de cacao

Evaluation of the inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., native fungi of cocoa cultivation

Raquel A. Villamizar G.*, Oscar O. Ortiz R.**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.116849

RESUMEN

El cultivo de cacao ha ido *in crecento* durante los últimos años, posicionando a Colombia en el concurso internacional Cacao of Excellence “como el mejor del mundo” en 2024. No obstante, en la cadena productiva del cultivo, el país aún tiene varios desafíos, dentro de los que se destaca la proliferación de hongos patógenos que pueden desarrollarse en las diferentes etapas de su producción. En la presente investigación se evaluó el efecto inhibitorio de 4 aceites esenciales sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., hongos patógenos nativos aislados de cultivos de cacao, en el departamento Norte de Santander, Colombia. Los análisis *in vitro* se hicieron empleando la técnica de difusión en medio PDA a través de unidades experimentales conformadas por el agente patógeno, los cuatro aceites esenciales, tres concentraciones por aceite, con tres réplicas, para un total de 54 unidades experimentales incluidos los controles, mientras que los ensayos *in vivo*, fueron realizados directamente sobre la corteza de mazorca de cacao, siguiendo el mismo diseño. El porcentaje de inhibición (% PICR) se calculó a partir del crecimiento micelial y usando métodos estadísticos basados en las características y distribución de los datos se determinó la dosis letal 90 (DL90) para cada aceite por medio de un modelo de regresión dosis respuesta ajustado a partir de un modelo no lineal de regresión. Los resultados indican que los aceites de anís, eucalipto y pronto alivio, inhibieron efectivamente el crecimiento de los dos patógenos en concentraciones que oscilaron entre 20 $\mu\text{L/mL}$ y 48 $\mu\text{L/mL}$, con lo cual podrían ser empleados como una alternativa eco-amigable que requiere escalarse a fase de campo, para evaluar su efectividad *in situ*.

Palabras claves: Agentes, biocontroladores, hongos patógenos, *Theobroma cacao*.

ABSTRACT

Cocoa cultivation has been growing in recent years, positioning Colombia in the international competition Cacao of Excellence “as the best in the world” in 2024. However, the country still faces several challenges in the production chain of the crop, including the proliferation of pathogenic fungi that can develop in the different stages of production. This research evaluated the inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., native pathogenic fungi isolated from cocoa crops in the department of Norte de Santander, Colombia. The *in vitro* analyses were performed using the technique of diffusion in PDA medium through experimental units con-

* Profesora Titular, Directora Grupo de Investigación en Salud Pública y Epidemiología, Departamento de Medicina, Facultad de Salud, Universidad de Pamplona, Colombia. raqvillamizar@unipamplona.edu.co. <https://orcid.org/0000-0003-1168-2353>

** Profesor Titular, Director Grupo de Investigación Nanotecnología y Gestión Sostenible (NANOSOST), Departamento de Ingeniería Industrial, Facultad de Ingenierías y Arquitectura, Universidad de Pamplona, Colombia. oscarortiz@unipamplona.edu.co, <https://orcid.org/0000-0003-2250-9804>

sisting of the pathogen, the four essential oils, three concentrations per oil, with three replicates for a total of 54 experimental units including controls, while the in vivo assays were performed directly on the cocoa pod rind, following the same design. The percentage inhibition (% PICR) was calculated from mycelial growth and using statistical methods based on the characteristics and distribution of the data, the lethal dose 90 (LD90) was determined for each oil by means of a dose-response regression model fitted from a non-linear regression model. The results indicate that anise, eucalyptus and soon relief oils effectively inhibited the growth of the two pathogens at concentrations ranging from 20 μ L/mL to 48 μ L/mL, which could be used as an eco-friendly alternative that needs to be scaled up to the field phase to evaluate its effectiveness *in situ*.

Keywords: Agents, biocontrollers, pathogenic fungi, *Theobroma cacao*.

Recibido: noviembre 10 de 2024

Aprobado: marzo 10 de 2025

INTRODUCCIÓN

El mayor productor de *Theobroma cacao* a nivel mundial es el continente africano con un 77,4%, seguido del continente americano con un 17,8% y por último Asia y Oceanía con un 4,8% (ICCO, 2022). En Colombia, el cultivo de cacao ha ido *in crecento* durante los últimos años, pasando de 59.740 toneladas (t) en 2019 a 63.416 Tn en 2022, otorgándole el décimo puesto a nivel internacional. Cabe resaltar que en febrero del 2024, la muestra de la Asociación Agrogumal ubicada en el departamento del Meta, obtuvo la mejor puntuación en el concurso internacional Cacao of Excellence, en Ámsterdam, posicionando el cacao colombiano **“como el mejor del mundo”** (Sanchez, F.V., 2023).

No obstante, en la cadena productiva del cacao existen aún muchos desafíos. Uno de ellos es la susceptibilidad de varios materiales biológicos distribuidos y sembrados en los diferentes departamentos (30 de los 32 que hay en el país) a una gran diversidad de patógenos. Este aspecto se ve favorecido por prácticas agroecológicas inadecuadas, pero sin duda se verá aumentado en los próximos años por los efectos negativos producto del cambio climático en regiones tropicales, como en la que se encuentra ubicada Colombia. Científicos predicen que la concentración de CO₂ para finales de siglo llegará a niveles entre 490 y 1370 ppm, lo cual producirá cambios en la temperatura global (entre 1.4 a 4.8 °C) y en los patrones de precipitaciones (Lahive *et al.*, 2019), favoreciendo la expansión de enfermedades y el incremento en la resistencia de los patógenos.

Los hongos, son microorganismos, cuyo crecimiento se ve favorecido por la elevada humedad relativa y vientos, que facilitan la producción y diseminación de sus estructuras reproductivas (esporas). Estos pueden desarrollarse en las diferentes etapas de su producción, que incluyen desde el establecimiento del cultivo, la cosecha, la fermentación, el secado, el almacenamiento, hasta la obtención del producto final. Especies del género *Aspergillus*

spp. y *Fusarium spp.* han sido reportadas por formar parte de la microbiota endofítica y epifítica del cultivo de cacao, pero también se han encontrado durante la fermentación y el secado en semilla. En el caso de *Aspergillus spp.* incluso se ha encontrado en almacenamiento y en el producto final (Delgado Ospina, *et al.*, 2021).

Una de las principales preocupaciones a nivel de salud pública sobre la presencia de mohos filamentosos en las diferentes etapas de producción de cacao y especialmente en el producto final, es su potencial micotoxigénico. Dentro de las micotoxinas más frecuentemente encontradas en cultivos de cacao se ha reportado la Ocratoxina A (OTA), aflatoxinas (AFs) y recientemente la citrinina (CIT) la cual es nefrotóxica (Delgado Ospina, *et al.*, 2021). La literatura indica que el chocolate contribuye con cerca de un 6% del total de exposición a Ocratoxina A (OTA) en la dieta alimentaria, con lo cual la comisión del Codex Alimentarios del 2013 ha recomendado reducir al máximo al presencia de infecciones por hongos en los cultivos de cacao (Codex Alimentarius, 2013).

La contaminación por esporas fúngicas ocurre principalmente durante el proceso de abertura de las mazorcas (cacotas), lo cual justifica la necesidad de encontrar métodos para eliminar y/o reducir la presencia de estos patógenos en el fruto antes de ser beneficiado, a fin de evitar que estos hongos y/o sus productos metabólicos, puedan potencialmente llegar al consumidor a través del producto transformado en chocolate y/o sus derivados.

A través de este estudio, se aborda el uso de aceites esenciales (AE) como agentes inhibidores eficientes y eco-amigables, para el control del crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc., hongos patógenos autóctonos, aislados del cultivo de cacao. Los AE, se definen como mezclas complejas de bajo peso molecular, volátiles y con propiedades aromáticas (Parrish *et al.*, 2020). Su actividad antifúngica se atribuye a la relación de terpenos/terpenoides, los cuales debido a su naturaleza altamente lipofílica y su bajo peso molecular,

son capaces de causar disrupción a nivel de membrana celular, produciendo la muerte o inhibiendo la esporulación y germinación de las esporas fúngicas (Nazzaro *et al.*, 2017). El uso de AE para inhibir mohos filamentosos procedentes de diferentes cultivos ha sido reportado a nivel *in vitro* (Raveau *et al.*, 2020) incluyendo especies de *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. productoras de micotoxinas (Xiang *et al.*, 2020). No obstante, para nuestro conocimiento, esta es la primera investigación que busca evaluar el efecto inhibitorio de 4 tipos de aceites esenciales diferentes a saber; *Illicium verum*, *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis cineoliferum* y *Lippia alba carvoniferum*, sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani*, hongos patógenos autóctonos, aislados a partir de cultivos de cacao en fase de cosecha, en el departamento de Norte de Santander, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los hongos patógenos. *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc. fueron provistos por el Laboratorio de Nanotecnología y Gestión Sostenible de la Universidad de Pamplona, Norte de Santander, Colombia, quienes reportaron su aislamiento e identificación molecular (Villamizar *et al.*, 2016) a partir de mazorcas de cacao en fase de cosecha, provenientes de diferentes fincas cacaoteras del departamento Norte de Santander, las cuales tienen una media de 1 ha sembrada y un rendimiento promedio de 2000 kg/ha/año en condiciones óptimas de manejo de cultivo; esto quiere decir manejo agroclimático y aplicación profiláctica de control químico Ridomil (mancozeb+metalaxyl) y oxicloruro de cobre siguiendo las instrucciones del fabricante que usualmente es de 1 kg/ha. Las cepas de los patógenos se preservaron como cultivo monospórico en medio de cultivo PDA hasta su uso.

Obtención de aceites esenciales. Los aceites esenciales utilizados en esta investigación fueron adquiridos a través de la empresa Aromatma <https://aromatma.com/>, ubicada en la ciudad de Bogotá, Colombia. En la tabla 1 se indica el nombre, la parte de la planta de donde se obtuvo así como el proceso de obtención.

Determinación *in vitro* de la actividad antifúngica de los aceites esenciales frente a *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

Se empleó la técnica de difusión en agar reportado por da Silva Bomfim y colaboradores con algunas modificaciones (da Silva Bomfim *et al.*, 2015). Las soluciones oleosas originales y concentradas, fueron diluidas empleando una solución estéril de Tween 80 al 0.1 % (Sigma Aldrich) y fueron adicionadas al agar patata dextrosa (PDA-Oxoid) hasta producir concentraciones finales así: AE01 (30 µL/mL, 25 µL/mL, 20 µL/mL); AE02 (50 µL/mL, 45 µL/mL, 40 µL/mL); AE03 (35 µL/mL, 30 µL/mL, 25 µL/mL), AE04 (25 µL/mL, 20 µL/mL, 15 µL/mL). Las concentraciones empleadas, son el producto de investigaciones preliminares propias no publicadas. El agar PDA modificado con las diferentes concentraciones de aceites y solidificado, fue inoculado con un trozo de 7 mm de diámetro que contenía el crecimiento de un cultivo joven de 5-7 días de los respectivos patógenos (*A. flavus* y *F. solani* (Mart.) Sacc.). Como controles positivos se emplearon cajas de agar PDA sin modificar, a las cuales se les inoculó directamente los patógenos, mientras que como controles negativos se tomaron cajas de agar PDA modificados con los diferentes aceites a las cuales no se les realizó ningún inóculo. Los ensayos fueron incubados a 25°C/10 días. Los análisis *in vitro* se hicieron empleando la técnica de difusión en medio PDA a través de unidades experimentales conformados por dos agentes patógenos, cuatro aceites esenciales, tres concentraciones por aceite, con tres réplicas, para un total de 54 unidades experimentales incluidos los controles.

El efecto inhibitorio se determinó midiendo el crecimiento de cada patógeno a través de cuatro radios perpendiculares hasta alcanzar el extremo de la caja de Petri utilizando un caliper digital. Se calculó el porcentaje de inhibición en el día 10 de incubación, empleando la fórmula PICR (%) = ((RC - RT) / RC)100, donde RC es el radio del control (promedio de los 4) y RT el radio de los diferentes tratamientos, de acuerdo con lo descrito por Gómez-López, *et al.*, 2020. La actividad antifúngica de los aceites esenciales fue evaluado inicialmente *in vitro*, cuyo objetivo último fue determinar la dosis letal 90 (DL90).

Tabla 1. Aceites esenciales empleados en este estudio.

CÓDIGO	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE VULGAR	ORGANO DE LA PLANTA/MÉTODO DE EXTRACCIÓN
AE01	<i>Illicium verum</i>	Anís estrellado	Semilla, destilación por arrastre de vapor
AE02	<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	Hoja, destilación por arrastre de vapor
AE03	<i>Rosmarinus officinalis cineoliferum</i>	Romero	Sumidades floridas, destilación por arrastre de vapor
AE04	<i>Lippia alba carvoniferum</i>	Pronto alivio	Hoja, destilación por arrastre de vapor

Determinación *in vivo* de la actividad inhibitoria de los aceites esenciales frente a los diferentes fitopatógenos

Se realizó directamente sobre corteza de cacao. Para ello se utilizaron placas estériles de 24 pocillos con tapa TC (Cellstar, Sigma Aldrich, EE.UU.) en las cuales se colocaron piezas de 0.125 cm³ de corteza de cacao, respectivamente, previamente esterilizados mediante UV durante toda una noche. Cada trozo de corteza fue impregnado con 100 µL de la DL90 obtenida a partir de los resultados del ensayo anterior. Seguidamente, los trozos de corteza de cacao fueron contaminados artificialmente con una solución de esporas de cada uno de los patógenos de estudio. Para obtener los inóculos se adaptó la metodología propuesta por Santos y colaboradores (Santos *et al.*, 2012). Se partió de cultivos jóvenes (5-7 días), los cuales fueron depositados en un tubo de ensayo conteniendo 10 mL de solución salina 0.85 % con ayuda de un asa micológica. El contenido se agitó vigorosamente aplicando vortex a máxima revolución durante 120 segundos. Seguidamente, se realizaron diluciones en base 10 y se procedió a realizar el conteo de esporas empleando la cámara de Neubauer, visualizando a través de microscopio óptico (Nikon Eclipse E100), objetivo 40 X. El número de esporas fue calculado mediante la fórmula mostrada abajo. El inóculo fue ajustado hasta obtener una concentración final entre 3*10⁶ esporas/mL de cada uno de los patógenos analizados

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = \frac{\text{Recuento obtenido}}{\text{Número de cuadros contados}} * \text{factor de dilución} * \text{factor de la cámara}$$

Las placas se incubaron a 25 °C durante 10 días. Como control positivo, se inoculó corteza de cacao con los respectivos patógenos. Como control negativo se empleó corteza de cacao sin inóculo (Villamizar *et al.*, 2016). Se evaluó visual y cualitativamente, la eficiencia de la DL90 de los respectivos aceites, para inhibir el crecimiento fúngico aparente. Los ensayos *in vivo*, fueron realizados directamente sobre corteza de cacao, empleando el mismo diseño que los ensayos de difusión en PDA.

Caracterización Microscópica

A través de microscopía óptica se visualizó el efecto de los aceites esenciales sobre la ultraestructura celular. Se empleó el método de microcultivo reportado por da Silva Bomfim y colaboradores con algunas modificaciones (da Silva Bomfim *et al.*, 2015). Se tomó una porción de agar PDA de 1.5x1.5 cm² el cual se depositó en el centro de un portaobjetos. Seguidamente, se le inoculó en el centro con ayuda de un asa micológica *A. flavus* procedente de un cultivo joven de no más de 5 días. El mismo procedimiento pero esta vez con agar PDA modificado con AE 04 a una concentración de 15 µL/mL

fue inoculado de igual forma a la descrita previamente con *A. flavus*, se llevó a incubación a 25 °C/10 días y seguidamente se realizó tinción simple con colorante azul de lactofenol y se observaron empleando Microscopio Nikon Eclipse E100, en objetivo de 100 X. El mismo procedimiento se realizó con *F. solani* (Mart.)Sacc.

Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico de datos

Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk a la variable de porcentaje de inhibición (% PICR) por cada patógeno. Se encontró que la distribución de los datos de *A. flavus* fue normal ($p = 0.067$) mientras que los de *F. solani* no fue normal ($p = 5.523e-06$), por lo que se analizaron con métodos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Para *A. flavus* se aplicó la prueba de ANOVA y la prueba post – Hoc de Tukey (análisis de rangos múltiples) para determinar las diferencias a la hora de inhibir el crecimiento de este patógeno entre los cuatro aceites. Para *F. solani*, se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. En cuanto a la determinación de la DL 90 se ajustó un modelo de regresión dosis-respuesta, utilizando un modelo log de 4 parámetros, donde el % PICR fue la respuesta y por tanto la variable dependiente, mientras que la concentración del aceite esencial fue la variable independiente. Se realizó un análisis de regresión múltiple para determinar la influencia del tipo de aceite y concentración en el % PICR. El modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R²). Los análisis estadísticos se realizaron en el Software R studio versión 3.4.1, y los análisis DL 90 se realizaron con el paquete DRC, paquete que se enfoca en el análisis dosis respuesta (Ritz & Streibig, 2005).

RESULTADOS

Los aceites esenciales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos al producir en ellos cambios en su cinética de crecimiento y sus características morfológicas macro y microscópicas. En la Figura 1, se muestran los resultados del ensayo de inhibición en placa realizados frente al patógeno *A. flavus*. Se puede observar que después de los 10 días de incubación, los aceites AE 01, AE 02, AE 4 lograron inhibir significativamente el crecimiento fúngico en todas las concentraciones ensayadas, comparado con el control. En el caso de AE 03, donde la inhibición no fue total, especialmente a bajas concentraciones (25-30 µL/mL), se logró evidenciar cambio en la pigmentación así como en la cinética de crecimiento característica de este hongo.

A nivel microscópico se observó como el aceite AE 04 se fija a las hifas e ingresan debilitando la formación de estructuras fúngicas como los septos (Figura 1), despla-

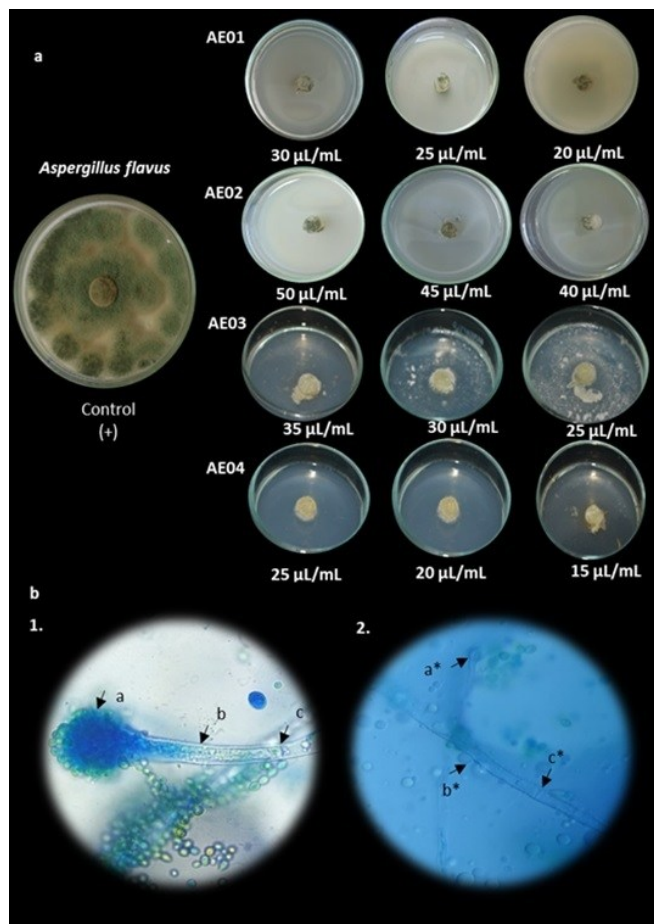


Figura 1. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales AE01, AE02, AE03 y AE04 sobre a). *A. flavus* en agar PDA. b). Efecto a nivel de la ultraestructura fúngica de *A. flavus* antes (1) y después (2) de ser expuesto a 15 $\mu\text{L/mL}$ de AE 04.

zando el contenido celular interior y ocasionando una escasa conidiación en *A. flavus* como puede apreciarse en el numeral b-2.

El porcentaje de inhibición (% PICR) para *A. flavus* se muestra en la Figura 2. Se determinó que el AE04 en promedio, fue el aceite que tuvo un mejor desempeño con un % PICR de 84.13 en las tres concentraciones ensayadas, con una desviación estándar (SD) de 2.32, siendo este directamente proporcional. Es decir a mayor concentración del aceite, mayor % PICR. El aceite AE03, presentó lo menores porcentajes de inhibición con un promedio de 77.43 % en las tres concentraciones ensayadas. Entre tanto, los aceites A01 y A02 presentaron resultados más similares con un % PICR de 83.37 y 83.40, respectivamente. A través del análisis de rangos múltiple (post -Hoc Tukey test), se confirmó que el AE 03 presentó diferencias significativas en la inhibi-

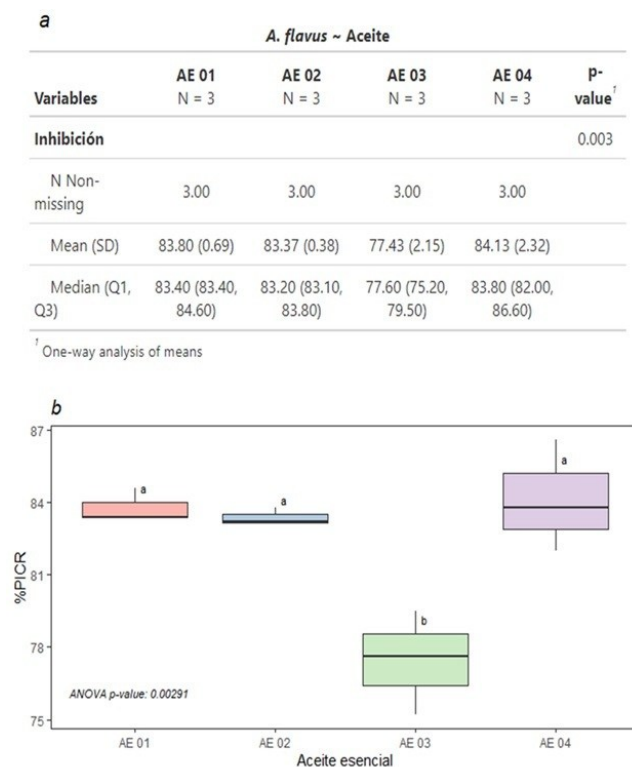


Figura 2. ANOVA de medias de inhibición de *A. flavus* (a) Box-plot de los niveles de inhibición de cada aceite para *A. flavus* (b). Letra distinta indica diferencia significativa.

ción del patógeno ($p = 0.003$) con respecto a los demás aceites (Figura 2b).

Los resultados del ensayo de inhibición en placa realizados frente al patógeno *F. solani* (Mart.) Sacc., después de los 10 días de incubación permitieron determinar que los aceites AE01, AE02 y AE04, redujeron significativamente el crecimiento fúngico con respecto al control en todas las concentraciones ensayadas, mientras que el AE03 tuvo un menor efecto inhibitorio, especialmente en la más baja concentración (25 $\mu\text{L/mL}$) con un % PICR promedio de 77.43. No obstante, se logró apreciar que ocasionó cambios en la pigmentación y en el crecimiento aéreo característico de este patógeno (Figura 3).

A nivel microscópico se observó que AE 04 impidió la formación de macroconidias (Figura 3-3.1), estructuras reproductivas del hongo, apareciendo en su mayoría solo hifas (Figura 3-3.2). El aceite permea la membrana celular, ingresa al interior de la ultraestructura celular y desplaza el contenido citoplasmático (Figura 3-3.2_b), ocasionando su engrosamiento (Figura 3-3.2_b*,c*), adelgazamiento de la estructura hifal (Figura 3-3.2_d*) y por tanto, pérdida de la integridad celular.

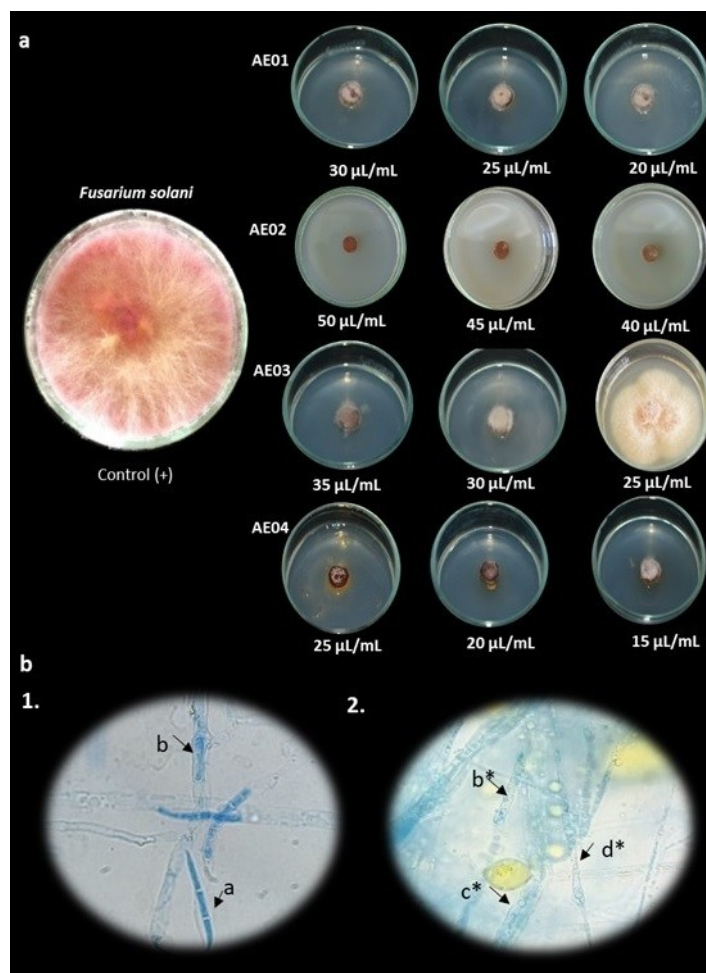


Figura 3. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales AE01, AE02, AE03 y AE04 sobre a) *F. solani* (Mart.) Sacc. en difusión en agar PDA b). Efecto a nivel de la ultraestructura fúngica de *F. solani* antes (1) y después (2) de ser expuesto a 15 µL/mL de AE 04.

Para *F. solani* (Mart.) Sacc. se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de aceite AE01, AE02 y AE04 en el % PICR ($p = 0.212$). No obstante, al igual que en el test de inhibición de *A. flavus*, el AE03, fue el que presentó menor porcentaje de inhibición con un promedio de 71.73 % (Figura 4a y 4b). Para calcular la dosis letal (DL 90), se estimaron los rangos mediante intervalo delta y se aplicó *likelihood ratio test* para corroborar el efecto de la dosis, encontrando un valor $p < \alpha$ para ambas cepas, por lo que se pudo concluir que las dosis estimadas sí afectan la inhibición de ambos patógenos (Tabla 2).

Con base en el modelo para estimar la DL90 se realizaron las curvas dosis – respuesta por cepa, donde se corroboró que el aceite A04 es el mas recomendado para la inhibición constante de ambas cepas, mientras que el aceite A03 es el menos efectivo especialmente a bajas concentraciones. Adicionalmente se realizó un modelo de regre-

sión lineal múltiple para determinar la relación entre la inhibición de las cepas con respecto al tipo de aceite esencial y su concentración. Para *A. flavus*, el modelo determinó que los aceites AE01 y AE04 aumentan la inhibición 2.1 y 1.4 unidades respectivamente, donde el AE01 presenta una significancia marginal de $p = 0.06$ y A04 una significancia de $p = 0.002$. En contraste con los aceites AE02 y AE03 la disminuyen 4.6 y 7.4 unidades respectivamente, siendo el aceite A03 el que tuvo un menor desempeño con un nivel de significancia $p = 0.002$.

Con el fin de visualizar el efecto inhibitorio *in vivo* de la DL90 calculada para cada cepa (tabla 2), se procedió a ensayar directamente sobre corteza de cacao. Los resultados se muestran en la figura 5 y permiten concluir que las concentraciones calculadas a través del modelo estadístico empleado son efectivas a la hora de inhibir los patógenos, ya que no se evidenció crecimiento fúngico aparente sobre la corteza del cacao.

Tabla 2. Estimación DL 90 de los cuatro aceites esenciales (AE 01-AE 04) por cepa.

Estimación DL 90			
Cepa	Aceite	Intervalo	Likelihood ratio test
<i>A. flavus</i>	AE01	DL 90 = 23 µL/mL	$p = 0.0001$
	AE02	DL 90 = 48 µL/mL	
	AE03	DL 90 = 31 µL/mL	
	AE04	DL 90 = 22 µL/mL	
<i>F. solani</i>	AE01	DL 90 = 22 µL/mL	$p = 4.1e^{-7}$
	AE02	DL 90 = 45 µL/mL	
	AE03	DL 90 = 27 µL/mL	
	AE04	DL 90 = 20 µL/mL	

a

F. solani ~ Aceite

Variables	AE 01 N = 3	AE 02 N = 3	AE 03 N = 3	AE 04 N = 3	p-value [†]
Inhibición					0.2
N Non-missing	3.00	3.00	3.00	3.00	
Mean (SD)	85.27 (1.62)	86.10 (0.70)	71.73 (21.28)	85.90 (0.87)	
Median (Q1, Q3)	86.20 (83.40, 86.20)	86.40 (85.30, 86.60)	81.70 (47.30, 86.20)	86.30 (84.90, 86.50)	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

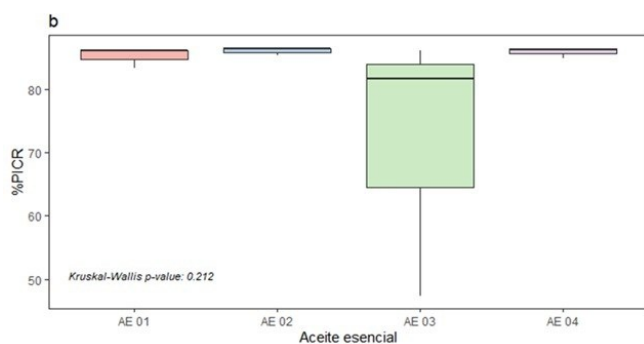


Figura 4. Kruskal Wallis de medianas de inhibición de *F. solani* (a) Boxplot de los niveles de inhibición de cada aceite para *F. solani* (b).

DISCUSIÓN

En esta investigación, se comprobó que los aceites *Illium verum* (AE 01) *Eucalyptus globulus* (AE 02) y *Lippia alba carvoniferum* (AE 04) exhibieron el mayor efecto inhibitorio frente a *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc., requiriendo concentraciones que oscilaron

entre 20-48 µL/mL para inhibir el 90% del crecimiento fúngico. A este respecto, se indica que todos los aceites fueron adquiridos comercialmente y en el caso de *Illium verum*, la casa fabricante reporta que se extrajo a partir de semillas de anís, por la técnica de destilación por arrastre de vapor y que su composición molecular está basado en los quimiotipos trans-Anetol (88.82 %), estragol (4.03 %), linalool (1.28 %) y foeniculin (1.07 %) (datos complementarios no mostrados). La literatura reporta que este aceite, tiene como principales compuestos químicos fenilpropanoides, flavonoides, neolignanos, monoterpénoides y sesquiterpenoides, siendo el componente dominante el fenilpropanoide transanetol con un rango de concentración 72-92 % (Sharafan et al., 2022) al que se le atribuye su efecto fungicida.

Esto explicaría el resultado observado en esta investigación, en la cual se requirieron entre 22 µL/mL y 23 µL/mL de *Illium verum* para inhibir el 90 % del crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc., respectivamente. Estas concentraciones fueron 10 veces menores a las reportadas por Soher y colaboradores, quienes encontraron que un aceite esencial de anís cuyos quimiotipos predominantes fueron transanetol (82.7%), cariofileno (4.8%) y limoneno (2.3%), inhibieron el crecimiento *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*, provenientes de maíz colectado en Egipto, en un 83.2% y 65.11%, usando concentraciones de 100 mg/mL, respectivamente. Para lograr una completa inhibición, los autores usaron concentraciones de 200 mg/mL (Soher et al., 2016). La diferencia en los resultados se podría atribuir a la concentración del quimiotipo más predominante del aceite (trans-Anetol), ya que el empleado en esta investigación, estaba un 5 % más concentrado comparado al el utilizado por Soher et al.

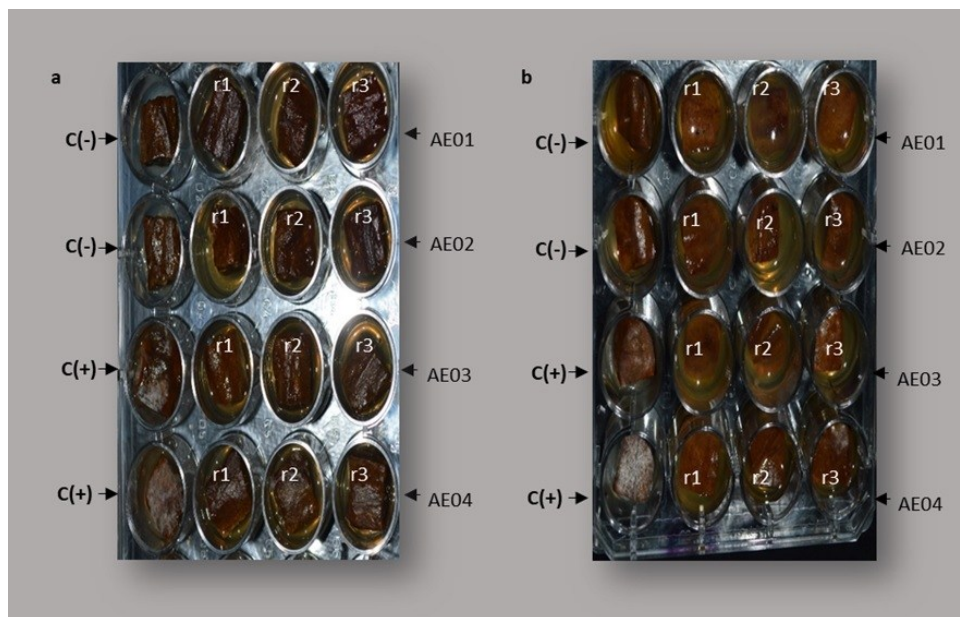


Figura 5. Efecto de inhibición *in vivo* de las dosis letales DL90 de 4 aceites esenciales sobre patógenos crecidos en corteza de cacao. **a)** *F. solani* (Mart.)Sacc. **b)** *A. flavus*. C(-) corresponden a los trozos de pulpa sin inocular (controles negativos) mientras que C(+) corresponden a los trozos corteza inoculados con los respectivos patógenos (controles positivos). r1, r2, r3 (número de réplicas hechas).

Se pudo evidenciar además, que las concentraciones empleadas del aceite esencial *Lippia alba carvoniifera* (AE 04) aunque fueron más bajas con respecto a los tres aceites restantes (AE 01, AE 02 y AE 03), su actividad inhibitoria fue la mejor frente a los dos patógenos. Este aceite esencial se caracteriza por la variabilidad en la composición química dependiendo del origen del material vegetal, de la etapa de crecimiento que se colecta la planta, así como la parte seleccionada para la destilación del aceite, por lo cual se ha reportado la existencia de al menos siete quimiotipos. Pandey *et al.*, analizaron el efecto de 11 tipos de aceites contra el hongo micotoxigénico *A. flavus*, demostrando que *Lippia alba*, fue el aceite esencial que exhibió una inhibición absoluta del crecimiento fúngico a una concentración de 0,28 $\mu\text{L/mL}$, lo cual fue atribuido por los autores a la presencia de citral (36.9%) y neral (29.3 %) como quimiotipos predominantes, seguido de mirceno (18.6 %). Los autores concluyeron que aplicando 80 $\mu\text{L}/0.25\text{ L}$ de aire, se inhibía significativamente la proliferación fúngica y la producción de aflatoxina B1 en el almacenamiento de semillas verdes (Pandey *et al.*, 2016). Fontana y colaboradores, mostraron que el aceite *Lippia alba* obtenido por hidrodestilación a partir de plantas de un jardín medicinal ubicado en la Universidad Federal de Santa María en Brazil, eran capaces de inhibir el crecimiento de varias especies fúngicas incluyendo *F. solani* aisladas a partir de cultivos de soja y fresa, en concentraciones que oscilaron entre 0.2 a 1.4 $\mu\text{L/mL}$. Los autores lo atri-

buyeron a la naturaleza lipofílica de los aceites y a su capacidad para fusionarse con la membrana citoplasmática de los hongos, ejerciendo acción desestabilizante (Fontana *et al.*, 2020). Esto coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que se logró observar como el AE 04 en *F. solani* (Mart.)Sacc. y *A. flavus*, permeó la ultraestructura y causó afectación en la integridad celular (Figuras 1 y 3, respectivamente), corroborando la interacción hidrofóbica con los grupos no polares de la membrana plasmática de los hongos estudiados. La fuerte actividad de los aceites esenciales sobre la germinación de las esporas de hongos, está relacionada con algunos componentes que afectan principalmente la pared y membrana celular de las conidias, impidiendo su germinación y crecimiento (Tariq *et al.*, 2019).

Eucalyptus Globulus es un aceite cuya composición está basada en monoterpenos oxigenados y no oxigenados, así como los sesquiterpenos oxigenados, que constituyen la mayor parte del aceite esencial. Los monoterpenos más oxigenados son el eucaliptol (51,62%) y el terpinen-4-ol (2,74%), mientras que los principales monoterpenos no oxigenados son el α -pineno (23,62%), el p-cimeno (10%) y el β - mirceno (8,74%). En este aceite esencial, el contenido de los principios activos varía en función del período de recolección de órganos de las plantas (Almas *et al.*, 2021). En esta investigación se lograron porcentajes de inhibición de *A. flavus* y *F. solani* (Mart.) Sacc. superiores al 80 % al usar el aceite esencial

Eucalyptus globulus en concentraciones que oscilaron entre 40-50 µL/mL. Estos resultados son ligeramente similares a los reportados por Pujiarti y colaboradores, quienes evaluaron el efecto inhibitorio del aceite esencial *Eucalyptus urophylla* frente a especies de *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*, demostrando que a mayor concentración del aceite, mayor inhibición, requiriendo hasta 20 mg/mL para obtener un 74.74 % y 77.29 %, respectivamente, con un IC 50 de 1.61 mg para *Fusarium oxysporum* y 13.56 mg/mL para *Aspergillus niger* (Pujiarti et al., 2018). La diferencia en concentraciones inhibitorias, puede atribuirse a la especie de eucalipto trabajada, así como a la técnica de extracción del aceite. Es bien sabido por la literatura que el método de destilación por arrastre de vapor es más eficiente para extraer aceites esenciales, con una eficiencia de hasta el 93 % (Villamizar & González, 2023) en comparación con la hidrodestilación.

Rosmarinus officinalis cineoliferum contiene 1,8-cineol, α -pineno, verbenona, alcanfor y borneol, pero las composiciones pueden variar ampliamente, lo que hace que existan más de 13 quimiotipos de este aceite esencial basándose en los porcentajes relativos de α pineno, 1,8-cineol, alcanfor, borneol, verbenona y acetato de bornilo (Satyal et al., 2017). En esta investigación, los proveedores de AE 03, indican que el aceite fue obtenido a partir de sumidades floridas procedentes de Tunisia. Este aceite logró porcentajes de inhibición % PICR de 77.43 y 71.73, respectivamente frente a *A. flavus* y *F. solani* (Mart.) Sacc., empleando concentraciones que oscilaron entre 25-35 µL/mL. Esto es ligeramente diferente a lo reportado por Ben Kaab y colaboradores, quienes emplearon aceite de romero obtenido a partir de hojas procedentes de la misma zona geográfica e indicaron que concentraciones de 6 µL/mL inhibían más del 80 % de la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Penicillium italicum* después de 120 horas de incubación (Ben Kaab et al., 2019). Lo anterior se podría atribuir a la especificidad que puede darse entre los aceites empleados y los patógenos objeto de estudio. La toxigenicidad de los hongos endofíticos y epifíticos del cacao así como de otros cultivares, se ve influenciada por la zona geográfica y las condiciones edafoclimáticas en las que se establecen los cultivos (Perreno et al., 2020). Las prácticas agro culturales, así como el uso de fungicidas, hacen que incrementan o atenúen su patogenicidad.

CONCLUSIÓN

Se logró evaluar la capacidad inhibitoria de cuatro (4) aceites esenciales adquiridos comercialmente frente a *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., patóge-

nos autóctonos, aislados de cultivos de cacao del departamento N de S, Colombia. Se puede resaltar que los aceites esenciales comparten un mecanismo de acción común, pero que su efectividad depende de su huella dactilar y de las características de resistencia y/o susceptibilidad que exhiba el patógeno objeto de estudio. A través de esta investigación se genera una alternativa efectiva y eco-amigable basada en el uso de los aceites esenciales de *Illicium verum* (anís) y *Lippia alba carvoni-ferum* (pronto alivio), como los agentes inhibidores con mejor desempeño, que pueden escalar a campo, a fin de evaluar su efectividad *in situ*. Esto sin duda, podría contribuir a la introducción de estrategias verdes para reducir los riesgos asociados a la presencia de hongos patógenos con potencial micotoxigénico en las mazorcas de cacao y por tanto; en el chocolate y derivados que se generan y comercializa en la región.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen Fedecacao N de S por facilitarnos los materiales biológicos (cacotas) y a Acadística <https://orcid.org/0000-0002-7574-5168> por sus valiosos aportes en los análisis estadísticos realizados.

REFERENCIAS

- Almas, I., Innocent, E., Machumi, F., y Kisinza, W. (2021). Chemical Composition of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maculata* Grown in Tanzania. *Scientific African Journal*. 12, e00758. doi: 10.1016/j.sciaf.2021.e00758.
- Ben Kaab, S., Rebey, I.B., Hanafi, M., Berhal, C., Fauconier, M.L., De Clerck, C., Ksouri, R., y Jijakli, H. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil as an effective antifungal and herbicidal agent. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 17(2), e1006. <https://doi.org/10.5424/sjar/2019172-14043>.
- Codex Alimentarius. CXC 72-2013. Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación del cacao por Ocratoxina A. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/es/>. Fecha de consulta 010224.
- Delgado-Ospina, J., Molina-Hernández, J.B., Chaves-López, C., Romanazzi, G., y Paparella, A. (2021). The Role of Fungi in the Cocoa Production Chain and the Challenge of Climate Change. *Journal of Fungi (Basel)*. 10, 7(3), 202. doi: 10.3390/jof7030202.
- Fontana, D., Schmidt, D., Kulczynsk, S., Caron, B., y Pretto, M. (2020). Fungicidal potential of essential oils in control of *Fusarium* spp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Arquivos do Instituto Biológico*. 87, 1-10. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000612019>.

- Gómez-López, A., Martínez-Bolaños, L., Ortíz-Gil, G., Martínez-Bolaños, M., Avendaño-Arrazate, C. H., & Hernandez-Meneses, E. (2020). Bioaceites esenciales inhiben a *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par) Evans et al., causante de la monilia en el cultivo de cacao. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 6(1). <https://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/130>.
- ICCO (2022). *Fine or Flavor Cocoa - International Cocoa Organization*. Recuperado de <https://www.icco.org/fine-or-flavor-cocoa/> Fecha de consulta 020224.
- Lahive, F., Hadley, P. y Daymond, A.J. (2019). The physiological responses of cacao to the environment and the implications for climate change resilience. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 39, 5. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0552-0>.
- da Silva Bomfim, N., Polis, Nakassugi L., Pinheiro, Oliveira J.F., Kohiyama, C.Y., Galerani Mossini, S.A., Grespan, R., Botião Nerilo, S., Mallmann, C.A., Abreu Filho, B.A., Machinski, y Jr, M. (2015). Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chemistry*. 166, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.019>.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., y Feo, V. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* (Basel). 10(4), 86. doi: 10.3390/ph10040086.
- Pandey, A.K., Sonker, N. y Singh, P. (2016). Efficacy of some essential oils against *Aspergillus flavus* with special references to *Lippia alba* oil an inhibitor of fungal proliferation and aflatoxin B1 production in green gram seeds during storage. *Journal Food Science*. 81 (4), M928-34. DOI: 10.1111/1750-3841.13254.
- Parrish, N., Fisher, S.L., Gartling, A., Craig, D., Boire, N., Khuvis, J., Riedel, S., y Zhang, S. (2020). Activity of various essential oils against clinical dermatophytes of *Mycrosporum* and *Trychophyton*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, 545913. doi: 10.3389/fcimb.2020.545913.
- Pujiarti, R., Nurjanto, H., y Sunarta, S. (2018). Antifungal Activity of *Eucalyptus urophylla* Oil Against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *Agrivita Journal of Agricultural Sciences*. 40(1), 55-62. doi:10.17503/agrivita.v40i1.990.
- Sanchez, F.V. (13 de Septiembre de 2023). Sector cacaoero proyecta una producción de 126.000 toneladas para final de década. <https://www.agronegocios.co/agricultura/dia-internacional-del-chocolate-2023-una-radiografia-del-sector-cacaotero-3703229>.
- Santos, A., García, M., Cotes, A.M., y Villamizar, L. (2012). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*. 29(3), 150-156. doi:10.1016/j.riam.2011.11.002.
- Sharafan, M., Jafernik, K., Ekiert, H., Kubica, P., Kocjan, R., Blicharska, E., y Szopa, A. (2022). *Illicium verum* (Star Anise) and *Trans-Anethole* as Valuable Raw Materials for Medicinal and Cosmetic Applications. *Molecules*. 27, 650. <https://doi.org/10.3390/molecules27030650>.
- Satyral, P., Jones, T.H., Lopez, E.M., McFeeters, R.L., Ali, N.A., Mansi, I., Al-Kaf, A.G., y Setzer W.N. (2017). Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods*. 5, 6(3), 20. DOI: 10.3390/foods6030020.
- Soher, E., Bassem, A., Sabry, A., Mohamed, S., y Hathout, A.H. (2016). Assessment of antimycotoxigenic and antioxidant activity of star anise (*Illicium verum*) in vitro. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 15(1), 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.05.003>.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M.A., Prabhakar, A., Shalla, A.H., y Rather, M.A. (2019). A comprehensive review of the bacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 134, 103580. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103580.
- Raveau, R., Fontaine, J., y Sahraoui, A. (2020). Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. *Foods*. 9, 3, 365. <https://doi.org/10.3390/foods9030365>.
- Ritz, C., y Streibig, J. C. (2005). Bioassay Analysis using R. *Journal of Statistical Software*. 12 (5), 1-22. 10.18637/jss.v012.i05.
- Villamizar, R.A., Osma, J.F., y Ortíz, O.O. (2016). Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 51 (12), 1929-1936. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016001200003>.
- Villamizar, R.A., y González, E.E. (2023). *BioNanotecnología aplicada al cultivo de Theobroma cacao L.* Primera edición. Colección Biología y Ciencias Naturales. Sello Editorial UniPamplona. ISBN: 978-628-7656-01-7. <https://books.unipamplona.edu.co/index.php/editorial/catalog/book/40>.
- Xiang, F., Zhao, Q., Zhao, K., Pei, H., y Tao, F. (2020). The Efficacy of Composite Essential Oils against Aflatoxigenic Fungus *Aspergillus flavus* in Maize. *Toxins*. 12 (9), 562. doi: 10.3390/toxins12090562.

Obtención de enzimas celulasas a partir de residuos agroindustriales por fermentación sumergida

Obtaining cellulases enzymes from agroindustrial waste by submersible fermentation

Edwin Daniel Mejía Florian *,
Nikol Daniela Delgado Monroy *, Ana María Arismendy Pabón **,
Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza ***, Mónica Liliana Reyes Galvis ****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.117573

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo obtener enzimas celulasas a partir de residuos generados por actividades agroindustriales, como la cascarilla de café y las cáscaras de naranja, mediante fermentación sumergida. Esta estrategia se planteó como una alternativa para disminuir el impacto ambiental negativo asociado con la acumulación de residuos orgánicos, y valorización de estos como sustratos más económicos para obtener enzimas. La metodología aplicada incluyó, en una primera etapa, la selección de hongos productores de celulasas utilizando placas con medio CMC, reveladas con el reactivo Rojo Congo, los microorganismos fueron facilitados por el Cepario sede Campos Elíseos, UFPS, los resultados obtenidos mostraron producción de celulasas para los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*. Se llevaron a cabo análisis de sólidos en las muestras, seguidos de un pretratamiento oxidativo en autoclave utilizando ácido acético y peróxido de hidrógeno para eliminar la lignina presente en la biomasa. Posteriormente, se desarrolló el proceso de fermentación, empleando un sustrato pretratado al 3% p/v enriquecido con medio Mandels (90 mL) al que se inocularon 10 mL del hongo *Aspergillus niger* con una densidad celular de 10^8 esporas/mL. Los ensayos se realizaron en agitación orbital a 160 rpm durante 12 días. La actividad enzimática obtenida fue de 0,370 FPU/mL para cascarilla de café y de 0,400 FPU/mL para cáscaras de naranja a las 264 horas.

Palabras claves: celulasas, fermentación sumergida, microorganismos, residuos

ABSTRACT

The objective of this work was to obtain cellulase enzymes from residues generated by agroindustrial activities, such as coffee husks and orange peels, by submerged fermentation. This strategy was proposed as an alternative to reduce the negative environmental impact associated with the accumulation of organic wastes, and to valorize them as more economical substrates to obtain enzymes. The methodology applied included, in a first stage, the selection of cellulase-producing fungi using plates with CMC medium, developed with Congo Red reagent, the microorganisms were pro-

* Estudiante Programa de Ingeniería Biotecnológica Universidad Francisco de Paula Santander, edwindanielmf@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0009-0004-6591-6877>, nikoldanieladm@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0009-0001-8249-2138>.

** Docente catedrática del Programa Ingeniería Biotecnológica UFPS Email: anamariaap@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0000-0002-9687-7047>.

*** Docente de planta Programa de Ingeniería Biotecnológica, Directora Semillero SINBI. yanethamparomp@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0000-0001-6748-4781>.

**** Asistente de Laboratorio de Biotecnología General UFPS. monicalilianarg@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0000-0002-9053-4991>, Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.

vided by the Cepario Campos Elíseos, UFPS, the results obtained showed cellulase production for the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. Solids analysis was carried out on the samples, followed by an oxidative pretreatment in an autoclave using acetic acid and hydrogen peroxide to eliminate the lignin present in the biomass. Subsequently, the fermentation process was developed, using a 3% w/v pretreated substrate enriched with Mandels medium (90 mL) to which 10 mL of the fungus *Aspergillus niger* with a cell density of 10^8 spores/mL were inoculated. The assays were performed under orbital shaking at 160 rpm for 12 days. The enzyme activity obtained was 0,370 FPU/mL for coffee husks and 0,400 FPU/mL for orange peels at 264 hours.

Key words: Cellulases, submerged fermentation, microorganisms, waste.

Recibido: noviembre 14 de 2024

Aprobado: febrero 25 de 2025

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos, que sirven para acelerar reacciones con la finalidad de obtener un producto, en el caso de las celulasas hidrolizan la celulosa para producir glucosa por medio de la acción sinérgica de tres enzimas que son las endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, (Alvarado y Hernández, 2018).

La biomasa lignocelulósica que se utiliza como sustrato para obtener las enzimas, se encuentra conformada por celulosa, hemicelulosas y lignina. La celulosa es un polisacárido formado por largas cadenas de azúcares de seis átomos de carbono, por lo que se denominan hexosas, unidas por enlaces glicosídicos β -1,4, (Liu, 2013), (Puente-Urbina, 2022). La hemicelulosa es un polímero conformado por azúcares de cinco y seis átomos de carbono como D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-manosa y D-galactosa. La lignina es un polímero que se compone de fenilpropanoides que son hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S), (Ralph *et al.*, 2019). En relación a la biomasa que se utilizó para la elaboración de este trabajo y analizando la problemática ambiental por acumulación de residuos orgánicos en el medio ambiente, se propuso realizar ensayos con estos residuos entre estos las cáscaras de naranja y café. Respecto a lo anterior se encontró que la acumulación de residuos de cítricos a nivel mundial genera alrededor de 20 millones de toneladas anuales de estos, en solo la ciudad de Bogotá, (Peñaranda *et al.*, 2017) en la capital del país se producen 6.300.000 de residuos sólidos, de esta cantidad de residuos el 53,22% corresponde a orgánicos y tan solo el 17% del total de toneladas que se producen se reciclan, (Muñoz *et al.*, 2022).

La naranja es uno de los cítricos que más se producen en ciudades como Bogotá y Medellín, las anteriores cifras nos indican el gran impacto que genera la acumulación de estos residuos orgánicos, y el poco aprovechamiento que se les da, tan solo analizando las ciudades principales del país como Bogotá y Medellín, (Muñoz *et al.*, 2022), por otra parte en la industria de producción

del café aproximadamente el 95% de lo que se obtiene, confieren a residuos, teniendo en cuenta que Colombia es un país cafetero, se afirma que los principales subproductos generados en esta industria son: la pulpa, el mucílago, el cisco (cáscara), las pasillas, y la borra, que son considerados residuos del proceso.

Por lo anterior, es importante mencionar que en la producción de café se generan impactos negativos ambientales significativos, principalmente en fuentes hídricas, suelos y aire, afectando los recursos naturales según (Rodríguez, 2007); (Alvarado y Hernández, 2018), por lo que proponer un aprovechamiento de residuos de esta industria es interesante.

Teniendo en cuenta que la biomasa utilizada es lignocelulósica, se recalca que la conversión de la celulosa a monómeros, conlleva a la realización de un proceso denominado pretratamiento de la materia prima, el cual permite la eliminación de componentes como lignina y hemicelulosas (Torres y Molina, 2012).

Para remover componentes de la biomasa utilizada en este proyecto, se optó por aplicar el pretratamiento con ácido acético y peróxido de hidrógeno (la mezcla se denomina ácido peracético), debido a que son reactivos biodegradables.

Finalmente la fermentación en estado sumergido, la cual es una técnica ampliamente usada para producir enzimas, permitió obtener las celulasas, cabe destacarse que las celulasas son enzimas que se comercializan en gran medida a nivel mundial, dada su importancia en industrias como textiles, alimentos, detergentes, y producción de biocombustibles, (Khatiwada *et al.*, 2016; Sinjaroonsak *et al.*, 2020; Pangsi *et al.*, 2021) sin embargo, los altos costos involucrados en su producción generan limitantes, esto se debe a sustratos utilizados como el carboximetilcelulosa y técnicas empleadas en la obtención de estos catalizadores biológicos (Bhardwaj *et al.*, 2021; Coelho *et al.*, 2021). Por consiguiente, se determinó realizar este proyecto para obtener enzimas celulasas a partir de residuos

agroindustriales, ya que actualmente se busca la valorización de estos, debido a que son de bajo costo, logrando también generar un impacto positivo en el medio ambiente al disminuir la cantidad de residuos orgánicos que son arrojados diariamente.

METODOLOGÍA

En esta sección se presenta la metodología aplicada para el desarrollo de este trabajo que cuenta con la caracterización de microorganismos, biomasa, pretratamiento de la biomasa, fermentación y determinación de la actividad enzimática.

Caracterización de los microorganismos, producción de enzima en placa, preparación y caracterización de la biomasa

Se realizó la siembra en medio carboximetilcelulosa (CMC) de los microorganismos utilizados, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* cedidos por el cepario de los laboratorios de la sede Campos Elíseos de la Universidad Francisco de Paula Santander, los cuales fueron puestos en incubación durante 5 días, transcurrido este tiempo se hizo lavado de las cepas con el reactivo Rojo Congo y se llevaron a nevera 3 días, después se observó y cuantificó el halo de producción de enzima celulasa en placa, la observación microscópica se realizó con la técnica impropia utilizando azul de lactofenol, (Escudero, 2022). En el caso de la biomasa, se recolectó una cantidad significativa de cáscaras de naranja y cáscaras de café, que fueron donadas por propietarios de la Finca El Paraíso de la vereda Barrientos, en el corregimiento de Arboledas, Norte de Santander. Seguidamente se realizó la reducción de tamaño de las cáscaras de naranja obteniendo trozos de 0,5 cm x 0,5 cm, para las cáscaras de café no se aplicó la reducción de tamaño, ya que estas naturalmente presentan un tamaño pequeño.

Se procedió a secar las cáscaras a temperatura ambiente, 30°C +/- 0,015, teniendo en cuenta que la ciudad de Cúcuta presenta clima cálido, luego se determinó la humedad que quedaba en la biomasa, por lo que se agregó 1 o 2 gramos de cáscara de café y naranja en una cápsula de porcelana, posteriormente se colocaron en el horno a 110°C durante 1 hora, después se llevaron al desecador las muestras y se realizaron pesadas hasta obtener cantidades constantes. El ensayo se realizó por duplicado, según la norma NREL/TP-510-42621 (Sluiter *et al.*, 2008). Para la determinación de celulosa, hemicelulosa y lignina de muestras analizadas durante el año 2024, se utilizó el método de Van Soest, el cual es aplicado en el Laboratorio de Bromatología (Janke *et al.*, 2016), de la sede de Campos Elíseos, Universidad Francisco de Paula Santander.

También se caracterizó la biomasa antes y después del pretratamiento con microscopía electrónica de barrido SEM para observar la disposición de la estructura interna de la biomasa antes y después de ser procesadas. Para hallar el % de humedad se utiliza la siguiente ecuación (1).

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{peso de la muestra seca} - \text{peso de la cápsula}}{\text{peso de la muestra húmeda}} * 100$$

Para hallar la cantidad de lignina y celulosa en la biomasa sin pretratar y pretratada se utilizan las siguientes ecuaciones, (2) y (3):

%Hemicelulosa

$$\% \text{Hemicelulosas} = \% \text{FDN} - \% \text{FDA}$$

%Lignina

$$\% \text{Lignina} = \% \text{FDA} - \% \text{celulosa}$$

En donde:

%FDN: porcentaje fibra detergente neutra

%FDA: porcentaje fibra detergente ácida

Pretratamiento de la biomasa

Las cáscaras de naranja y café se sometieron a un pretratamiento tipo oxidativo para remover lignina con ácido acético (vinagre comercial) y peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), se trabajó la dosificación de reactivos en relación de 1:7, por cada gramo de residuo seco se agregan 7 mL de agua (se tiene en cuenta la humedad del residuo y los reactivos como el ácido acético y peróxido de hidrógeno), la relación establecida para ácido acético fue de 1:4, por cada gramo de residuo se agregan 4 mL de ácido acético y el peróxido de hidrógeno se dosificó en relación de 1:0,5, por cada gramo seco de residuo se agregaron 0,5 mL de peróxido. Los residuos fueron dispuestos en erlenmeyers de 1000 mL durante 2 días a temperatura ambiente, y luego se llevaron a la autoclave durante 1 hora a 121°C. Terminado el pretratamiento, se retiró el material del sobrenadante y se lavó con agua destilada, posteriormente se secaron a temperatura ambiente 30 °C +/- 0,15 los sustratos, y se realizó de nuevo la determinación de humedad. Se halló el rendimiento del proceso mediante los pesos por triplicado de la biomasa pretratada recién pretratada, y la biomasa pretratada que se secó a temperatura ambiente 30 °C +/- 0,15, teniendo en cuenta que, en el pretratamiento utilizado, se remueve lignina y hemicelulosas.

La ecuación (4) utilizada para hallar el rendimiento del proceso es la siguiente, según (Kruyeniski, 2017):

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{peso inicial de la muestra pretratada}}{\text{peso seco de la muestra pretratada}} * 100$$

Preparación de la fermentación en cultivo sumergido:

Los ensayos de fermentación se realizaron por duplicado con el hongo *Aspergillus niger*, se preparó el medio de cultivo correspondiente junto con el residuo pretratado, el medio de cultivo utilizado denominado medio Mandels, (Ospina, 2020), contenía 1,4 g/L de sulfato de amonio, 2g/L fosfato monopotásico, 0,4 g/L cloruro de calcio dihidratado, 0,3 g/L sulfato de magnesio, 0,5 g/L sulfato ferroso heptahidratado, 0,2 g/L sulfato de manganeso hidratado, 0,2 g/L sulfato de zinc, 0,3 g/L de urea y 2 g/L de extracto de levadura, y buffer pH 4,8 citrato de sodio. Teniendo en cuenta que se utilizó 100 mL de fermentación en erlenmeyers de 250 mL con 3% p/v de sustrato pretratado, el inóculo contenía 10^8 esporas/mL aproximadamente (se preparó previamente en solución salina con Tween 80 al 0,1%), y correspondió al 10% v/v del volumen total de la fermentación. La fermentación se mantuvo en agitación orbital a 130 rpm bajo condiciones de temperatura ambiente por 12 días, y se llevaron a cabo cuatro muestreos para cuantificar la actividad enzimática posteriormente.

Determinación de la actividad enzimática: Se colocaron duplicados junto con un blanco de residuos sin pre-tratar. Se cuantificó la actividad de las celulasas generadas en el proceso de fermentación durante 12 días, tomando 3 mL del extracto enzimático, el cual se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se utilizó para medir las actividades junto con papel de filtro Whatman N° 1 y DNS según indica la norma NREL/TP-510-42628 (Adney et al., 2008). Se realizó la medición de la actividad por triplicado en diferentes concentraciones de extracto enzimático con su respectivo blanco, según indica la norma para determinación de actividad enzimática de celulasas.

La ecuación (5), utilizada para la determinación de la actividad enzimática es la siguiente:

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Conc.de enzima para producir 2,0 mg de glucosa}}$$

FPU: Unidades de papel de filtro FPU/mL, de esta forma se expresa finalmente el resultado.

Desarrollo de análisis estadístico: Se realizó la determinación de la prueba del Test de Fisher de múltiples rangos, y gráfico correspondiente a los datos obtenidos en el seguimiento de la fermentación en estado sumergido, utilizando el software estadístico Startgraphics Centurión versión XV.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Seguidamente se detalla en la Tabla 1, características macroscópicas, microscópicas y medición de los halos

enzimáticos de los microorganismos utilizados para los ensayos realizados.

Caracterización de cepas y biomasa

Mediante el análisis de la tabla 1, donde se evidenció similitud en los resultados de producción de celulasas, para los dos microorganismos, se optó por realizar los ensayos de fermentación sumergida con *Aspergillus niger*.

Los resultados obtenidos en este trabajo, son comparables con autores como (Tórtora et al., 2023), quienes hallaron halos de medición de actividad enzimática de 1,1 cm, 0,4 cm y 0,77 cm para las cepas HR5, HRE2, y HR5E3 que son aislamientos fúngicos en medio CMC, por otra parte (Campuzano et al., 2017) encontraron halos de 1,6 y 2,2 cm correspondientes a las cepas *Rhizopus sp S6* y *Rhizopus sp S14* en medio CMC, autores como (Ramírez e Isaza 2019), definieron halos de 1,2 y 0,85 para *Phanerochaete spp* y *Stereum spp* en medio Czapek's Dox y finalmente en este trabajo de hallaron halos de 0,45 y 0,40 cm para *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*. Se afirma que esta prueba es de gran importancia debido a que evidencia la hidrólisis de la fuente de carbono del medio generando un halo transparente alrededor del crecimiento del microorganismo, permitiendo así elegir cual microorganismo presenta mediciones significativas de producción de la enzima.

Caracterización de la biomasa, determinación de humedad, lignina, hemicelulosa y celulosa

En este apartado se presentan en las tablas 2 y 3 los resultados referentes a la caracterización de la biomasa, cáscaras de naranja y café, que han sido determinadas previamente en el Laboratorio de Bromatología sede Campos Elíseos, UFPS.

Analizando las tablas 2 y 3, se destaca que en el caso de las cáscaras de naranja el efecto que ejerció el pretratamiento principalmente fue eliminar de forma significativa hemicelulosas y en menor cantidad lignina, el rendimiento del proceso fue del 36,42%, debido a lo nombrado anteriormente el pretratamiento no ejerce un efecto significativo en remoción de lignina, pero si en remoción de hemicelulosas, para el caso de las cáscaras de café se presenta mayor remoción de lignina y menor de hemicelulosas, el rendimiento del proceso es del 41%, el resultado obtenido demuestra que se generó una remoción de lignina aunque no significativa, teniendo en cuenta que las cáscaras de café presentan un contenido representativo de lignina inicial (22%), llegando finalmente después del pretratamiento al 15%.

Según lo anterior se indica que para mejorar los resultados de los tratamientos, inicialmente se debe tener en

Tabla 1. Caracterización macroscópica y microscópica de cepas utilizadas.

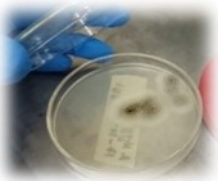
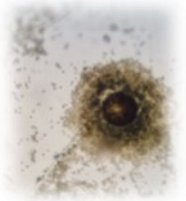
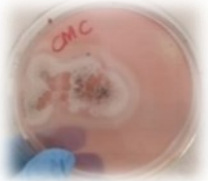
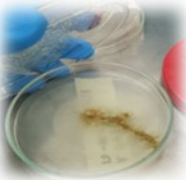
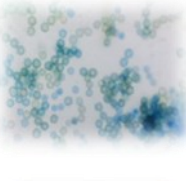

Microorganismo	Observación	Caracterización macroscópica, microscópica y medición de halos enzimáticos (cm)
<i>Aspergillus niger</i>	  	<p>En el caso de <i>Aspergillus niger</i> en medio CMC, se observan tres colonias grandes circulares con esporulado de color negro. Las colonias de este hongo se caracterizan por poseer textura polvorienta.</p> <p>La observación microscópica en el objetivo de 40X, presenta el conidióforo grande, de color café oscuro, biseriado con métula y fiálides de color marrón oscuro que cubren toda la vesícula dando la forma radiada típica.</p> <p>La medición de los halos enzimáticos formados alrededor del crecimiento fúngico es de 0,45 cm +/- 0,07.</p>
<i>Aspergillus oryzae</i>	  	<p>El hongo <i>Aspergillus oryzae</i> en medio CMC, presenta una colonia grande de color beige, internamente con crecimiento esporulado del hongo de color marrón-verdoso.</p> <p>La caracterización microscópica con azul de lactofenol indica la presencia de esporas del hongo, algunas se tiñeron de azul por el colorante y otras se visualizan de color marrón claro.</p> <p>El diámetro de los halos es de 0,40 cm +/- 0,14.</p>

Tabla 2. Caracterización cáscaras de naranja

Cáscaras de naranja sin pretratar				Cáscaras de naranja pretratadas			
Humedad%	Celulosa%	Lignina%	Hemi %	Humedad%	Celulosa%	Lignina%	Hemi %
13,40 +/- 0,020	30 +/- 0,04	7 +/- 0,17	11,00 +/- 1,0	29 +/- 0,016	32 +/- 0,95	4,4 +/- 1,0	4 +/- 1,2

Tabla 3. Caracterización cáscaras de café.

Cáscaras de café sin pretratar				Cáscaras de café pretratadas			
Humedad%	Celulosa %	Lignina%	Hemi %	Humedad%	Celulosa%	Lignina%	Hemi %
8,35 +/- 0,023	36,31 +/- 1,12	22,00 +/-1,17	13,6 +/- 0,75	27,55 +/- 0,01	42 +/-0,51	13,00+/-0,9	15+/-0,35

cuenta que en el proceso se utilizó ácido acético (vinagre comercial) al 5% v/v y peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 3% v/v, por lo que se afirma que las concentraciones de los reactivos son bajas, por ende para mejorar la efectividad del pretratamiento es necesario mejorar sustancialmente las condiciones de este, aumentando las cantidades de reactivo a utilizar, aplicando mayor tiempo de reacción en autoclave, y sometiendo la biomasa inicialmente a una reducción de tamaño, logrando de esta forma partículas más pequeñas de esta.

En el caso de las cáscaras de naranja, se recomienda realizar una extracción de aceites esenciales antes de aplicar el pretratamiento, ya que esto puede interferir en la remoción de componentes. Es importante nombrar que, mejorando los rendimientos de los procesos, se obtiene mayor remoción de compuestos, ya que se facilita la actividad del microorganismo, al hidrolizar la celulosa para producir celulasas. Comparando con otros resultados de diferentes autores que trabajaron con biomasa lignocelulósica, se presenta en la Tabla 4.

En análisis de los resultados presentados en la tabla 4, se observa que los datos obtenidos en este trabajo son comparables con los de otros autores, se evidencian rendimientos que se encuentran dentro de los rangos de varios autores, utilizando reactivos biodegradables, económicos y equipamiento de fácil acceso en un laboratorio de biotecnología.

Caracterización de la biomasa en microscopía SEM

La caracterización de la biomasa también se realizó en microscopía de barrido electrónico, a continuación, se muestran las imágenes de la biomasa antes y después de pretratada.

Las imágenes en microscopía SEM evidencian la estructura interna de la biomasa de cáscaras de café y naranja sin pretratar y pretratadas, las imágenes revelan las fibras de hemicelulosas, celulosa, lignina y estructuras de estomas que conforman la biomasa lignocelulósica, en el caso de la biomasa sin pretratar se puede visualizar claramente la presencia significativa de fibras, caso contrario en la biomasa pretratada donde hay menos presencia de fibras, debido al efecto que ejerce el pretratamiento en la estructura interna de estas, al eliminar parte

de la lignina y hemicelulosas contenidas en la biomasa. La remoción de lignina y hemicelulosas, facilita la accesibilidad a la celulosa por parte de los microorganismos para producir enzimas.

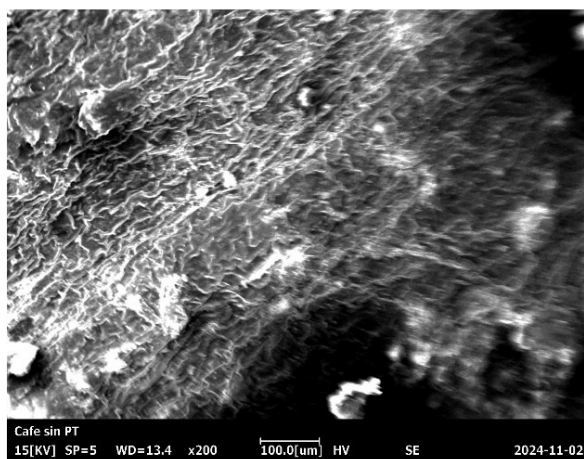
Determinación de la actividad enzimática en cáscaras de naranja y café

La cinética correspondiente a la producción de celulasas a partir de cáscaras de naranja se presenta en la Figura 1.

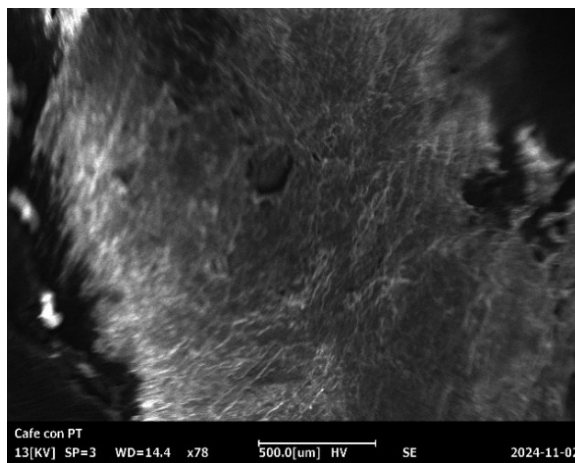
En base a los resultados que se presentan en la Figura 2, se observa que a las 96 horas se presentan actividades similares para los dos tipos de cáscaras, a las 264 horas en el caso de la cáscara de naranja se ha presentado una elevación significativa en la actividad enzimática, finalizando a las 312 horas, se genera un leve descenso de la actividad, sugiriendo que sería necesario seguir monitoreando después de este tiempo para determinar si continúa disminuyendo la actividad o empieza a mantenerse constante, caso contrario sucede en las cáscaras de café que a las que a las 264 horas llegan a su mayor actividad enzimática y de ahí en adelante el descenso de la actividad es significativo, indicando que el tiempo óptimo de producción de la enzima para las cáscaras de café es 12 días, un dato interesante también en cuanto a la utilización de las cáscaras de naranja para producción de enzimas, es que estos residuos han sido principalmente estudiados para producción de enzimas pectinasas, (Arellano *et al.*, 2015), pero en este trabajo se demostró que se pueden obtener celulasas de esta materia prima.

En comparación con la obtención enzimática de otros autores como (Sosa 2019), también reportaron celulasas a partir del *Aspergillus niger*, mediante el uso de residuos como bagazo de caña, bagazo de sorgo, rastrojo de maíz, cáscara de arroz y paja de cebada, se generaron resultados similares a esta investigación con actividad enzimática de 0,215 FPU/ml. En otra investigación (Mueses *et al.*, 2018), quienes trabajaron con el microorganismo, *P. ostreatus*, obtuvieron resultados significativos en la producción enzimática con el bagazo de fique con un total de 0,9978 FPU/mL con un intervalo de tiempo de 20 días, en comparación a esta investigación que se trabajó durante 12 días, y se cuantificaron resultados considerables, por lo que se recalca que el tiempo es una variable muy importante a la hora de llevar a

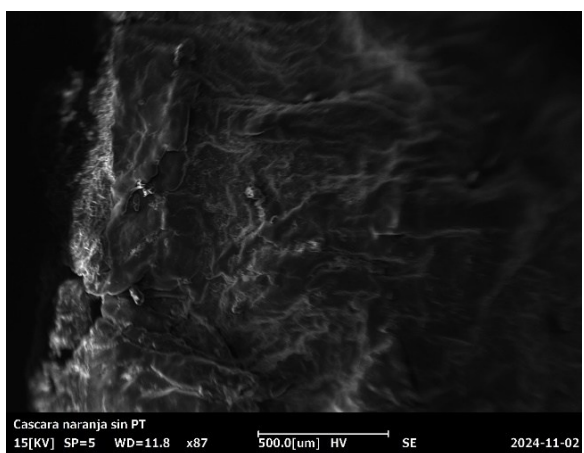
a)



b)



c)



d)

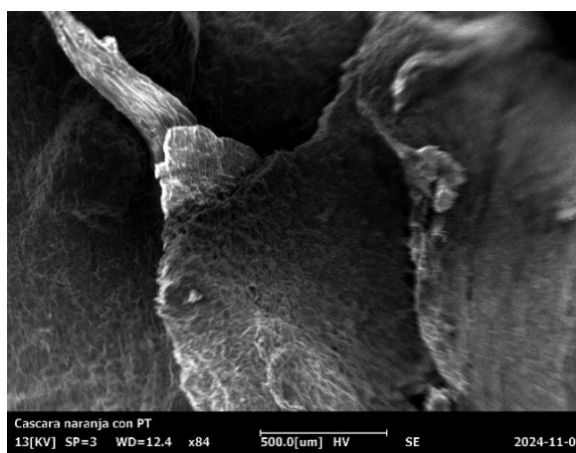


Figura 1. a) Cáscara de café sin pretratamiento, b) Cáscara de café con pretratamiento, c) Cáscara de naranja sin pretratamiento, d) Cáscara de naranja con pretratamiento.

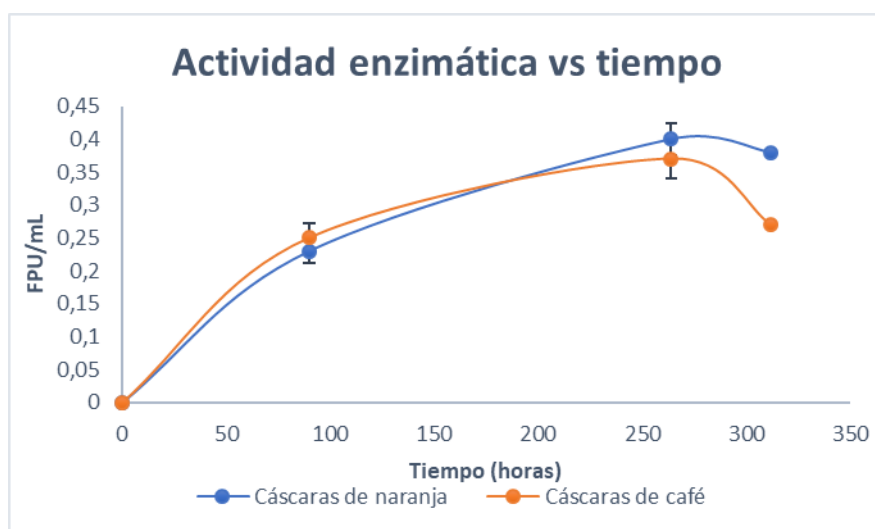


Figura 2. Actividad enzimática vs tiempo

Tabla 4. Comparación pretratamientos para pretratar biomasa lignocelulósica

Pretratamiento	% Rendimiento del proceso	Referencia bibliográfica
Bagazo de caña panelera y hojarasca mezclados en proporción de 90:10 pretratados con peróxido de hidrógeno alcalino, 40 min a temperatura de 25°C, pH 11,5.	61,67%	(Suárez, 2017)
Tallos de yuca pretratados al 1% p/v, 5% de H ₂ O ₂ y a un tamaño de partícula de 0,6 mm, hojas al 5% de H ₂ O ₂ y 0,6mm de tamaño de partícula.	Hojas 8,52%, tallos 13%	(Niño <i>et al.</i> , 2013)
Hojarasca de residuos de poda reduciendo el tamaño de partícula de biomasa, y aplicando un pretratamiento en condiciones de 50:50 v/v agua/ácido acético, a temperatura de 70°C, tiempo de 90 minutos.	80%	(Kildegaard <i>et al.</i> , 2021)
Cascarilla de arroz pretratada con ácido y álcali, mezclando el material seco con una solución de ácido sulfúrico diluido y álcali al 10% p/v, en una relación sólido-líquido de 1:10.	46,7%	(Jaramillo <i>et al.</i> , 2017)
Bagacillo de caña, y polvillo de fique, pretratado con bisulfito de sodio comercial al 4% p/p, se operó en relación sólido-líquido del 6% p/v en un sistema de digestión en paralelo	32,26% en bagacillo de caña, y 62,72% en polvillo de fique	(Pantoja-Matta <i>et al.</i> , 2015)
Cáscaras pretratadas con ácido acético y peróxido de hidrógeno en autoclave durante 1 hora.	Cáscaras de naranja 36% Cáscaras de café 41%	(Este trabajo)

cabo un proceso, ya que mayor tiempo puede implicar mayor actividad enzimática, pero se pueden elevar costos de producción a la hora de pretender industrializar el proceso. En la investigación de (Cardona 2023), se observa que los resultados que presentaron son menores a los de este trabajo, en su procedimiento con medios no convencionales obteniendo 0,130 FPU/mL de actividad de celulasas a partir de residuos de la producción de flores y papa, lo anterior permite afirmar que el proceso de fermentación sumergido para producción a

partir de cáscaras de naranja y de café es promisorio, si se desea continuar en la investigación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Análisis cáscaras de naranja

Los resultados de la prueba de múltiples rangos para las cáscaras de naranja son los siguientes.

En el caso de la prueba de múltiples rangos de Fischer se observa que existen diferencias significativas en todos los tiempos excepto de las 264 a 312 horas, demostrando esta significancia con un **valor -p** de 0,0010 intra grupal como se identificó en el análisis de varianza.

En el caso de las cáscaras de naranja se observa que existe diferencias significativas en las medias de todos los tiempos, excepto de 264 a 312 horas. Del tiempo 0 a 90 horas va en aumento el promedio de la actividad enzimática de la celulasa, el tiempo donde el promedio presentó el mayor aumento de la actividad enzimática es a las 264 horas, disminuyendo a las 312 horas.

Análisis para cáscaras de café

Los resultados de los análisis de la cáscara de café son los siguientes.

Tabla 5. Pruebas de Múltiple Rangos para FPU/mL por Tiempo hora.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 90	*	-0,225	0,0675099
0 - 264	*	-0,395	0,0675099
0 - 312	*	-0,38	0,0675099
90 - 264	*	-0,17	0,0551216
90 - 312	*	-0,155	0,0551216
264 - 312		0,015	0,0551216

Método: 95,0 porcentaje LSD

* indica una diferencia significativa.

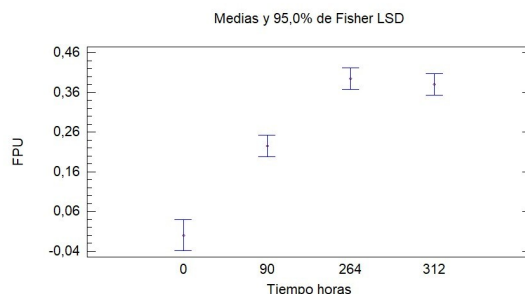


Figura 3. Actividad enzimática FPU/mL vs tiempo para cáscaras de naranja.

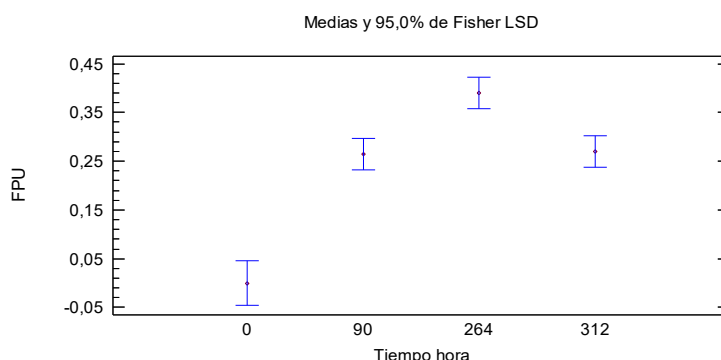


Figura 4. Actividad enzimática FPU/ml vs tiempo para cáscaras de café.

Tabla 6. Pruebas de Múltiple Rangos para FPU/mL por Tiempo hora.
Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 90	*	-0,265	0,0795612
0 - 264	*	-0,39	0,0795612
0 - 312	*	-0,27	0,0795612
90 - 264	*	-0,125	0,0649615
90 - 312		-0,005	0,0649615
264 - 312	*	0,12	0,0649615

* indica una diferencia significativa.

En el caso de la prueba de múltiples rangos para la cáscara de café se observa que hay diferencias significativas en todos los tiempos excepto en los tiempos de 90 a 312 horas, la significancia intra grupal se demuestra con un **valor- p** de 0,0023 como se identificó en el análisis de la varianza.

En análisis de la figura 4, se observa que el aumento del promedio de la actividad enzimática se da mayoritariamente desde el tiempo 0 a 90 horas, seguidamente el mayor

resultado de actividad enzimática se reporta a las 264 horas, descendiendo significativamente a las 312 horas.

CONCLUSIONES

En base a los resultados que se obtuvieron en el trabajo se puede concluir, que el pretratamiento propuesto para este proyecto removi6 componentes de las biomasas, sin embargo puede ser interesante seguirlo manejando en futuros ensayos, si se mejoran las condiciones de operación, también se puede afirmar que la utilización de cáscaras de naranja y café son opciones llamativas para producir extractos enzimáticos, ya que cabe destacarse que la opcion de producir enzimas a partir de estos residuos, conllevaría a grandes impactos positivos a nivel ambiental y económico.

AGRADECIMIENTOS

Se expresan agradecimientos en este trabajo al Ingeniero Fredy Camperos y a la Ingeniera Claudia Yohana Lizcano quienes forma parte del equipo de Biotecnología, Sena, Cúcuta, Norte de Santander, por el apoyo en la realización de parte de este trabajo, al ceder el espacio para utilizar el microscopio electrónico de barrido SEM, para análisis de las biomasas utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adney, B y Baker, J. NREL (2008). Medición de la actividad de celulasas: procedimiento analítico de laboratorio (LAP). <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42628.pdf>.
- Alvarado, T., y Hernández, A. (2018). Revisión de alternativas sostenibles para el aprovechamiento del orujo de naranja. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 5(2), 9-32. doi: <http://dx.doi.org/10.23850/24220582.1393>.
- Arellano, J., Ilich, S., Salazar, M., Rodríguez, Torres, P., Alarcón, W. (2015). Producción de pectinasas a partir de *Bacillus spp* a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono. *REBIOL. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*. 35(1), 62-69. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbiol/article/view/877/806>.
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., Verma, P. (2021). Current perspective on production and applications of microbial cellulases: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 1-34. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>.
- Campuzano, S., Urquijo, L., Valderrama, J. (2017). Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *Rhizoctonia solani*. *NOVA*. 15(28), 45-55. <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/568/938>.
- Cardona, S. (2023). Evaluación medios de cultivo no convencionales empleando residuos del sector floricultor y papicultor para la producción de enzimas con potencial ambiental e industrial a partir de hongos nativos del Oriente Antioqueño. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia, p 10. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/33900/1/SotoJuliana_2023_Evaluaci%cc3%b3nMediosHongos.pdf.
- Escudero, J. (2022). Estudio del potencial biotecnológico de actinobacterias de cuatro ciénegas Coahuila con actividad celulolítica. México: Universidad Autónoma de Nuevo León, p-53. <http://eprints.uanl.mx/23854/1/1080328528b.pdf>.
- Janke, L., Weinrich, S., Leite, A., Filippi, K., Terzariol, F., Nikolausz, M., Nelles, M., Stinner, W. (2016). "Improving anaerobic digestion of sugarcane straw for methane production: Combined benefits of mechanical and sodium hydroxide pretreatment for process designing". *Energy Conversion and Management*. 141, 378-389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.083>.
- Jaramillo, D., Morales, P., Quintero, J. (2017). Evaluación de pretratamientos químicos sobre materiales lignocelulósicos. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 25 (4), 733-743. <https://www.scielo.cl/pdf/ingeniare/v25n4/0718-3305-ingeniare-25-04-00733.pdf>.
- Khatiwada, P., Ahmed, J., Sohag, M., Islam, K., Azad, A. (2016). Isolation, Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Isolates from Municipal Solid Wastes and Rice Straw Wastes. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 6(4), 1-5. DOI: 10.4172/2155-9821.1000280.
- Kildegaard, G., Balbi, M., Salierno, G., De Blasio, C., Galvagno, M, Cassanello, M. (2021). Deslignificación de residuos forestales urbanos optimizada por diseño de experimento (Póster). Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. https://www.researchgate.net/publication/360626722_Deslignificacion_de_residuos_forestales_urbanos_optimizada_por_diseno_de_experimento#fullTextFileContent.
- Kruyeniski, J. (2017). Influencia del pretratamiento de residuos foresto industriales sobre la producción de bioetanol. Misiones, Argentina: Universidad Nacional de Misiones, p 45-49. https://rid.unam.edu.ar/bitstream/handle/20.500.12219/2388/KRUYENISKI%20Julia_2017_%20Influencia%20del%20pretratamiento%20de%20residuos%20forestoidustriales.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Liu, Ch., Xiao, L., Jiang, J., Wang, W., Gu, F., Song, D., Yi, Z., Jin, Y., Li, L. (2013). Food and Energy Security. 2 (1), 12-19. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/fes3.19>.
- Mueses, R y Romo, J. (2018). Utilización de celulasas obtenidas por fermentación en estado sólido de *Pleurotus*. Nariño, Colombia: Universidad de Nariño, p 8-9. <https://sired.udenar.edu.co/8219/1/92592.pdf>.
- Muñoz, L., Bulla, E., Sanabria, I. (2022). Estudio del Impacto Ambiental y Propuesta de un Plan de Manejo de Residuos Generado por las Cáscara de Naranja Desechadas por los Puestos de Bebida que se Encuentran los Domingos en la Jornada de Ciclovía en Usaquén. Bogotá, Colombia. Universidad EAN, p 5. <https://repository.universidadean.edu.co/items/86527006-8b0a-4edc-b7b7-1b7827063b57>.
- Niño, L., Acosta, A., Gelves, R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*). *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia N*, 69 (1), 317-326. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302013000400025.
- Ospina, N. (2020). Optimización de la producción de celulasa a partir de *Fusarium sp*. Medellín, Colombia. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Minas, p-34. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/81428/1107036049.2020.pdf?sequence=5>.

- Pangsri, P., Wuttiornpun, T., Songserm, W. (2021). Mannanase and Cellulase Enzyme Production from the Agricultural Wastes by the *Bacillus subtilis* P2-5 Strain. *Applied Science and Engineering Progress*. 14 (3), 425-434. DOI: 10.14416/j.asep.2020.05.002.
- Pantoja-matta, A., Cuatin-inguilán, M., Muñoz, D (2015). Efecto del pretratamiento químico y enzimático en la deslignificación de biomasa agroindustrial típica del cauca. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13 (1), 45-53. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biologia/article/view/371/555>.
- Peñaranda, L., Montenegro, S., Giraldo, P. (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 8 (2), 141-150. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/2040/2293>.
- Puente-Urbina, A. (2022). Caracterización de biomasa lignocelulósicas y su procesamiento térmico: estado y oportunidades en el Instituto Tecnológico de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. 35(7), 119-128. <https://doi.org/10.18845/tm.v35i7.6343>.
- Ramírez, S e Isaza, M. (2019). Actividad celulolítica de hongos aislados del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. *MICRO-CIENCIA, Investigación, Desarrollo e Innovación*. 8, 12-19.
- Ralph, J., Lapierre, C., Boerjan, W. (2019). "Lignin structure and its engineering," *Current Opinion in Biotechnology*. 56, 240-249. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>.
- Rodríguez, N. Informe anual de actividades 2006-2007. Chinchiná (Colombia), Cenicafe. *Disciplina de Calidad y Manejo Ambiental*, 2007. <https://publicaciones.cenicafe.org/index.php/infaanual/article/view/686/856>.
- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. D. J. Wolfe., NREL (2008). Determinación de sólidos totales en biomasa y sólidos disueltos totales en muestras de procesos líquidos: procedimiento analítico de laboratorio (LAP). <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42621.pdf>.
- Sinjaroonsak, Santat., Chaiyasong, T., Kittikun A. (2020). Optimization of Cellulase and Xylanase Productions by *Streptomyces thermocoprophilus* TC13W Using Low Cost Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch. *Waste and Biomass Valorization*. 11, p. 3925-3936. https://www.researchgate.net/publication/333552351_Optimization_of_Cellulase_and_Xylanase_Productions_by_Streptomyces_thermocoprophilus_TC13W_Using_Low_Cost_Pretreated_Oil_Palm_Empty_Fruit_Bunch.
- Sosa, M. (2019). Producción de celulasas de *Aspergillus niger* ITV-02. Veracruz, México: Instituto Tecnológico de Veracruz, p 5. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/2605>.
- Suárez, S. (2017). Evaluación del desempeño del pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre mezclas de biomasa lignocelulósicas (bagazo de caña panelera y hojarasca). Bucaramanga, Colombia: Universidad Santo Tomás, p -10. <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/10461/SoleidySuarez-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Torres, F., Contreras, M., Molina, E. (2012). Evaluación del rendimiento de la hidrólisis enzimática de bagazo, con pretratamiento alcalino. *Ingeniería. Revista de la Universidad de Costa Rica*, 22(1), 29-44. <https://www.redalyc.org/pdf/441/44170527003.pdf>.
- Tórtora, M., Nuñez, M., Fernández de Ulivarri, J., Leggio -Neme, F., Romero, E., Digonzelli, P. (2023). Descomposición del residuo de cosecha de la caña de azúcar por una cepa fúngica autóctona de *Trichocladium pyriforme*. *Cultivos Tropicales*. 44 (1), 1-7. <https://cu-id.com/2050/v44n1e04>.

Análisis *In Silico* de la molécula OmcZ presente en los Nanocables Proteicos Conductores de Electricidad en *Geobacter sulfurreducens*

In Silico Analysis of the OmcZ molecule present in Electrically Conducting Protein Nanowires in *Geobacter sulfurreducens*

Laura Andrea Acero Páez*, Duverney Gaviria Arias**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.112409

RESUMEN

Geobacter sulfurreducens es una bacteria anaerobia y mesófila que utiliza ácidos grasos, alcoholes y compuestos monoaromáticos como sustratos oxidativos, y óxidos de hierro como aceptor de electrones. Se ha demostrado que esta bacteria es eficiente en la generación de electricidad y desempeña un papel importante en el ciclo del carbono y la biorremediación. Se descubrió que este microorganismo produce y transfiere electrones a través de nanocables proteínicos altamente conductores llamados pili; estos pili actúan como conductores metálicos, permitiendo que los microorganismos intercambien electrones con el medio extracelular.

El artículo se centra en el análisis del gen y producto génico de una proteína llamada OmcZ, que desempeña un papel crucial en la transferencia de electrones entre *G. sulfurreducens* a los electrodos.

En este estudio, se llevaron a cabo varios pasos para investigar las secuencias de la proteína OmcZ en el género *Geobacter*. Primero, se realizó una búsqueda en UniProt para obtener la secuencia del OmcZ de *G. sulfurreducens*. Luego, se efectuaron alineamientos de secuencias con el programa BLASTp para identificar microorganismos ortólogos en el NCBI. Se obtuvieron secuencias de 14 especies de *Geobacter*, las cuales se alinearon múltiples con el software MEGA11. Se construyó un árbol filogenético utilizando MEGA11 y se realizó una prueba de reloj molecular de Tajima. Además, se llevaron a cabo alineamientos y caracterizaciones de la secuencia OmcZ en *G. sulfurreducens*, incluyendo el análisis de su genoma y la caracterización fisicoquímica de la proteína. Se usó el software RasMol para realizar predicciones y modelamientos de la proteína.

El estudio se centró en el alineamiento de las secuencias de la proteína OmcZ en diferentes especies de *Geobacter* spp, ya que descubrió que los filamentos conductores de electricidad están compuestos principalmente por OmcZ. Se encontró un nivel bajo de mutaciones y algunas deleciones en las secuencias analizadas. Se identificaron posibles dominios conservados y se encontraron aminoácidos altamente conservados en la mayoría de las secuencias. El análisis filogenético reveló dos clados principales y mostró la relación entre las especies de *Geobacter*. El reloj molecular indicó que la secuencia de la proteína OmcZ no se comporta estrictamente como un reloj molecular. Se caracterizó el genoma de *G. sulfurreducens* y se identificó la región específica que codifica la proteína OmcZ. Se realizó una caracterización fisicoquímica de la proteína y se encontró que era estable y contenía grupos hemo. En general, este estudio pro-

* Microbióloga. Universidad Libre de Colombia. Calle 134 # 59A – 81, Bogotá, Colombia. lauritaandreaaceropaez@gmail.com

** Biólogo. Mas. Biología molecular y Biotecnología. Universidad Libre de Colombia Seccional Pereira. Belmonte Avenida Las Américas Carrera 28 No. 96-102, Pereira, Colombia. duverney.gaviria@unilibre.edu.co

porciona una comprensión de los nanocables proteínicos y su importancia en el metabolismo de *Geobacter* spp., con implicaciones en tecnologías electroquímicas y biorremediación.

Palabras claves: bioinformática, Citocromo C, *Geobacter*, Electricidad, Nanocables.

ABSTRACT

Geobacter sulfurreducens is an anaerobic, mesophilic bacterium that uses fatty acids, alcohols and monoaromatic compounds as oxidative substrates, and iron oxides as electron acceptors. This bacterium has been shown to be efficient in electricity generation and plays an important role in carbon cycling and bioremediation. It was found that this microorganism produces and transfers electrons through highly conductive protein nanowires called pili; these pili act as metallic conductors, allowing the microorganisms to exchange electrons with the extracellular medium.

The article focuses on the analysis of the gene and gene product of a protein called OmcZ, which plays a crucial role in electron transfer between *G. sulfurreducens* to the pili.

In this study, several steps were carried out to investigate the OmcZ protein sequences in the genus *Geobacter*. First, a UniProt search was performed to obtain the OmcZ sequence of *G. sulfurreducens*. Then, sequence alignments were performed with the BLASTp program to identify orthologous microorganisms in NCBI. Sequences of 14 *Geobacter* species were obtained and multiple alignments were performed with MEGA11 software. A phylogenetic tree was constructed using MEGA11 and a Tajima molecular clock test was performed. In addition, OmcZ sequence alignments and characterizations were performed on *G. sulfurreducens*, including genome analysis and physicochemical characterization of the protein. RasMol software was used to perform protein predictions and modeling.

The study focused on the alignment of OmcZ protein sequences in different species of *Geobacter* spp, as it found that the electrically conductive filaments are mainly composed of OmcZ. A low level of mutations and some deletions were found in the analyzed sequences. Possible conserved domains were identified and highly conserved amino acids were found in most of the sequences. Phylogenetic analysis revealed two major clades and showed the relationship between *Geobacter* species. The molecular clock indicated that the OmcZ protein sequence does not behave strictly as a molecular clock. The genome of *G. sulfurreducens* was characterized and the specific region encoding the OmcZ protein was identified. A physicochemical characterization of the protein was performed and found to be stable and contain heme groups. Overall, this study provides insight into protein nanowires and their importance in the metabolism of *Geobacter* spp. with implications for electrochemical technologies and bioremediation.

Keywords: bioinformatics, Cytochrome C, *Geobacter*, Electricity, Nanowires,

Recibido: enero 17 de 2024 **Aprobado:** marzo 10 de 2025

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el modelo bacteriano de un microorganismo electrogénico corresponde a la bacteria Gram negativa, mesófila y anaerobia *Geobacter sulfurreducens* (NCBI, 1995). Este es el primer microorganismo del que se tiene constancia que produce grandes cantidades de electricidad, reconociéndose como el más eficaz en la generación de tal reacción; ya que este es capaz de utilizar como sustrato oxidativo, ácidos grasos, alcoholes y compuestos monoaromáticos y usa óxidos de hierro como aceptor de electrones; adicionalmente, se ha identificado que esta reacción es de gran importancia en el ciclo del carbono y ha sido utilizada para procesos de biorremediación (Andrés *et al.*, 2017).

G. sulfurreducens es una de las bacterias productoras de electricidad más importantes, y es la especie exoelectrogénica más comúnmente identificadas en los modelos de las Pilas de Combustible Microbiana (PCM) las cuales son inoculadas con muestras microbianas diversas y concentradas. En este tipo de estructuras se utilizan medios con un pH casi neutro, agua dulce ligeramente salina y temperaturas moderadas. Cuando el inóculo procede de sedimentos o de aguas residuales y el reactor se alimenta con acetato en un medio tamponado con bicarbonato o con fosfato en las condiciones mencionadas, suele predominar *G. sulfurreducens*, en el modelo. Este microorganismo se distingue por su capacidad para reducir oxidantes insolubles incluidos minerales, sin depender aparentemente de mediadores solubles de trans-

ferencia extracelular de electrones (TEE) (Holmes *et al.*, 2004; Logan *et al.*, 2019).

Se descubrió que este microorganismo produce y transfiere electrones a través de nanocables proteicos altamente conductores llamados pili. Estos pili actúan como conductores metálicos, permitiendo que los microorganismos intercambien con el medio extracelular (Gu, Y. *et al.*, 2023). *Geobacter* spp. produce y transfiere electrones a través de pili altamente conductores, permitiendo una transferencia eficiente de electrones al ánodo. La mayoría de los otros microorganismos exoelectrogénicos deben hacer contacto directo con el ánodo o producir y liberar lanzaderas de electrones que normalmente no alcanzan concentraciones suficientes de electrones en el ánodo (Redondo, 2018). Basándose en la evidencia científica recopilada, se ha concluido que la conductividad de las biopelículas se debe a la presencia de una red altamente concentrada de pili que presenta conductividad casi metálica. Estos pili son esencialmente nanocables, es decir, apéndices o filamentos que existen fuera de las células microbianas y que son capaces de conducir la electricidad de manera similar a cómo lo hacen los conductores metálicos. En consecuencia, los microorganismos pueden intercambiar electrones con el medio extracelular a través de estos pili (Malvankar & Lovley, 2014; Fu *et al.*, 2020).

Distinguir a *G. sulfurreducens* de otras especies no siempre es posible basándose solamente en las secuencias del gen del ARNr 16S, por ejemplo, los marcadores 16S ARNr de *G. anodireducens* y *G. sulfurreducens* son idénticos al 100%, sin embargo, se ha podido determinar que la primera puede predominar en las PCM alimentadas con acetato debido a su mayor tolerancia a salinidades cercanas a las del agua de mar; adicionalmente, se ha identificado que *G. anodireducens* no puede utilizar fumarato como aceptor de electrones (Richter *et al.*, 2008).

Actualmente, la transferencia extracelular de electrones (TEE) tiene lugar a través de dos mecanismos distintos: la transferencia directa de electrones (TDE) y la transferencia indirecta de electrones (TIE). La TDE involucra a microorganismos que establecen contacto directo con los aceptores de electrones insolubles, como electrodos u otros sustratos. Esto se hace a través de las proteínas que decoran la superficie celular, así como apéndices celulares como los pili o nanocables. Algunos de estos apéndices también están cubiertos de proteínas como los citocromos C. Por el contrario, en la TIE esta se basa en la capacidad de los microorganismos para emplear compuestos activos redox solubles como transportadores de electrones (Costa *et al.*, 2018). Estos transportadores median la transferencia de electrones entre las pro-

teínas conductoras expuestas en la superficie celular y los aceptores de electrones insolubles como los electrodos, todos estos elementos a su vez hacen parte de las tecnologías electroquímicas microbianas (Richardson *et al.*, 2012; Pirbadian *et al.*, 2014; Santoro *et al.*, 2017).

G. sulfurreducens ha sido objeto de amplios estudios, estos cuentan con la asombrosa cantidad de 111 genes que codifican los citocromos C, muchos de los cuales portan múltiples grupos hemo que actúan como transportadores de electrones (Santoro *et al.*, 2017). Los pili conductores de electricidad (E-pili) están formados por la proteína PilA truncada, que se considera que ha evolucionado a partir de la pilina completa por fusión génica bajo selección evolutiva positiva (Liu *et al.*, 2020). El flujo de electrones comienza desde la proteína de la membrana interna MacA, continúa hacia la proteína periplásmica PpcA antes de transferirse finalmente a los citocromos de la membrana externa en la superficie celular (Omc) (Lovley, 2022); los más notables entre estos son: OmcS, OmcB y OmcZ. De estos, OmcZ se destaca por ser responsable de la transferencia de electrones entre la biopelícula de *G. sulfurreducens* al electrodo presente en la PCM, lo que finalmente genera altos niveles de corriente, donde el último intercambio de electrones, entre la célula y el electrodo, lo producen las proteínas de membrana del citocromo C (Methé *et al.*, 2003; Sunil A. Patil, Cecilia Hägerhäll, 2014; Santos *et al.*, 2015; Lovley, 2017).

La célula de *G. sulfurreducens* expresa 2 citocromos C multihemo, OmcS y OmcZ, los cuales se ensamblan en filamentos conductores, se ha identificado mediante microscopía de fuerza atómica que casi todos los nanocables que emanan de las células de *G. sulfurreducens* son e-pili, incluso en células que producían pequeñas cantidades de OmcS y OmcZ. Además, estas proteínas homólogas son raras en el mundo microbiano, y muchos de los microorganismos que producen nanocables carecen de citocromos en la superficie externa, lo que sugiere que los filamentos basados en citocromos son de alta importancia (Lovley, 2022). Los apéndices extracelulares conductores de la cepa *G. sulfurreducens* son principalmente filamentos OmcZ, estos son filamentos polimerizados con características estructurales únicas que también proporcionan una base molecular para comprender el transporte electrónico de largo alcance en las proteínas (Wang *et al.*, 2019).

Las biopelículas generadas por *G. sulfurreducens* contienen una red conductora de mediadores de TEE unidos en la que OmcZ (citocromo C de tipo Z de membrana externa) participa en la TEE homogénea (a través de la masa del biofilm) mientras que OmcB media en la TEE

heterogénea (a través de la interacción biopelícula/electrodo). En el caso de los pili de tipo IV son importantes ambas reacciones tanto la mediada por los OmcZ como la facilitada por OmcB. Los OmcS desempeñan un papel secundario en la TEE homogénea, sin embargo, desempeñan un papel valioso en la transferencia extracelular de electrones, ya que puede transferir electrones a óxidos de Fe_{3+} insolubles, así como a otros aceptores de electrones extracelulares, incluidos el óxido de Mn_{4+} y las sustancias húmicas (Wang *et al.*, 2019). En el caso de OmcE, se ha determinado que este es fundamental en la reducción del óxido de Fe (III), y que no interviene en ninguna de las reacciones previamente descritas (Richter *et al.*, 2009; Gu, Y., Srikanth, V., Malvankar, N.S.; Lovley & Walker, 2019; Samatey, 2021).

Se ha identificado que para este tipo de microorganismos la superficie celular tiene 2 estructuras para los citocromos de membrana externa las cuales presentan las características descritas en la Tabla 1, sobre la estructura, simetría, estequiometría, peso, número de átomos y residuos de los citocromos 8D9M y 7LQ5. Estos datos son importantes para comprender la organización y las características de estas proteínas en el contexto de su función biológica (RCSB PDB, 2021, 2022; Lovley, 2022; Wang *et al.*, 2022).

Se ha determinado que el género de proteobacterias está compuesto por 13 especies y al realizar la comparación entre cada una de estas, en términos de producción de electricidad se identificó que las más representativas son *G. sulfurreducens* y *G. metallireducens*. Estas observaciones orientan a que existe diversidad en la estructura genómica del citocromo OmcZ y que debido a ello el resto de las especies no producen una generación de electricidad tan alta.

Por estas razones el objetivo de este artículo es efectuar una comparación *in silico* entre las secuencias de los genes que codifican OmcZ en las diferentes especies de *Geobacter* y caracterizar este citocromo en el microorganismo electrogénico *G. sulfurreducens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de las secuencias de OmcZ en el género *Geobacter*

Se efectuó una búsqueda en la plataforma UniProt (<https://www.uniprot.org/>) para identificar la secuencia de la proteína del OmcZ teniendo como organismo modelo el genoma de la bacteria *G. sulfurreducens*, esta secuencia se recuperó en formato FASTA.

Alineamiento por pares y múltiple de las secuencias de *Geobacter* spp.

Se ejecuto un alineamiento de la secuencia previamente obtenida con ayuda del Software Standard Protein BLAST (BLASTp) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) para detectar los microorganismos ortólogos disponibles en el NCBI que presentan una homología con la secuencia de la proteína OmcZ, de allí se extrajeron las secuencias de 14 especies correspondientes al género *Geobacter* y a partir de estos se realizó un alineamiento múltiple con el programa bioinformático Molecular Evolutionary Genetics Analysis 11 (MEGA 11) (Koichiro Tamura, Glen Stecher, 2021) con los valores predeterminados de la alineación de proteína por codones seleccionados mediante el algoritmo Clustal W presente en MEGA 11.

Análisis filogenético

Para ver la estructura de los genes ortólogos y la orientación de los organismos seleccionados se usaron las secuencias de los ortólogos del alineamiento previamente obtenido y se construyó el árbol filogenético utilizando el programa MEGA 11. La sesión de alineamiento se guardó y se utilizó para construir el árbol filogenético de máxima verosimilitud con 100 replicaciones del método de Bootstrap y utilizando la matriz de sustituciones de aminoácidos basada en el método Jones-Taylor-Thornton (JTT). Se realizó una tabla de distancia o de estimaciones de la divergencia evolutiva entre las 14 secuencias de *Geobacter* spp. con ayuda del programa MEGA 11, utilizando la opción para la estimación de distancia "Computer overwall mean distance" el cual presentaba las siguientes características: con alcance pares de taxones, sin ningún método de estimación de la varianza, modelo de sustitución tipo aminoácidos con distancia P, tasas entre centros uniformes, patrón entre linajes homólogo y el tratamiento de los espacios de los datos que faltan fue por detección por pares.

Prueba de reloj molecular de Tajima

Se elaboró la prueba del reloj molecular de Tajima con ayuda del programa MEGA 11; ya que las 14 secuencias recuperadas representan microorganismos con secuencias ortólogas con la secuencia inicial del OmcZ, a partir de una búsqueda del alineamiento más divergente a los antes obtenidos con la secuencia previamente obtenida de OmcZ; estas secuencias fueron analizadas con la aplicación de Standard Protein en la plataforma BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en la cual se modificaron los parámetros de búsqueda con el fin de obtener una palabra con un tamaño de 2 y el parámetro "Expect threshold" en 0,01, detectando nuevos microorganismos que presentaban homología con la secuencia de la proteína

OmcZ. La secuencia “MAG: IPT/TIG domain-containing protein [Methanosarcinales archaeon]”, la cual presentaba una puntuación de 199, el valor E 8 E-55 y un porcentaje de identidad de 35,17%; se adicionó a las secuencias de las 14 especies correspondientes al género *Geobacter* y se realizó un alineamiento múltiple en MEGA 11 con los valores predeterminados del programa.

A partir del alineamiento se creó el árbol filogenético con el método estadístico de máxima verosimilitud, 100 réplica de Bootstrap para la prueba filogenética, usando todos los sitios para agregar espacios y el método de sustitución Jons-Taylor-Thornton (JTT); con el árbol filogenético obtenido se desarrolló el MI Clock Test en el cual se usaron los siguientes parámetros: Modelo de sustitución de aminoácidos bajo el método de sustitución JTT, utilizando todos los sitios para agregar espacios, con el método estadístico máxima verosimilitud y con relojes moleculares globales; de allí se separaron 2 clados uno de los taxones en Outgroup donde se encontraba la secuencia de *Methanosarcinales archaeon* y en el otro las 14 secuencias de *Geobacter* spp. en un grupo denominado taxones no agrupados.

Alineamiento múltiple de las secuencias de la proteína OmcZ en *G. sulfurreducens*

Se seleccionaron las 3 secuencias de *G. sulfurreducens* de las subespecies KN400 y PCA; estas proteínas se alinearon con los valores predeterminados utilizando el algoritmo ClustalW en MEGA 11.

Caracterización del gen donde se encuentra el OmcZ en *G. sulfurreducens*

Se exploró el genoma completo de *G. sulfurreducens* en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el código GenBank AP017912.1, buscando en la sección de características: localización y calificación, rastreando el producto “Citocromo OmcZ multihemo de tipo C” identificado con el código GenBank BBA70571.1, el cual tiene el registro del gen completo, el locus, la región de codificación con su codón de inicio, tabla de traducción y el número de identificación de la proteína.

Caracterización fisicoquímica y estructural de la proteína OmcZ en *G. sulfurreducens*

El servidor ProtParam de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) se usó para predecir el peso molecular, punto isoelectrico (pI), índice de inestabilidad, índice alifático, media de hidropatía (GRAVY) y la composición de aminoácidos de la proteína OmcZ de *G. sulfurreducens*.

De igual manera, se realizó un análisis estructural de la molécula con la ayuda de programa bioinformático Ras-

Mol para representar, explorar las estructuras, características de la proteína y los aminoácidos que interactúan con el grupo hemo, los tetrapirroles y los átomos de hierro que los componen.

RESULTADOS

Secuencia de OmcZ en *Geobacter* spp

La secuencia proteica de la OmcZ pertenecientes a *G. sulfurreducens* se recuperaron de UniProt donde de estas secuencias se seleccionó en función de los parámetros generales de calidad de la herramienta UniProt y la secuencia recuperada fue la siguiente:

```
>trQ74BG5/Q74BG5_GEOSL_Cytochrome C OS=Geobacter sulfurreducens (strain ATCC 51573 / DSM 12127 / PCA)
OX=243231 GN=OmcZ PE=1 SV=1
MKKKVLIGASLAAVVLGAAMVGAAPPPVFNQFLGIYDTKFPNLTKADCLCHVSDTVLVQQHHALINTVTPP
ASCINTSGTVPTLATGCHVMVPDGGSGGFTQDFRNCNCHTQPHHTSPAAVAKDCKYCHGNFIDNPLDGHYIP
TYSASSVTMPSPGRSVTATDGNVVIVQGCEACHQAAPNAIDPKNTVVRPFNSQDTHHGTGTTDCNLCHNTSSNV
PIRQCEVCHGVNSLHNIQKDSNNAANLGTVPKPLEDLGWGHIGNNWDCQGHWSWFGNSSPYTNATVPAINGQ
SSYTVTAGKEAVLTIVGSSFFNVNPGDGVTTYQPTVALVSGTSLTTPFSVTESEIKVSVPALVEGVYELRTKAN
KVSNLAKLTVAARIASAATLATGKTLITGTGFGPAPSEYDAGIGVYAGTTQANVISWSDTKVVATSPDFATNG
YVTVKTINGPLSGKILAAPKKVKR
```

Alineamiento por pares y múltiple de las secuencias de *Geobacter* spp

El alineamiento de secuencias de la proteína OmcZ de los 14 microorganismos reportados en la base de datos pertenecientes al género; presentando una similitud entre las secuencias, brindando los siguientes datos: puntuación más alta de 964 y la más baja de 321, valor E entre 0 y 6 E-120, porcentaje de identidad entre 45% y 100% para la proteína en OmcZ de *Geobacter* spp. Este análisis reveló que hubo un nivel relativamente bajo de mutaciones, principalmente puntuales en la especie de *G. sulfurreducens* y en algunos microorganismos se presentaron inserciones y deleciones, que generaron un número de espacios varió entre 0% y 8% entre las 14 secuencias de especies analizadas.

En las 14 secuencias alineadas del género *Geobacter* se detectaron posibles dominios conservados, con puntajes de alineamiento mayores o iguales a 200, la secuencia denominada “Cadena A, Citocromo C [*Geobacter sulfurreducens* PCA]” es la que presentó mayor número de índoles desde 270 a más de 450, posiblemente los dominios no están presentes en la misma secuencia, pero sí en la posición aunque no sean similares a la serie pueden tener composiciones similares de la naturaleza, pero no en la función final que se desarrolla en el ORF.

Las secuencias de: IPT/TIG domain-containing protein [*Geobacter sulfurreducens*], IPT/TIG domain-containing protein [*Geobacter*] y IPT/TIG domain-containing protein [*Geobacter pickeringii*] presentan un número de espacios desde 1 hasta alrededor de 30, estos dominios se encuen-

tran en receptores de la superficie celular como Met y Ron, así como en factores de transcripción intracelulares donde participa en la unión al ADN, puede que por ello presentan una diferenciación antes las otras secuencias.

En el alineamiento brindado por ClustalW en MEGA 11 se realizó la búsqueda de homología y el alineamiento de secuencias múltiples de estas 14 secuencias de OmcZ y se reveló un pequeño tramo de región conservada entre cada uno de los alineamientos. También se observaron unos pocos aminoácidos altamente conservados en la mayoría de las secuencias el cual presentó que el 25,44 % de los residuos son 100 % idénticos entre las 14 secuencias analizadas. En la región alineada se encontraron 129 posiciones conservadas al 100% que comprende aminoácidos no polares como: alanina, leucina, glicina, prolina y valina; aminoácidos polares: asparagina y serina; aminoácidos ácidos como el glutámico y aspártico; aminoácidos básicos: arginina e histidina y aminoácidos aromáticos como la tirosina.

Análisis filogenético

Se construyó un árbol filogenético utilizando las 14 secuencias de proteínas OmcZ en *Geobacter* spp. mediante el software MEGA 11. Las secuencias de las proteínas OmcZ empleadas para la construcción del árbol filogenético se obtuvieron a partir de los resultados de BLASTp, que procedían de especies de *Geobacter* spp. Las ramas horizontales representaban linajes evolutivos que cambiaban con el tiempo.

Los análisis revelaron que las secuencias de aminoácidos crearon un árbol filogenético coherente y se distribuyeron en dos clados principales para las 14 especies evaluadas. El clado dominante (A) estaba formado por secuencias de aminoácidos en el que de la secuencia de *Geobacter* spp. es la inicial y de allí se derivan la cepa de *G. chapellei*, *G. benzoatilyticus*, *G. sulfurreducens* en conjunto con otras subespecies y se unificaron *G. soli* con *G. anodireducens*, lo que reveló la similitud a nivel de secuencia. En el clado B se unificaron a partir de la secuencia de *Geobacter* spp. AOG1 de allí se derivaron *G. pickeringii*, *G. hydrogenophilus*, *G. grbiciae* y se unificaron las subespecies de *G. metallireducens* GS-15 y RCH13.

En el árbol filogenético nueve de las ramas presentaron un alto soporte Bootstrap entre el 70% y el 100% considerándose más robustas y confiables para el análisis. Además, se observa que en el clado A la secuencia de *G. Sulfurreducens* PCA y *G. Sulfurreducens* KN400 formaban parientes hermanos (100% de apoyo para máxima parsimonia). Luego, la secuencia de *G. Sulfurreducens* cerró a estos grupos hermanos con un 100%; indicando que eran los parientes más cercanos entre todas

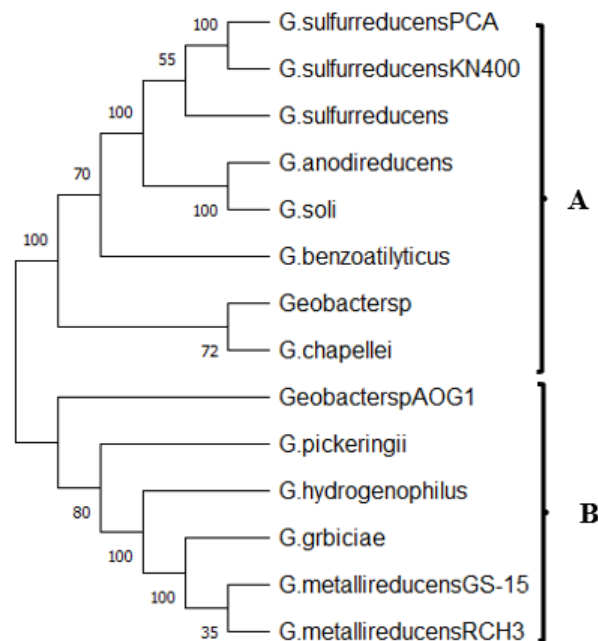


Figura 1. Árbol filogenético del alineamiento de las 14 secuencias de *Geobacter* spp. Fuente: MEGA11.

las 14 especies utilizadas para la reconstrucción filogenética (Figura 1).

El análisis evolutivo que se realizó en MEGA 11 para analizar la distancia demostró el número de diferencias de aminoácidos por sitio entre secuencias, este análisis incluyó 14 secuencias de aminoácidos, donde se eliminaron todas las posiciones ambiguas de cada par de secuencias, encontrando finalmente que en el conjunto de datos final había un total de 507 posiciones.

Prueba de reloj molecular de Tajima

Para realizar esta prueba se realizó un alineamiento de las 14 secuencias iniciales de la proteína OmcZ en *Geobacter* spp. junto con una secuencia denominada "MAG: IPT/TIG domain-containing protein [*Methanosarcinales archaeon*]" y a partir de estas secuencias se creó un árbol filogenético, en este se crearon 3 clados donde las dos iniciales pertenecían a las secuencias de *Geobacter* spp. y el último a *Methanosarcinales archaeon*, presentando una distancia filogenética amplia (Figura 2).

Los análisis evolutivos que se realizaron en MEGA 11 para la prueba del reloj molecular la hipótesis nula de igual ritmo evolutivo en todo el árbol se rechazó con un nivel de significación del 5% ($P=7,579 \text{ E-185}$); este análisis incluyó 15 secuencias de aminoácidos, donde el conjunto de datos final había un total de 507 posiciones; en donde el valor $\ln L$ con reloj fue de -10000.360 con 14 parámetros, mientras que la prueba sin reloj presentaba un valor de $\ln L$ -9546.263 con 27 parámetros, con estos resulta-

Tabla 1. Características estructurales de los citocromos identificados en RCSB – PDB con los códigos 8D9M y 7LQ5 (Koichiro Tamura, Glen Stecher, 2021; Wang et al., 2022).

Estructura de los citocromos	Proteína 8D9M	Proteína 7LQ5
Cadena	Única	Única
Simetría	Global helicoidal	Helicoidal - H
Estequiometría global	Homo 7-mer-A7	Homo 3-mer-A3
Peso total (kDa)	54,37	97,9
Número de átomos	2.281	6.843
Número de residuos modelados	258	774
Número de residuos depositados	473	774

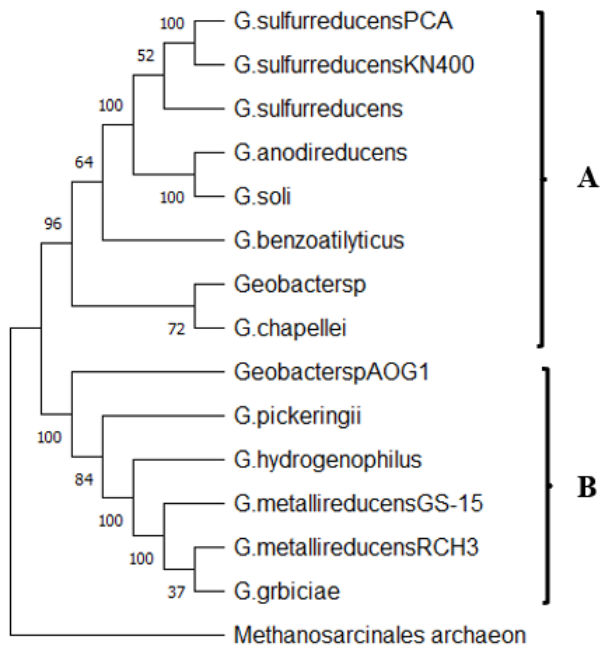


Figura 2. Árbol filogenético del alineamiento de las 14 secuencias de *Geobacter* spp. más la secuencia de *Methanosarcinales archaeon*. Fuente: MEGA11.

dos se pudo inferir que la sección del gen que contiene la proteína de OmcZ en *Geobacter* spp. no se comporta como reloj molecular, pero sí de manera similar a uno.

Análisis de las secuencias de *Geobacter sulfurreducens*
El alineamiento de las 3 secuencias de la proteína OmcZ en *G. sulfurreducens* contó con un total de 473 posiciones con similitud de secuencia (puntuación mínima de 953 – 964, valor E de 0, porcentaje de identidad entre 99,58 % y 100 %). Se reveló que las secuencias estaban muy conservadas a lo largo de la evolución, en donde el 91,3% de los residuos son 100% idénticos entre las 3 secuencias, adicionalmente hubo un nivel relativamente bajo de mutaciones entre estos.

Caracterización del gen donde se encuentra el OmcZ en *G. sulfurreducens*

En el NCBI se identificó que el ADN de *G. sulfurreducens* está integrado por 3.726.411 pb, con un contenido de G+C del 60,7% y no se encontraron plásmidos. El cromosoma contiene 2 operones de ARNr, 49 genes de ARNt y 3.327 secuencias codificadoras de proteínas (CDS) (Inoue et al., 2018). La región que codifica la proteína OmcZ en este microorganismo se encuentra en la región entre 2.240.813 y 2.242.234 en el locus “YM18_2051”, al traducir esta con el uso de la herramienta ORFider (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c#SG11>) y el uso del código genético 11 de los plásmidos de bacterias, arqueas y plantas; esta proteína generada se identifica en el NCBI como BBA70571.1 la cual consta de 473 aminoácidos (NCBI, 2018; NCBI, 2019).

Caracterización fisicoquímica y estructural de la proteína OmcZ en *G. sulfurreducens*

Para la caracterización fisicoquímica se evaluaron todas estas propiedades fisicoquímicas de la proteína OmcZ de *G. sulfurreducens* utilizando el servidor ExPASy ProtParam; identificando que esta proteína presenta un peso molecular de 49.378,83 Da, contiene un total de átomos de 6.884 y siendo la fórmula química la siguiente: $C_{2172}H_{3417}N_{599}O_{676}S_{20}$.

La proteína consta de 473 residuos de aminoácidos; el punto isoelectrónico teórico (pI) de esta proteína fue de 7,22, lo que sugiere que la proteína es neutra, esto debido a la presencia de igual número de residuos de aminoácidos cargados negativamente (ácido aspártico y glutámico) y de aminoácidos básicos (arginina, lisina) que fueron 29 para ambos. El índice de inestabilidad se calculó en más de 34,17, lo que clasificó a la OmcZ como una proteína estable. El índice alifático fue de 79,96, lo que puede considerarse un factor positivo para aumentar la termo

Tabla 2. Composición de aminoácidos de la proteína OmcZ de *G. sulfurreducens*. Fuente: RasMol.

Aminoácido	Cantidad de átomos	Porcentaje (%)	Aminoácido	Cantidad de átomos	Porcentaje (%)
Ala (A)	240	4,1	Lys (K)	189	3,2
Arg (R)	132	2,2	Met (M)	48	0,8
Asn (N)	528	9,0	Phe (F)	297	5,1
Asp (D)	360	6,1	Pro (P)	462	7,9
Cys (C)	288	4,9	Pyl (O)	0	0
Gln (Q)	297	5,1	Sec (U)	0	0
Glu (E)	108	1,8	Ser (S)	288	4,9
Gly (G)	252	4,3	Thr (T)	504	8,6
His (H)	510	8,7	Trp (W)	168	2,8
Ile (I)	288	4,9	Tyr (Y)	144	2,4
Leu (L)	288	4,9	Val (V)	420	7,2

estabilidad de la proteína. Además, el valor Grand Average of Hydropathy (GRAVY) resultó negativo (-0,028), lo que indica que esta proteína es apolar.

Los aminoácidos más abundantes en la proteína OmcZ de *G. sulfurreducens* son: asparagina (9,0%), histidina (8,7%), treonina (8,6%), prolina (7,9%), valina (7,2%) y serina (4,9%); representando una proporción significativa de la composición total de la proteína. La histidina es el segundo aminoácido que se encuentra en mayor proporción en la proteína 8,7%, ya que es importante en la formación de enlaces coordinados con iones metálicos. Por otra parte, esta proteína no contiene los aminoácidos pirrolisina ni selenocisteína (Tabla 2).

La base de datos “Protein Data Bank (PDB)” caracterizo la proteína identificada con el código “8D9M” denominada “Cryo-EM de los nanocables OmcZ de *G. sulfurreducens*”, e identifiqué las siguientes características en la cadena A la cual cuenta con 16 puntos donde hay una coordi-

nación metálica y se encuentran entre las posiciones 54 a las 276 y están directamente relacionadas con las histidinas pertenecientes a la secuencia, esta estructura presenta 7 enlaces covalentes entre las cisteínas y contiene un péptido cis entre la treonina y la prolina.

Según el programa RasMol la estructura de la proteína fue generada mediante crio-EM de nanocables OmcZ de *G. sulfurreducens* y identificó que está compuesta por 6 cadenas, 774 grupos funcionales con 21 hélices y 12 hebras; con un total de 6.843 átomos de los cuales 5.811 pertenecen a la proteína, 1.032 son átomos designados al grupo hemo, con 54 átomos de azufre y 24 átomos de hierro (Figura 3).

La molécula cuenta con 24 grupos hemo los cuales están compuestos por tetrapirroles enlazados los unos con los otros con un átomo de hierro coordinado a cada hemo. El grupo hemo es un tetrapirrol, también conocido como anillo porfirínico, que consiste en cuatro ani-

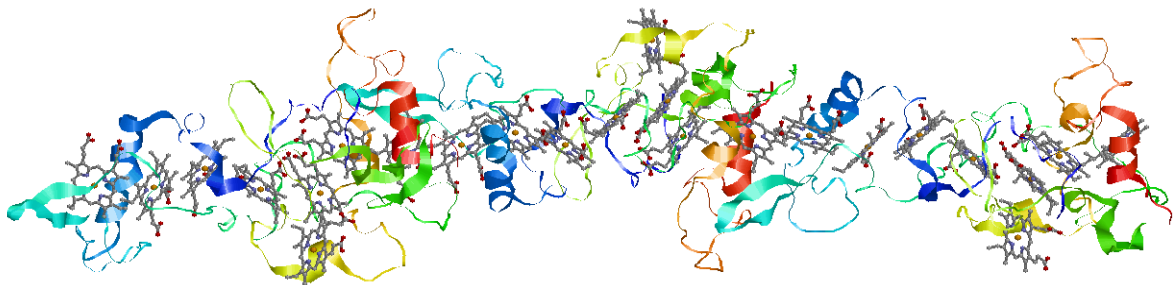


Figura 3. Visualización inicial de la proteína de la estructura crio-EM de nanocables OmcZ de *G. sulfurreducens*. Fuente: RasMol.

llos pirrólicos unidos por enlaces covalentes. En el centro del grupo hemo se encuentra un átomo del tetrapirrol actúa como un cofactor esencial para la función de la proteína, la presencia del átomo de hierro en el centro del grupo hemo permite que el citocromo C juegue un papel clave en las reacciones de transferencia de electrones en las células. El átomo de hierro puede alternar entre diferentes estados de oxidación (Fe_{2+} y Fe_{3+}) y facilitar la transferencia de electrones entre proteínas y complejos en la cadena respiratoria.

La histidina es un aminoácido que se encuentra en las proteínas y tiene la capacidad de interactuar con tetrapirroles y átomos de hierro en ciertas proteínas, como las hemoproteínas. La histidina, específicamente la histidina 18, es un residuo de aminoácido que interactúa con el átomo de hierro en el centro del grupo hemo, a través de uno de los átomos de nitrógeno de su grupo imidazol, forma un enlace coordinado con el átomo de hierro y estabiliza la unión del átomo de hierro en el grupo hemo. La interacción entre la histidina, el tetrapirrol y el átomo de hierro es crucial en muchas proteínas que contienen grupos hemo, como la hemoglobina y la mioglobina, ya que estas proteínas están involucradas en el transporte y almacenamiento de oxígeno en los tejidos.

En esta proteína se ha identificado que el hemo C se caracteriza por la presencia de dos enlaces tioéter covalentes formados entre las cadenas laterales cisteína y los grupos vinilo del hemo en las posiciones 2 y 4.

Las hélices de la proteína exhiben una característica de polaridad, lo que significa que están compuestas por una cara que contiene la mayoría de los aminoácidos polares con un 57,6% y la otra compuesta por un 42,38% de aminoácidos hidrofóbicos. La polaridad de las hélices puede estar relacionada con su función en la proteína. Las regiones polares pueden estar involucradas en interacciones con otras moléculas polares, como proteínas o ácidos nucleicos, mientras que las regiones hidrofóbicas pueden estar involucradas en interacciones con lípidos o en el núcleo hidrofóbico de la proteína y la interacción con el grupo hemo.

DISCUSIÓN

Análisis de la secuencia

Los resultados del análisis de las secuencias de OmcZ en *Geobacter* spp. indican que esta proteína está altamente conservada entre las diferentes especies del género. El alineamiento de las secuencias de OmcZ de *Geobacter* spp. reveló que el 25,44% de los residuos son 100% idénticos entre las 14 secuencias analizadas. Además, el alineamiento de las 3 secuencias de OmcZ

de *G. sulfurreducens* reveló que el 91,3% de los residuos son 100% idénticos.

Estos resultados sugieren que OmcZ es una proteína esencial para la función electrogénica de *Geobacter* spp. la cual ha sido sometida a una fuerte presión selectiva para conservar su estructura y función a lo largo de la evolución. Las mutaciones que se han producido en OmcZ entre las diferentes especies de *Geobacter* spp. son principalmente puntuales, y se han concentrado en regiones no esenciales de la proteína OmcZ, sugiriendo que estas mutaciones no han tenido un impacto significativo en su función. El análisis del gen que codifica OmcZ en *G. sulfurreducens* revela que este se encuentra en el locus "YM18_2051", este locus también contiene genes que codifican otras proteínas involucradas en la transferencia de electrones desde compuestos orgánicos a electrodos, lo que sugiere que OmcZ está involucrada en este proceso.

Análisis filogenético

Los resultados del análisis filogenético de las secuencias de OmcZ en *Geobacter* spp. indican que estas proteínas están agrupadas en dos clados principales: el clado A, formado por secuencias de *G. soli*, *G. anodireducens*, *G. benzoatilyticus*, *G. sulfurreducens* y *G. chapellei*; y el clado B, formado por secuencias de *G. pickeringii*, *G. hydrogenophilus*, *G. grbiciae*, *G. metallireducens* GS-15, *Geobacter* spp. AOG1 y *G. metallireducens* RCH13. El hecho de que las secuencias de OmcZ de *G. sulfurreducens* se encuentren en los dos clados principales sugiere que esta especie es basal al género *Geobacter*. Esto es consistente con los resultados de estudios filogenéticos anteriores, que han encontrado que *G. sulfurreducens* es la especie más divergente del género (Mora Collazos & Bravo Montaña, 2017).

La prueba de reloj molecular de Tajima indicó que la sección del gen que contiene la proteína de OmcZ en *Geobacter* spp. no se comporta como un reloj molecular, pero sí de manera similar a uno. Estos resultados sugieren que la evolución de esta proteína ha estado sujeta a una tasa mutacional relativamente constante a lo largo del tiempo.

Los resultados del análisis de la divergencia evolutiva muestran que las bacterias del género *Geobacter* son un grupo diverso, con una amplia gama de diferencias genéticas. Las diferencias más significativas se observan entre las especies *G. sulfurreducens* y *G. metallireducens*, que tienen un 37,71% de diferencias de aminoácidos. Las especies *G. soli* y *G. benzoatilyticus* son las más cercanas a *G. sulfurreducens*, con un 7,62% y 37,71% de diferencias entre los aminoácidos, respectivamente. Es-

tas especies comparten algunas características, como la capacidad de reducir sulfatos y la presencia de una estructura de pili en forma de hélice. Las especies *Geobacter* spp., *G. chapellei*, *Geobacter* spp. AOG1, *G. metallireducens* GS-15 y *G. metallireducens* RCH3 son más distantes de *G. sulfurreducens*, con diferencias de aminoácidos que van del 40,62% al 52,49%.

Estas diferencias probablemente reflejan las adaptaciones de estas especies a diferentes ambientes y condiciones. El clado A está formado por secuencias de especies que habitan ambientes sedimentarios, mientras que el clado B está formado por secuencias de especies que habitan ambientes acuáticos. Sugiriendo que las diferencias en la distribución ecológica de las especies de *Geobacter* pueden estar relacionadas con las diferencias en la estructura de la proteína OmcZ. Por ejemplo, *G. sulfurreducens* es una especie anaeróbica que puede reducir sulfatos, mientras que *G. metallireducens* es una especie facultativa que puede reducir sulfatos o metales.

Caracterización fisicoquímica y estructural de la proteína OmcZ en *G. sulfurreducens*

Se establece que esta proteína es una hemoproteína, es decir, contiene 24 grupos formado por cuatro anillos pirrólicos unidos por enlaces covalentes a los átomos de hierro, el cual se encuentra en el centro de la estructura, siendo así una proteína estable e hidrofóbica. Está compuesta por 473 residuos de aminoácidos, en donde la histidina es el segundo aminoácido más abundante en la proteína, siendo algunas de ellas importantes en la formación de enlaces coordinados con el ion hierro. Estructuralmente se identifica que esta proteína contiene hélices anfipáticas, la polaridad de las hélices está relacionada con su función en la proteína y la disposición de los grupos hemo que facilita el que estos pili se comporten en procesos de transferencia de electrones de manera casi metálica. Los grupos prostéticos del hemo desempeñan un papel crucial al interactuar con el entorno proteico, influyendo en su reactividad, los factores determinantes incluyen el número y tipo de ligandos axiales donados por la proteína al hierro, la profundidad de inserción del hemo en la proteína, la accesibilidad a ligandos exógenos, la distribución de grupos polares y cargados alrededor del hemo, y otras propiedades del sitio de unión al hemo y de la proteína. Por ejemplo, en el caso del hemo c, el cual se caracteriza por enlaces tioéter covalentes, establece enlaces con cadenas laterales de cisteína en las posiciones 2 y 4 de los grupos vinilo. Las proteínas que contienen hemo c, conocidas como citocromos C, cumplen principalmente el papel de transportadores de electrones. Su sitio de unión al hemo suele estar definido por un pentapéptido CXXCH, donde la histidina actúa como ligando axial, las cisteínas forman

enlaces tioéter con la porfirina y hay unión con los residuos variables, desempeñando un rol esencial en la función biológica. Es así como esta proteína se puede clasificar como un citocromo C de clase 4 donde hay una alta proporción de hemo en relación con el polipéptido; en estos citocromos, el ligamento axial puede ser Histidina-Metionina o Metionina-Histidina, aportando versatilidad a su función biológica.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación han arrojado importantes revelaciones a nivel proteómico sobre la estructura y la evolución de los nanocables proteínicos, conocidos como E-pili, que desempeñan un papel crucial en la transferencia de electrones en este microorganismo.

El análisis detallado de las secuencias de OmcZ en *Geobacter* spp. ha demostrado la conservación evolutiva de esta proteína, así como la existencia de posibles dominios conservados que sugieren una diferenciación funcional. Asimismo, se han identificado aminoácidos altamente conservados en la mayoría de las secuencias, lo que indica su importancia en la función y estructura de la proteína. El análisis filogenético ha permitido identificar las relaciones y la divergencia evolutiva entre las secuencias de OmcZ en *Geobacter* spp., proporcionando una visión más clara de la evolución de esta proteína a lo largo del tiempo. Además, el estudio reveló información relevante sobre la ubicación y características del gen que codifica la proteína OmcZ en el genoma de *G. sulfurreducens*.

La caracterización fisicoquímica de la proteína OmcZ ha destacado su composición específica, la presencia de grupos hemo y la importancia de ciertos aminoácidos como la histidina y la cisteína en su estructura y función. En general, estos hallazgos proporcionan una mejor comprensión de la función y la importancia de la proteína OmcZ en el metabolismo de *G. sulfurreducens* al igual que en el proceso de transferencia extracelular de electrones en *Geobacter* spp.

Este estudio *In Silico* ha contribuido al conocimiento de la estructura proteica de OmcZ que se encuentra en los nanocables conductores de electricidad en *Geobacter* spp. y abre nuevas perspectivas para futuras investigaciones y aplicaciones en campos como la biotecnología y la bioenergía, en donde el entendimiento profundo de estos mecanismos puede conducir a innovaciones tecnológicas y soluciones sostenibles basadas en la actividad metabólica de microorganismos electrogénicos como *G. sulfurreducens*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrés, G., Gómez, H., Alejandro, M., & Olvera, S. (2017). La plurifuncionalidad de las bacterias electrogénicas. *Universitarios Potosinos*, 211, 4–10.
- Costa, N. L., Clarke, T. A., Philipp, L.-A., Gescher, J., Louro, R. O., & Paquete, C. M. (2018). Electron transfer process in microbial electrochemical technologies: The role of cell-surface exposed conductive proteins. *Bioresource Technology*, 255, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.133>
- Fu, T., Liu, X., Gao, H., Ward, J. E., Liu, X., Yin, B., Wang, Z., Zhuo, Y., Walker, D. J. F., Joshua Yang, J., Chen, J., Lovley, D. R., & Yao, J. (2020). Bioinspired bio-voltage memristors. *Nature Communications*, 11(1), 1861. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15759-y>
- Gu, Y., Srikanth, V., Malvankar, N.S., Samatey, F. A. (2021). Cryo-EM structure of OmcZ nanowire from *Geobacter sulfurreducens*. DOI: 10.2210/Pdb7LQ5/Pdb. <https://www.rcsb.org/structure/7LQ5>
- Gu, Y., Guberman-Pfeffer, M. J., Srikanth, V., Shen, C., Giska, F., Gupta, K., ... & Malvankar, N. S. (2023). Structure of *Geobacter* cytochrome OmcZ identifies mechanism of nanowire assembly and conductivity. *Nature microbiology*, 8(2), 284–298. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01315-5>
- Holmes, D. E., Bond, D. R., O'Neil, R. A., Reimers, C. E., Tender, L. R., & Lovley, D. R. (2004). Microbial Communities Associated with Electrodes Harvesting Electricity from a Variety of Aquatic Sediments. *Microbial Ecology*, 48(2), 178–190. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0004-4>
- Inoue, K., Ogura, Y., Kawano, Y., & Hayashi, T. (2018). Complete Genome Sequence of *Geobacter sulfurreducens* Strain YM18, Isolated from River Sediment in Japan. *Genome Announcements*, 6(19). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00352-18>
- Koichiro Tamura, Glen Stecher, and S. K. (2021). ME-GA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022–3027.
- Liu, X., Ye, Y., Xiao, K., Rensing, C., & Zhou, S. (2020). Molecular evidence for the adaptive evolution of *Geobacter sulfurreducens* to perform dissimilatory iron reduction in natural environments. *Molecular Microbiology*, 113(4), 783–793. <https://doi.org/10.1111/mmi.14443>
- Logan, B. E., Rossi, R., Ragab, A., & Saikaly, P. E. (2019). Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems. *Nature Reviews Microbiology*, 17(5), 307–319. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0173-x>
- Lovley, D. R. (2017). Electrically conductive pili: Biological function and potential applications in electronics. *Current Opinion in Electrochemistry*, 4(1), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.08.015>
- Lovley, D. R. (2022a). Microbial nanowires. *Current Biology*, 32(3), R110–R112. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.019>
- Lovley, D. R. (2022b). Untangling *Geobacter sulfurreducens* Nanowires. *MBio*, 13(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.00850-22>
- Lovley, D. R., & Walker, D. J. F. (2019). *Geobacter* Protein Nanowires. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02078>
- Malvankar, N. S., & Lovley, D. R. (2014). Microbial nanowires for bioenergy applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.003>
- Methé, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Madupu, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Sullivan, S. A., ... Fraser, C. M. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal Reduction in Subsurface Environments. *Science*, 302(5652), 1967–1969. <https://doi.org/10.1126/science.1088727>
- Mora Collazos, A., & Bravo Montaña, E. (2017). Isolation of electrogenic microorganisms with potential to reduce hexavalent chromium. *Acta Biológica Colombiana*, 22(1), 27–36.
- NCBI. (1995). *Geobacter sulfurreducens*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=35554&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- NCBI. (2018). *Geobacter sulfurreducens* DNA, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AP017912.1/>
- NCBI. (2019). The Genetic Codes. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c#SG11>
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Shi, L., Gorby, Y. A., Golbeck, J. H., & El-Naggar, M. Y. (2014). *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12883–12888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410551111>
- RCSB PDB. (2021). 7LQ5 Cryo-EM structure of OmcZ nanowire from *Geobacter sulfurreducens*. <https://www.rcsb.org/structure/7LQ5>
- RCSB PDB. (2022). 8D9M Cryo-EM of the OmcZ nanowires from *Geobacter sulfurreducens*. <https://www.rcsb.org/structure/8D9M>
- Redondo, J. (2018). Microorganismos electrogénicos: células de combustible microbianas. In 26/27: Vol. I.

- <https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/37227>
- Richardson, D. J., Butt, J. N., Fredrickson, J. K., Zachara, J. M., Shi, L., Edwards, M. J., White, G., Baiden, N., Gates, A. J., Marritt, S. J., & Clarke, T. A. (2012). The 'porin-cytochrome' model for microbe-to-mineral electron transfer. *Molecular Microbiology*, 85(2), 201–212. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08088.x>
- Richter, H., McCarthy, K., Nevin, K. P., Johnson, J. P., Rotello, V. M., & Lovley, D. R. (2008). Electricity Generation by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Gold Electrodes. *Langmuir*, 24(8), 4376–4379. <https://doi.org/10.1021/la703469y>
- Richter, H., Nevin, K. P., Jia, H., Lowy, D. A., Lovley, D. R., & Tender, L. M. (2009). Cyclic voltammetry of biofilms of wild type and mutant *Geobacter sulfurreducens* on fuel cell anodes indicates possible roles of OmcB, OmcZ, type IV pili, and protons in extracellular electron transfer. *Energy & Environmental Science*, 2(5), 506. <https://doi.org/10.1039/b816647a>
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., & Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources*, 356, 225–244. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2017.03.109>
- Santos, T. C., Silva, M. A., Morgado, L., Dantas, J. M., & Salgueiro, C. A. (2015). Diving into the redox properties of *Geobacter sulfurreducens* cytochromes: a model for extracellular electron transfer. *Dalton Transactions*, 44(20), 9335–9344. <https://doi.org/10.1039/C5DT00556F>
- Sunil A. Patil, Cecilia Hägerhäll, L. G. (2014). Electron transfer mechanisms between microorganisms and electrodes in bioelectrochemical systems. In *Advances in Chemical Bioanalysis*.
- Wang, F., Chan, C. H., Suci, V., Mustafa, K., Ammend, M., Si, D., Hochbaum, A. I., Egelman, E. H., & Bond, D. R. (2022). Structure of *Geobacter* OmcZ filaments suggests extracellular cytochrome polymers evolved independently multiple times. *ELife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.81551>
- Wang, F., Gu, Y., O'Brien, J. P., Yi, S. M., Yalcin, S. E., Srikanth, V., Shen, C., Vu, D., Ing, N. L., Hochbaum, A. I., Egelman, E. H., & Malvankar, N. S. (2019). Structure of Microbial Nanowires Reveals Stacked Hemes that Transport Electrons over Micrometers. *Cell*, 177(2), 361–369.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.029>

Producción de enzimas fúngicas M6P21 a partir de residuos de piña (*Ananas Comosus*) y maracuyá (*Passiflora Edulis*): Aprovechamiento biotecnológico para la valorización de subproductos agroindustriales

Production of fungal enzymes from M6P21 using pineapple (*Ananas comosus*) and passion fruit (*Passiflora edulis*) waste: Biotechnological utilization for the valorization of agro-industrial by products

Mauren C. Osorio Díaz*, **Luis E. Oviedo Zumaqué****, **Licet V. Durango Castilla*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.117486

RESUMEN

Este estudio evaluó la actividad pectinolítica de las enzimas producidas por el aislado *Aspergillus niger* M6P21 (P. Micheli, 1729), utilizando albedo de piña, albedo de maracuyá y una combinación de ambos como únicas fuentes de carbono, con pectina comercial como control. El aislado M6P21 fue obtenido de un cultivo de piña en el distrito Sarandelo de Lórica, Córdoba, Colombia. La producción enzimática se evaluó en cuatro tratamientos: albedo de piña, albedo de maracuyá, su mezcla y pectina comercial. La actividad pectinolítica se monitoreó durante tres días, y los resultados se expresaron como concentración de azúcares reductores. Los hallazgos demostraron una actividad enzimática notable: 0,2816 g/L para el albedo de piña, 0,2740 g/L para el albedo de maracuyá, 0,3923 g/L para la mezcla de sustratos y 0,3046 g/L para la pectina comercial. El análisis estadístico mediante ANOVA arrojó un valor - *p* de 0,9383, lo que indica que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Estos resultados resaltan el potencial de *Aspergillus niger* M6P21 para la producción de pectinasas a partir de subproductos agroindustriales, ofreciendo un enfoque biotecnológico sostenible para la valorización de residuos frutales en las industrias alimentaria y biotecnológica.

Palabras claves: Enzimas fúngicas, *Ananas comosus*, *Passiflora edulis*, *Aspergillus niger*, Azúcares.

ABSTRACT

This study evaluated the pectinolytic activity of enzymes produced by the *Aspergillus niger* M6P21 isolate (P. Micheli, 1729), using pineapple albedo, passion fruit albedo, and a combination of both as sole carbon sources, with commercial pectin serving as the control. The M6P21 isolate was isolated from a pineapple crop in the Sarandelo district of Lórica, Córdoba, Colombia. Enzyme production was assessed across four treatments: pineapple albedo, passion fruit albedo, their mixture, and commercial pectin. Pectinolytic activity was monitored over three days, with results expressed as reducing sugar concentration. The findings demonstrated notable enzymatic activity: 0.2816 g/L for pineap-

* Docente asistente, Facultad de ciencias básicas, Grupo de investigación GRUBIODEQ del programa de biología y química, Universidad de Córdoba. <https://orcid.org/0000-0002-4355-7824>

** Docente titular, Facultad de ciencias básicas, Grupo de investigación GRUBIODEQ del programa de biología y química, Universidad de Córdoba. <https://orcid.org/0000-0002-7797-1580>

*** Docente asistente, Facultad de Ingeniería, Laboratorio de Biorprocesos y Fermentaciones, Grupo de investigación GIPPAL del programa de Ingeniería de Alimentos, Universidad de Córdoba. <https://orcid.org/0009-0000-5696-2549>

ple albedo, 0.2740 g/L for passion fruit albedo, 0.3923 g/L for the mixed substrates, and 0.3046 g/L for commercial pectin. Statistical analysis using ANOVA yielded a *p-value* of 0.9383, indicating no significant differences among the treatments. These results highlight the potential of *Aspergillus niger* M6P21 for pectinase production from agro-industrial by-products, offering a sustainable biotechnological approach for the valorization of fruit waste in the food and biotechnology industries.

Keywords: Fungal enzymes, *Ananas comosus*, *Passiflora edulis*, *Aspergillus niger*, Reducing sugars.

Recibido: noviembre 7 de 2024 **Aprobado:** abril 22 de 2025

INTRODUCCIÓN

En Córdoba la comercialización de jugos constituye un factor importante en el ámbito económico, desde el año 2022 se siembran aproximadamente 225 hectáreas de Piña (*Ananas comosus*) conformando el 2% de productores de piña a nivel nacional (Granado & Aguillón, 2019; Ajayi et al., 2022; Agronet, 2024b). En el caso del consumo maracuyá (*Passiflora edulis*) la siembra fue de 1.024 hectáreas aproximadamente para el 2022 (Agronet, 2024a), estas frutas son comercializadas por sus propiedades nutricionales lo que lleva a la alta demanda de la producción por pequeños agricultores.

La pectina es un polisacárido con estructura compleja que hace parte de la pared vegetal de los frutos y plantas, por su alta complejidad la degradación de esta estructura depende de enzimas producidas por microorganismos filamentosos (Satapathy et al., 2020; Neves Junior et al., 2021). Está constituido de unidades repetitivas de residuos ácido galactopiranosilurónico y unidades de galactosa, arabinosa, xilosa y fructosa (Ciriminna et al., 2022; Zhong et al., 2021).

Las enzimas son herramientas biotecnológicas muy valiosas en la elaboración de alimentos (C. Li et al., 2020; Boukid et al., 2023), particularmente las pectinasas se emplean en la industria alimenticia para aumentar la eficiencia de procesos extractivos, estabilización de productos y mejoramiento del sabor. Su producción a bajo costo, de hongos filamentosos utilizando sustratos agroindustriales afines con el microorganismo, como este caso sustratos ricos en pectina Sharma et al., (2022). Estas son producidas principalmente por microorganismos donde se encuentran bacterias, levaduras y hongos filamentosos, hoy en día esta enzima juega un papel importante en las actividades metabólicas de casi todos los organismos vivos (Abdullahi et al., 2021; Lozano & López, 2001).

El microorganismo más empleado en la industria para la producción de enzimas es *Aspergillus niger*, gracias a su capacidad de secretar hasta un 70% de enzimas extracelulares, permitiéndole metabolizar diversas fuentes de

carbono (Sharma & Vimal, 2023). En este contexto, se ha planteado el uso de enzimas producidas por hongos del género *Aspergillus* en análisis cualitativos de jugos naturales de baja concentración, con el propósito de evaluar su potencial clarificante (Kirimura & Yoshioka, 2019; Garcia et al., 2023). Este hongo es fácil de manejar debido a su crecimiento rápido y a su capacidad de fermentar cualquier materia prima (Viayaraghavan et al., 2019; Mohammadi et al., 2023) y también ofrece rendimientos constantes cuando es utilizado (Chergui et al., 2021; Abarca, 2000; Weng et al., 2024).

Esta investigación se realizó con el objetivo de determinar la actividad enzimática mediante el método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) para un análisis la producción enzimática del hongo *Aspergillus niger* M6P21 nativa de cultivos de frutas de piña, la cual fue sometida a diversos tratamientos, empleando como sustratos modificados el albedo de piña y maracuyá. La tecnología de enzimas fúngicas y especialmente las pectinolíticas es utilizada para mejorar la calidad de productos alimenticios ya que estas preservan las características tanto nutricionales y organolépticas de los mismos. Por lo que se planteó la siguiente hipótesis.

La utilización de residuos de piña (*Ananas comosus*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) como sustratos en cultivos del hongo M6P21 de *Aspergillus niger* actuará como fuente de carbono, favoreciendo la actividad enzimática y promoviendo la producción de azúcares reductores.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron muestras y aislados directamente de cultivos representativos de piña y maracuyá localizados en el corregimiento Sarandelo – Lórica (9.110743° N, -75.828322° O) y el municipio de Purísima – Córdoba (9.282834° N, -75.767724° O). Durante el muestreo en Sarandelo (abril de 2021), se registró una temperatura promedio de 30 °C y una humedad relativa del 75 %. En Purísima (mayo de 2021), las condiciones fueron de aproximadamente 32 °C y 80 % de humedad relativa.

Los experimentos *in vitro* se realizaron en las instalacio-

nes del laboratorio de investigación de Biotecnología (GRUBIODEQ), en la Universidad de Córdoba, ubicado en Montería (8.792482° N, -75.862677° O), donde se llevaron a cabo los procedimientos de aislamiento y evaluación enzimática. Las muestras fueron recolectadas con guantes, bolsas estériles y transportadas en una caja térmica hasta el laboratorio. Se implementaron medidas de bioseguridad para evitar contaminación cruzada. Todo el material e instrumentos empleados fueron previamente desinfectados o esterilizados.

Caracterización del aislado *Aspergillus* M6P21 asociado a los cultivos de frutos de piña y maracuyá

Aislamiento de hongos del género *Aspergillus*. Se prepararon trampas con contenido de frutos fisiológicamente maduros de piña y maracuyá; en un recipiente con un contenido de 10 g aproximadamente de residuos humedecidos con solución de sales Czapek, cada trampa fue ubicada dentro del cultivo de piña y maracuyá durante 1 hora aproximadamente (Ver Anexo 1).

Las trampas que fueron expuestas en los cultivos frutales se les proporcionó una incubación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ de 3 a 8 días para inducir crecimiento de los hongos. Luego de esto, desde el día 3 y hasta el día 8 se hicieron observaciones y aislamiento de microorganismos, estos fueron creciendo en la superficie de la cascara de cada fruta. Al obtener el crecimiento, fueron sembrados en Agar Czapek modificado (Figura 1) a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 8 días; en el

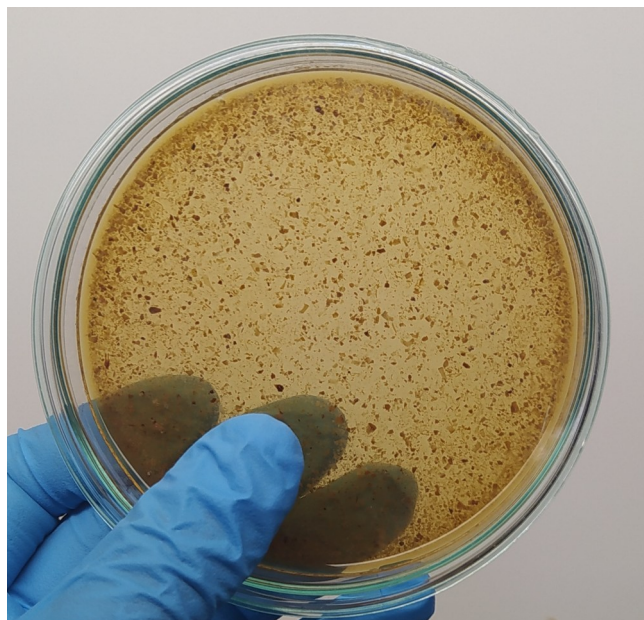


Figura 1. Czapek modificado. Medio de cultivo preparado de manera artesanal, donde se utilizan las sales del medio Czapek y en lugar de usar sacarosa, se reemplaza por residuo de piña o maracuyá en la proporción indicada para preparar el medio de cultivo.

caso de que los microorganismos no se encontraran puros se realizaban repicas hasta obtenerlos puros para después identificarlos por sus características morfológicas Arauz Cavallini (1998). Para la caracterización molecular, se aisló ADN genómico puro a partir de conidias del cultivo fúngico (M6P21). La calidad del ADN extraído fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0 %. La región del espaciador interno transcrito (ITS) fue amplificada mediante PCR utilizando cebadores universales específicos para esta región. El amplicón obtenido fue secuenciado, y la secuencia resultante se analizó mediante la herramienta BLAST en la base de datos GenBank del NCBI, con el fin de establecer su identidad molecular del hongo *Aspergillus niger* Wagh *et al.*, (2022). Cada aislado se sembró sobre medios de cultivo agar Czapek modificado con albedo de piña y albedo de maracuyá respectivamente como única fuente de carbono. Se llevó a cabo: siembra en placas, dilución, y siembra directa, para identificar sus características morfológicas (Q. Li *et al.*, 2020; Madigan *et al.*, 2003).

Determinación la actividad pectinolítica de hongos seleccionados utilizando sus extractos enzimáticos en albedo: piña, maracuyá, piña/maracuyá y pectina comercial

Preparación de inóculos. La preparación de inóculos partió de la recolección de esporas del hongo aislada seleccionada, los cuales presentaron mayor capacidad de crecimientos en medio de agar Sabouraud (hasta la esporulación), con 10 mL de solución salina (NaCl 0.85% + Twen 20 al 0.1%) y se realizó un conteo de esporas por el método de dilución seriada usando cámara de Neubauer, para obtener las concentraciones de conidias por mL Osorio & Cando (2017).

Introducción a la producción de enzimas. En este proceso, se utilizó la técnica de fermentación sumergida al 10% de sustrato modificado de Oviedo y Ramos en el 2013 Ramos Galeano (2013). Se realizó un conteo de esporas y estas soluciones se inocularon en un volumen de 25 mL de medio líquido modificado Czapek al 2 % de piña, maracuyá, piña/ maracuyá y de pectina cítrica comercial al 2% a un pH 5.6 con 0.5 mL de suspensión de esporas e incubados por un periodo de 3 días (24, 48, 72) a 150 rpm a 30°C respectivamente Osorio & Cando (2017).

Ensayo poligalacturonasa. El extracto obtenido de la fermentación sumergida se empleó para evaluar la actividad enzimática del hongo. Para cada prueba, se utilizó un buffer citrato-fosfato (pH 5.6) en un medio estéril con pectina, el cual fue incubado a 35°C durante 1 hora.

Análisis de la actividad enzimática por método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) de los azúcares reductores.

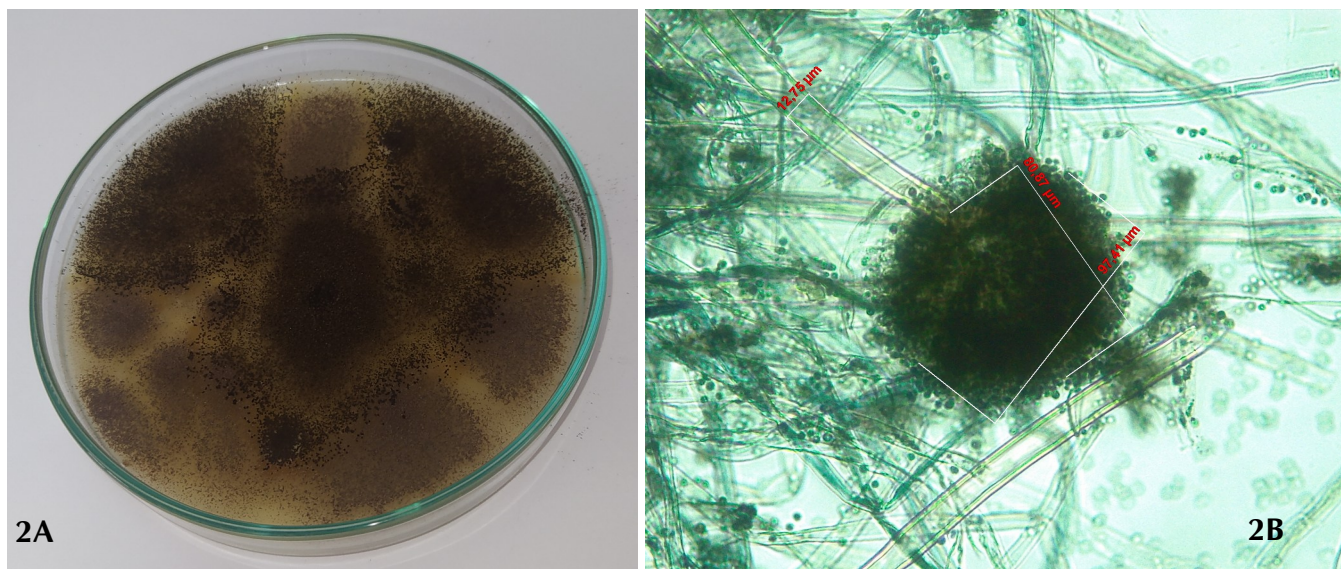


Figura 2. Características macroscópicas y microscópicas de la aislado M6P21. **(2A):** características macroscópicas de la aislado M6P21; **(2B):** características microscópicas de la aislado M6P21.

En tubos de cristal de 20 mL, se tomaron alícuotas homogéneas (0,5mL) de cada extracto incubado en buffer con pectina y se aplica el reactivo DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico). Luego, los tubos se colocaron en baño de maría a 100°C por 5 minutos. Se dejaron enfriar en baño de hielo por 15 minutos y se le añadieron 5 mL de agua destilada. Luego se agitaron para homogenizar y se les tomo lectura a 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Estos resultados se compararon con una curva patrón del reactivo DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) con un estándar de glucosa monohidratado ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) para obtener las concentraciones en g/L de azúcares reductores Miller (1959).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo un análisis de datos con un diseño completamente aleatorio (DCA), con 4 repeticiones. Los datos experimentales obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey, por el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.I, con un margen de significancia de 0.05, seleccionando de esta forma el mejor tratamiento para la producción de enzimas pectinolíticas en cada tratamiento aplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del aislado M6P21 de hongos *Aspergillus niger* con propiedades pectinolíticas. Para la caracterización del aislado de los cultivos de piña y maracuyá, se tuvo en cuenta los aspectos de las colonias y el análisis de la morfología microscópica, especialmente en la cabeza que contiene las esporas muy características

de este género. Se realizó una preselección de 6 aislados con las características tanto macroscópicas como microscópicas del género *Aspergillus*, mediante la medida del halo de crecimiento sobre medio de cultivo de pectina comercial al 2%, utilizando como indicador revelador rojo Congo, con un halo de crecimiento de 3,6 mm mayor que los otros aislados (Ver Anexo 2). En la Figura 2 se puede observar las características macroscópicas y microscópicas del aislado M6P21. Se observa la abundancia de esporas de color negro oscuro, en algunas cabezas dispersas, en la imagen se logra observar la formación de una vesícula esférica globosa, hifas tabicadas, conidióforos largos y lisos.

Para corroborar los resultados del aislamiento de hongos nativos como *Aspergillus niger* con características y condiciones similares a las de este trabajo se comparó con trabajos recientes como en trabajo realizado por Saif *et al.* (2021), que lograron aislar varias especies fúngicas directamente de las frutas de piña y se lograron encontrar 15 especies del género *Aspergillus* siendo el género más dominante de estos aislamientos, los cuales fueron sembrados en medio de agar patata dextrosa (PDA) lo que sería caso contrario a este trabajo donde los medios de crecimiento era a base de cascara de frutas. En cuanto al estudio de la morfología se realizó una metodología similar mediante técnica microscópica y macroscópica, cabe resaltar que las frutas desde el momento que se encuentran en el cultivo hasta el punto de maduración están expuestas al crecimiento de hongos, debido a que son la principal fuente de alimentos de hongos del género *Aspergillus* Eboigbe & Omoregbe (2020).

Por otro lado, Cavalieri de Alencar Guimarães *et al.* (2022), lograron aislar una cepa de *Aspergillus* para producción de enzimas pectinolíticas y utilizan como fuente de carbono residuos de maracuyá en solución salada para producir enzimas pectinolíticas, son resultados muy similares a los de este trabajo porque también se utilizan residuos de maracuyá para el aislamiento y purificación de los hongos nativos para realizar ensayos de producción de enzimas pectinolíticas. Así mismo Mahmoodi *et al.*, (2017) obtienen aislados de la cascara de naranja del género *Aspergillus niger* de tipo salvaje, para producción de enzimas pectinolíticas aplicables en zumo de naranja, son resultados que al ser comparados con los resultados obtenidos son muy parecidos. Sin embargo, el género *Aspergillus* es un hongo común que se encuentra en el medio ambiente, desde cualquier fuente de alimento en descomposición y más que todo en las especies frutales en su proceso de maduración o putrefacción, por lo que Krusong *et al.* (2019), logran obtener *Aspergillus* de un pan contaminado sin conservante, de una especie no frutal. *Aspergillus niger* es el hongo más común del género porque se encuentra en el medio ambiente, es utilizado en potencia para aspectos ambientales y alimenticios Nosalj *et al.*, (2021).

Para la identificación del aislado M6P21, se realizó un estudio molecular mediante PCR convencional, obteniendo una secuencia correspondiente al género *Aspergillus*. El hongo, aislado de cultivos de piña, presentó fragmentos de ADN que coincidieron en tamaño y secuencia con especies del género *Aspergillus*, lo que sugiere una posible relación con nuevas funciones o adaptaciones propias de *Aspergillus niger* en su ambiente de origen.

El análisis molecular se basó en la amplificación del gen del espaciador interno transcrito (ITS), incluyendo el gen 5.8S del ARN ribosomal, lo que permitió una identificación precisa del aislado. Posteriormente, la secuencia fue comparada en la base de datos GenBank del NCBI mediante la herramienta BLAST, identificando alta similitud con especies del género *Aspergillus* (Ver Anexo 3).

Una vez confirmada la identidad, la nueva secuencia fue registrada en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) bajo el código GRUBIODEQ M6P21. En dicha base de datos, se encuentra disponible el fragmento de anotación genética correspondiente al gen 5.8S del ARN ribosomal, con una longitud de 101 pares de bases.

El fragmento ITS (Internal Transcribed Spacer) es una región no codificante del ADN ribosomal ampliamente utilizada como marcador molecular en la identificación de hongos, debido a su alta variabilidad entre especies.

En este estudio, el aislado M6P21 fue identificado mediante la secuenciación del fragmento ITS, lo que permitió su clasificación dentro del género *Aspergillus*. Este marcador, aunque útil con fines taxonómicos, no proporciona información directa sobre la funcionalidad genética del aislado. Por ejemplo, se ha documentado que hongos filamentosos como los del género *Aspergillus* pueden expresar genes asociados a enzimas de la familia CAZy en presencia de pectina, incluyendo miembros de las proteínas CH28 y MAPK, implicadas en la degradación de sustratos y en la respuesta al estrés Baltussen *et al.*, (2020). Desde el enfoque biotecnológico, esta información podría usarse para inducir la producción de enzimas específicas. Sin embargo, el fragmento ITS no confirma la expresión funcional de genes. Se requieren estudios adicionales como transcriptómica o expresión génica.

Determinación de la capacidad pectinolítica hongo seleccionado utilizando sus extractos enzimáticos en albedo de piña, maracuyá, piña/ maracuyá y pectina comercial

El aislado M6P21 previamente aislado de cultivo de piña fue sembrado en medio de cultivo Czapek modificado con albedo de piña como única fuente de carbono para conocer la cantidad de conidias por mL, la concentración del hongo fue de $5,30 \times 10^7$ conidias /mL y fue evaluada en sustrato de albedos de: piña, maracuyá, Mezcla de ambos y pectina comercial 2%.

A continuación, se presentan los valores de azúcares reductores obtenidos en los tratamientos antes mencionados, utilizando el método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) como método indirecto para determinar la actividad pectinolítica de los hongos. El primer tratamiento es el de albedo de piña, el segundo es el tratamiento de albedo de maracuyá, como tercer tratamiento la mezcla de albedo de piña/ maracuyá y cuarto tratamiento pectina comercial, durante un monitoreo de tres días, dando como resultado la cuantificación de la actividad enzimática de M6P21.

Acerca de los resultados obtenidos en el tratamiento 1 (Piña) se pueden observar en la Tabla 1 que la producción de enzimas expresadas en concentraciones de azúcares reductores, donde el aislado M6P21 obtiene la mayor producción de enzimas a las 72 horas con una concentración de 0,2816 g/L.

Con respecto a los resultados obtenidos del tratamiento 2 (Maracuyá) también se pueden observar que el aislado M6P21 obtiene la mayor concentración de azúcares reductores de 0,2740 g/L, para este tratamiento, este

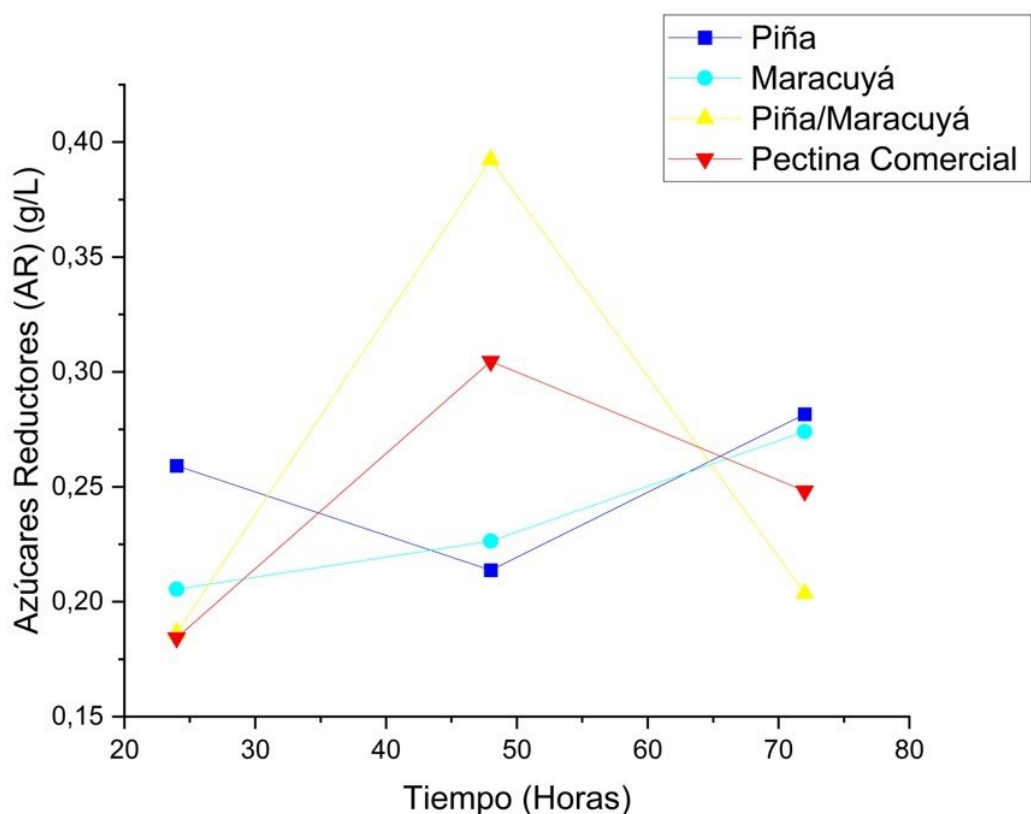


Figura 3. Concentración de azúcares reductores. Tratamientos de residuos de piña, maracuyá, piña/maracuyá y pectina comercial.

Tabla 1. Tratamientos de piña, Maracuyá, piña/Maracuyá y Pectina comercial

HONGO		Piña	Maracuyá	Piña/ Maracuyá	Pectina comercial
NATIVO	tiempos	Azúcares Reductores (AR) g/L			
M6P21	24	0,2592± 0,021 ^a	0,2055± 0,022 ^a	0,1865± 0,033 ^a	0,1843± 0,030 ^a
	48	0,2028± 0,021 ^a	0,1949± 0,409 ^a	0,2045± 0,021 ^a	0,2468± 0,021 ^a
		0,2137± 0,022 ^a	0,2264± 0,041 ^a	0,3923± 0,077^a	0,3046± 0,029^a
	72	0,2411± 0,044 ^a	0,2119± 0,030 ^a	0,2036± 0,029 ^a	0,2482± 0,016 ^a
		0,2816± 0,031^a	0,2740± 0,089^a	0,181± 0,033 ^a	0,2064± 0,021 ^a

a: no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$), según la prueba de comparación múltiple.

valor se presentó al tiempo de 72 horas para la mayor producción enzimas fúngicas.

Por un lado, en la misma tabla se puede observar el rendimiento de la producción de enzimas fúngicas del tratamiento tres (mezcla: piña/maracuyá), donde el aislado

M6P21 presenta una concentración de 0,3923 g/L a las 48 horas. De forma semejante el tratamiento cuatro (pectina comercial) el aislado M6P21 obtiene un valor de 0,3046 g/L, teniendo en cuenta lo anterior, para el ultimo tratamiento estos aislados de *Aspergillus niger* presentaron afinidad con pectina comercial donde la actividad

enzimática fue mayor que los demás tratamientos (Ver Figura 3). El hongo M6P21, tras ser sometido a distintos tratamientos con diversas fuentes de carbono y pectina comercial, mostró producción enzimática, evidenciando su especificidad y capacidad adaptativa para la degradación de polímeros, especialmente para el tratamiento con albedo de piña/maracuyá (0,3923 g/L a las 48 horas), que fue superior al comercial en el mismo tiempo (0,3046 g/L a las 48 horas).

Entre los tratamientos evaluados (Ver tabla 1), el albedo de piña destacó como el más prometedor, con la media más alta (0,239691). El análisis estadístico ANOVA (*P*-valor 0,9383) confirmó la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos, lo que indica la estabilidad del proceso enzimático y su afinidad por fuentes naturales de pectina (Ver anexo 4). Este resultado fue respaldado por la prueba de Tukey, que ubicó a todos los tratamientos (maracuyá, P/M, PC y piña) en el mismo grupo homogéneo. Por lo tanto, estos hallazgos reflejan la adaptabilidad del hongo y su alto desempeño en la producción de enzimas pectinolíticas en albedo de piña y maracuyá. Además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la media de M6P21 y los distintos niveles de tratamiento, con un nivel de significancia del 5%.

De los resultados obtenidos en cada tratamiento se puede comparar con los resultados de Sandri & da Silveira (2018) que lograron la obtención de enzimas pectinasas, donde la producción se vio reflejada en un pico máximo a las 72 horas, similar a los tratamientos de Piña y Maracuyá. Para los tratamientos de Piña/ Maracuyá y pectina comercial, la producción de enzimas se da a las 48 horas, como lo reporta un el trabajo reciente de Cavalieri de Alencar Guimarães *et al.* (2022), que lograron mayor concentración de azúcares reductores de la enzima (PGAj) de *A. niger* a las 48 horas, también utilizaron como única fuente de carbono cascara de maracuyá en solución salina. Se logró obtener actividad enzimática en tiempos similares a los reportados en el estudio en el que se emplearon tratamientos con piña y maracuyá para la obtención de enzimas.

Se logró obtener actividad enzimática en tiempos comparables a los reportados en un estudio previo, en el cual se obtuvo la producción de enzimas utilizando tratamientos con piña y maracuyá.

Adedeji & Ezekiel (2019) logró obtener enzimas poligalacturonasas de medios de cultivos modificados de cascara de plátano y naranja, con texturas diferentes, unos fueron procesados (en polvo) otros sin procesamiento, realizando una inoculación de esporas *Aspergillus*

awamori a las 120 horas, con un pH ligeramente ácido, diferente a este trabajo que usó menores tiempos (72 horas). Este estudio también evaluó la actividad enzimática mediante el método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) como método indirecto expresada en azúcares reductores. De hecho, Vaz *et al.* (2021) miden la actividad enzimática mediante el método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico), logrando obtener una producción afectiva de azúcares reductores a una concentración de 0,196 g/L, por debajo de los resultados obtenidos en este trabajo.

De lo anterior, la producción de enzimas está influenciada directamente desde la fuente de carbono, los valores de pH, las condiciones de humedad del medio, aireación y temperatura, la exposición a la luz es un factor que también afecta el crecimiento y metabolismo de los hongos filamentosos, y esto resulta conveniente para algunos microorganismos que se adaptan mejor que otros, es por esto que algunos presentaron valores de actividad enzimática mayor como el hongo M6P21 que logro presentar buen rendimiento en los diferentes tratamientos a los cuales fue sometido durante un monitoreo de 3 días.

Con el objetivo de demostrar la capacidad de los aislados para producir enzimas, se realizó este proceso a menor escala, cuyos resultados se presentan en las tablas 3 a 6. De igual forma, este tipo de ensayos puede ser escalado, logrando una producción de enzimas superior al 70% bajo condiciones controladas (Grebechova & Prieto contreras, 2006; Adedayo *et al.*, 2021).

Las enzimas se utilizan en la industria de alimentos, sumándole a esto Dumorné *et al.* (2017), afirma que el proceso industrial necesita biocatalizadores que sean capaces de adaptar a diversas condiciones como pH, Temperatura, aireación y humedad y demás parámetros importantes para la producción de estas. De ello, resulta decir que a día de hoy la necesidad de las herramientas biotecnológicas resulta provechoso y con ello es aumento del interés de aplicar enzimas pectinolíticas como estrategia para el área alimenticia, medio ambiente y otros ámbitos en lo que estas tengan la capacidad de adaptarse Shet *et al.*, (2022).

CONCLUSIONES

Los residuos piña y maracuyá son sustratos que tienen propiedades de fuente de carbono por medio de la degradación fúngica para la producción de enzimas fúngicas, utilizando condiciones de fermentación sumergida dándole un valor agregado a estos residuos. El cultivo de piña / maracuyá fue el mejor para la producción de enzimas pectinolíticas, dependiendo de un aislado fúngico M6P21, del medio de cultivo y de las condiciones de

agitación. Para determinar la actividad de las enzimas y su producción óptima, se recomienda realizar estudios adicionales para las enzimas y la utilización de diferentes residuos agroindustriales. Se recomienda que las enzimas sean identificadas para realizar estudio a escala de biorreactores y conocer sus características relacionadas en cuanto a la actividad y aplicación. Estos resultados pueden ser aplicables en el área de alimentos, medio ambiente y farmacéutica.

REFERENCIAS

- Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 17(1), S79–S84.
- Abdullahi, N., Atiku, M. K., & Umar, N. B. (2021). The roles of enzyme in food processing - an overview. *Revista de ciencias FUDMA*, 5(1), 157–164. <https://doi.org/10.33003/fjs-2021-0501-549>
- Adedeji, O. E., & Ezekiel, O. O. (2019). Pretreatment of selected peels for polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* CICC 2040: Purification and application in mango juice extraction. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100306. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100306>
- Agronet. (2024a). Estadísticas home: Comparativo de área, producción, rendimiento y participación departamental por cultivo de maracuyá. <https://www.agronet.gov.co> (Consultado el 1 de noviembre de 2024)
- Agronet. (2024b). Estadísticas home: Comparativo de área, producción, rendimiento y participación departamental por cultivo de piña. <https://www.agronet.gov.co> (Consultado el 1 de noviembre de 2024)
- Ajayi, A. M., Coker, A. I., Oyebanjo, O. T., Adebajo, I. M., & Ademowo, O. G. (2022). *Ananas comosus* (L) Merril (pineapple) fruit peel extract demonstrates antimalarial, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities in experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114576. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114576>
- Arauz Cavallini, L. F. (1998). Fitopatología: un enfoque agroecológico. In Editorial de Costa Rica.
- Baltussen, T. J. H., Zoll, J., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. G. (2020). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(1), e00049-19. <https://doi.org/10.1128/mubr.00049-19>
- Benoit, I., Coutinho, P. M., Schols, H. A., Gerlach, J. P., Henrissat, B., & de Vries, R. P. (2012). Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. *BMC Genomics*, 13(1), 321. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-321>
- Cavalieri de Alencar Guimarães, N., Glienke, N. N., Silva Galeano, R. M., Ruller, R., Zanoelo, F. F., Masui, D. C., & Giannesi, G. C. (2022). Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39 (August 2021), 102233. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102233>
- Chergui, D., Akretche-Kelfat, S., Lamoudi, L., Al-Rshaidat, M., Boudjelal, F., & Ait-Amar, H. (2021). Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* using two downgraded Algerian date varieties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7134–7141. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.013>
- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Scurria, A., Ilharco, L. M., & Pagliaro, M. (2022). Pectin: New science and forthcoming applications of the most valued hydrocolloid. *Food Hydrocolloids*, 127, 107483. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107483>
- Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., & Renganathan, P. (2017). Extremozymes: A potential source for industrial applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 649–659. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>
- Eboigbe, L., & Omoregbe, M. O. (2021). Genetic variability and vegetative compatibility in *Aspergillus niger* isolated from various food substances in Benin City Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 24(12), 2161–2165. <https://doi.org/10.4314/jasem.v24i12.23>
- García-Quinto, E., Aranda-Cañada, R., García-García, P., & Fernández-Lorente, G. (2023). Use of Potential Immobilized Enzymes for the Modification of Liquid Foods in the Food Industry. *Processes*, 11(6), 1840. <https://doi.org/10.3390/pr11061840>
- Granado, W., & Aguillón, D. (2019). Cadena de la Piña. [Informe técnico]. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Grebechova, R., & Prieto contreras, L. (2006). Biosíntesis de las enzimas pectolíticas a partir de hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* para aplicación en industria de alimentos. *Revista de Investigación Universidad La Salle*, 6(1657–6772), 153–162.
- Kirimura, K., & Yoshioka, I. (2019). Citric Acid. *Comprehensive Biotechnology*, 3, 158–165. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00157-9>
- Krusong, W., Pothimon, R., & Vichitraka, A. (2019). Inhibitory impact of vapor-phase ethanol on conidia

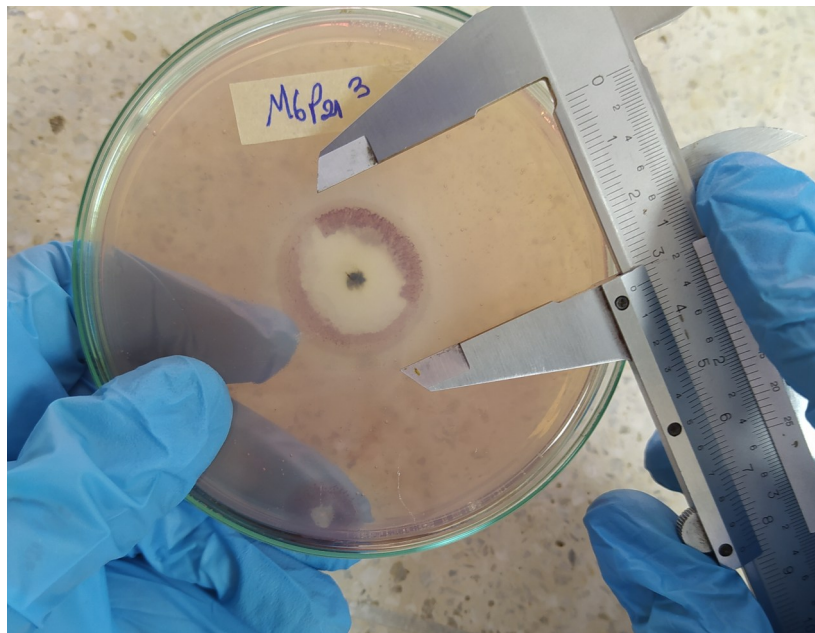
- germination and mycelial growth of *Aspergillus fumigatus* on bread. *Food Control*, 95, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.010>
- Lozano, A., & López, E. (2001). Endopoligalacturonasa y pectinesterasa de *Aspergillus Niger* Endopolygalacturonase and pectinesterase from *Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2, 85–91.
- Madigan, M. T., Parker, J., & Martinko, J. M. (2003). Microbiología: Biología de los microorganismos (J. M. Martinko, Ed., 10ª ed.). Pearson Educación.
- Mahmoodi, M., Najafpour, G. D., & Mohammadi, M. (2017). Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace. *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 4123–4128. <https://doi.org/10.1007/S13197-017-2829-8>
- Marzo, C., Díaz, A. B., Caro, I., & Blandino, A. (2019). Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Management and Research*, 37(2), 149–156. <https://doi.org/10.1177/0734242X18798699>
- MinAgricultura. (2020). Cadena de Pasifloras. Indicadores e instrumentos. Primer trimestre 2020. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/2018-09-30 Cifras Sectoriales.pdf>
- Mohammadi, Z. B., Zhang, F., Kharazmi, M. S., & Jafari, S. M. (2023). Nano-biocatalysts for food applications; immobilized enzymes within different nanostructures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(32), 11351–11369. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2092719>
- Neves Junior, A., Mansoldo, F. R. P., Godoy, M. G., Firpo, R. M., Cedrola, S. M. L., & Vermelho, A. B. (2021). Production of an endo-polygalacturonase from *Fusarium proliferatum* isolated from agro-industrial waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 38, 102199. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102199>
- Nosalj, S., Šimonovičová, A., & Vojtková, H. (2021). Enzyme production by soilborne fungal strains of *Aspergillus niger* isolated from different localities affected by mining. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 900(1), 012027. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/900/1/012027>
- Osorio, M., & Cando, Y. (2017). Actividad pectinolítica del hongo *Aspergillus* sp aislados a partir de residuos de maracuya (*Passiflora edulis*). [Tesis Pregrado no publicada]. Universidad de Córdoba.
- Ramos Galeano, R. A. (2013). Evaluación de la capacidad pectinolítica de hongos del género *Aspergillus* sp. Aislados de plantas de pomelo (*Citrus grandis*) En el municipio de Moñitos – Córdoba. [Tesis de maestría no publicada]. Universidad de Córdoba.
- Saif, F. A., Yaseen, S. A., Alameen, A. S., Mane, S. B., & Undre, P. B. (2021). Identification and characterization of *Aspergillus* species of fruit rot fungi using microscopy, FT-IR, Raman and UV-Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246, 119010. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119010>
- Sandri, I. G., & da Silveira, M. M. (2018). Production and application of pectinases from *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages*, 4(3), 48. <https://doi.org/10.3390/beverages4030048>
- Satapathy, S., Rout, J. R., Kerry, R. G., Thatoi, H., & Sahoo, S. L. (2020). Biochemical Prospects of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical Bioprocessing. *Frontiers in Nutrition*, 7, 117. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00117>
- Sharma, G., & Vimal, A. (2023). Industrial Processing of Commercially Significant Enzymes. *Recent Innovations in Chemical Engineering*, 16(1), 3–15. <https://doi.org/10.2174/2405520416666230301112734>
- Sharma, V., Tsai, M. L., Nargotra, P., Chen, C. W., Kuo, C. H., Sun, P. P., & Dong, C. Di. (2022). Agro-Industrial Food Waste as a Low-Cost Substrate for Sustainable Production of Industrial Enzymes: A Critical Review. *Catalysts*, 12(11), 1373. <https://doi.org/10.3390/catal12111373>
- Shet, A. R., Muhsinah, A. Bin, Alsayari, A., Achappa, S., Desai, S. V., Mahnashi, M. H., Muddapur, U. M., Shaikh, I. A., Mannasaheb, B. A., & Khan, A. A. (2022). Media Optimization by Response Surface Methodology for the Enhanced Production of Acidic Extracellular Pectinase by the Indigenously Isolated Novel Strain *Aspergillus cervinus* ARS2 Using Solid-State Fermentation. *Fermentation*, 8(10), 485. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100485>
- Vaz, R. P., Vici, A. C., Teixeira de Moraes Polizeli, M. de L., Magalhães, P. O., & Filho, E. X. F. (2021). Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(1), 197–208. <https://doi.org/10.1002/bab.2004>
- Wagh, V., Patel, H., Patel, N., Vamkudoth, K. R., & Ajmera, S. (2022). Pectinase Production by *Aspergillus niger* and its Applications in Fruit Juice Clarification. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(4), 2724–2737. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.4.43>

ANEXOS



Anexos 1. Recolección de muestras

A: trampa con contenido de piña en un cultivo de piña; **B:** trampa con contenido de maracuyá en cultivo de maracuyá.



Anexo 2. Media del halo de crecimiento para la selección de aislados del género *Aspergillus* sp.

Alignments

Aspergillus niveus strain PQJ-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: **gi|2178227092|OM269036.1** Length: 603 Number of Matches: 1
Range 1: 303 to 403

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
175 bits(193)	1e-39()	98/101(97%)	0/101(0%)	Plus/Plus	

Features:

```

Query 1  AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT 60
Sbjct 303 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT 362

Query 61  GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYY 101
Sbjct 363 GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYY 403

```

Penicillium italicum isolate MTCHT137 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Sequence ID: **gi|2178135673|OM267705.1** Length: 600 Number of Matches: 1
Range 1: 260 to 360

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
175 bits(193)	1e-39()	98/101(97%)	0/101(0%)	Plus/Plus	

Features:

```

Query 1  AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT 60
Sbjct 260 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT 319

Query 61  GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYY 101
Sbjct 320 GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYY 360

```

Penicillium digitatum isolate MTCHT135 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Sequence ID: **gi|2178135670|OM267702.1** Length: 490 Number of Matches: 1
Range 1: 274 to 374

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
175 bits(193)	1e-39()	98/101(97%)	0/101(0%)	Plus/Plus	

Features:

```

Query 1  AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT 60
Sbjct 274 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT 333

Query 61  GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYY 101
Sbjct 334 GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKKGYY 374

```

Aspergillus awamori isolate Manjari Medika (MM1) small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: **gi|2178105909|OM265281.1** Length: 635 Number of Matches: 1
Range 1: 335 to 435

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
175 bits(193)	1e-39()	98/101(97%)	0/101(0%)	Plus/Plus	

Anexo 3. *Aspergillus* sp. isolate GRUBIODEQ M6P21 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

Features:

Query 1 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT 60
 Sbjct 335 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT 394
 Query 61 GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKGGY 101
 Sbjct 395 GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKGGY 435

Penicillium crustosum strain CMO 19TL618 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Sequence ID: **gi|2177707194|OM258237.1** Length: 339 Number of Matches: 1
 Range 1: 188 to 288

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
175 bits(193)	1e-39()	98/101(97%)	0/101(0%)	Plus/Plus	

Features:

Query 1 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT 60
 Sbjct 188 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCT 247
 Query 61 GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKGGY 101
 Sbjct 248 GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGKGGY 288

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center](#) [Mailing list](#)

[YouTube](#)



• [National Library Of Medicine](#)



• [National Institutes Of Health](#)



• [U.S. Department of Health & Human Services](#)



• [USA.gov](#)

NCBI

[National Center for Biotechnology Information](#), [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA
[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

COVID-19 Information

[Public health information \(CDC\)](#)

[Research information \(NIH\)](#)

[SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#)

[Prevention and treatment information \(HHS\)](#)

[Español](#)

Continuación Anexo 3. *Aspergillus* sp. isolate GRUBIODEQ M6P21 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

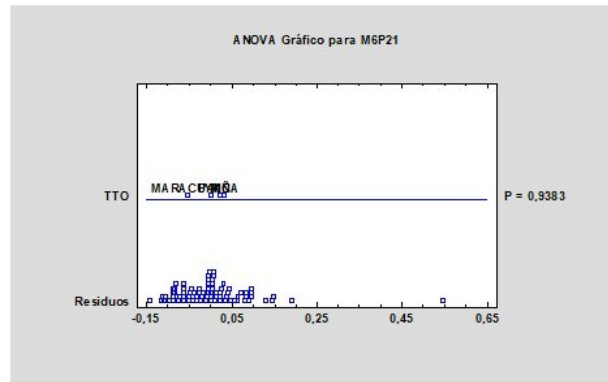


Tabla ANOVA para M6P21 por TTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,00358634	3	0,00119545	0,14	0,9383
Intra grupos	0,668231	76	0,00879251		
Total (Corr.)	0,671817	79			

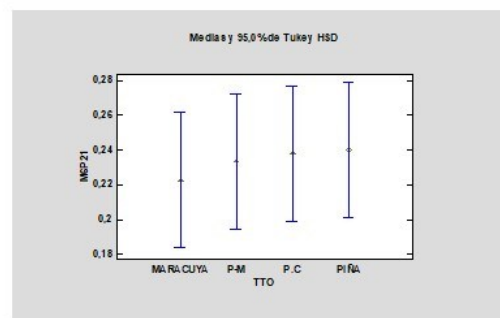


Tabla de Medias para M6P21 por TTO con intervalos de confianza del 95,0%

TTO	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
MARACUYA	20	0,222542	0,0209672	0,183597	0,261487
P-M	20	0,233579	0,0209672	0,194633	0,272524
P.C	20	0,238072	0,0209672	0,199127	0,277018
PIÑA	20	0,239691	0,0209672	0,200746	0,278636
Total	80	0,233471			

Pruebas de Múltiple Rangos para M6P21 por TTO

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

TTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MARACUYA	20	0,222542	X
P-M	20	0,233579	X
P.C	20	0,238072	X
PIÑA	20	0,239691	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MARACUYA - P-M		-0,0110365	0,0778904
MARACUYA - P.C		-0,0155305	0,0778904
MARACUYA - PIÑA		-0,017149	0,0778904
P-M - P.C		-0,004494	0,0778904
P-M - PIÑA		-0,0061125	0,0778904
P.C - PIÑA		-0,0016185	0,0778904

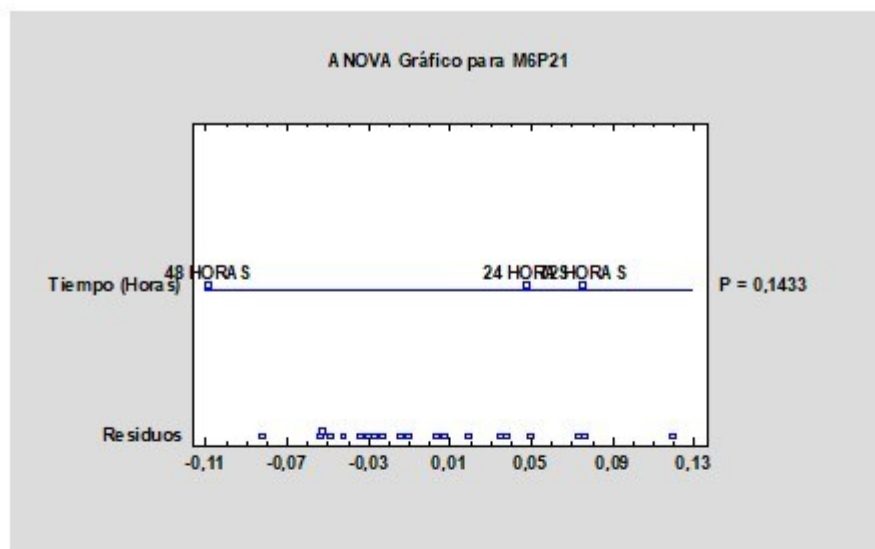
* indica una diferencia significativa.

intervalos de confianza del 95,0%

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MARACUYA - P-M		3,525	19,3872
MARACUYA - P.C		-4,075	19,3872
MARACUYA - PIÑA		-6,25	19,3872
P-M - P.C		-7,6	19,3872
P-M - PIÑA		-9,775	19,3872
P.C - PIÑA		-2,175	19,3872

* indica una diferencia significativa.

Anexo 4. Análisis estadístico de la actividad pectinolítica M6P21 por Tiempo (tratamiento 1, T1).



Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0131791	2	0,00658955	2,18	0,1433
Intra grupos	0,0513307	17	0,00301945		
Total (Corr.)	0,0645097	19			

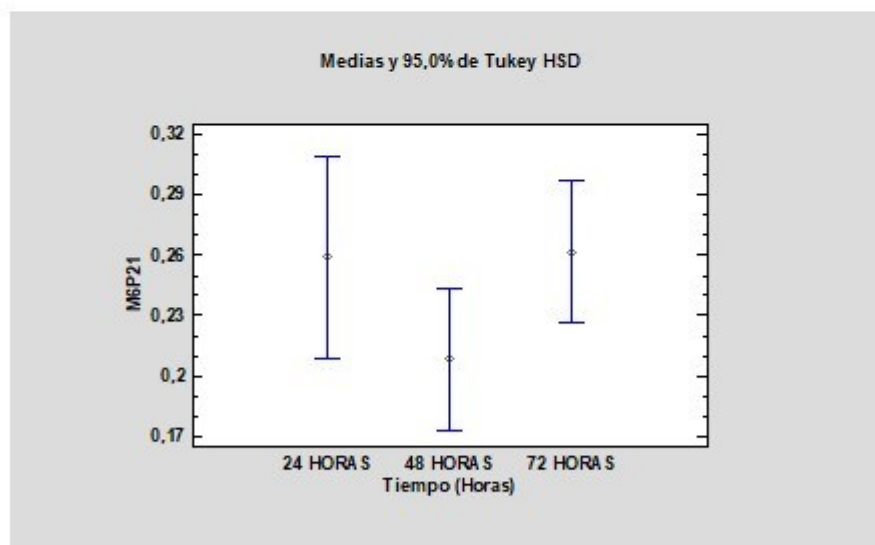


Tabla de Medias para M6P21 por Tiempo (Horas) con intervalos de confianza del 95,0%

			Error Est.		
Tiempo (Horas)	Casos	Media	(s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
24 HORAS	4	0,259153	0,0274748	0,209288	0,309017
48 HORAS	8	0,208267	0,0194276	0,173008	0,243527
72 HORAS	8	0,261384	0,0194276	0,226125	0,296643
Total	20	0,239691			

Los casos serían las repeticiones en cada tiempo

Anexo 4 A. Análisis estadístico de la actividad pectinolítica M6P21 por Tiempo (tratamiento 1, T1)

Effect of fungal microorganisms on promoting the growth of pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under controlled conditions

Efecto de microorganismos fúngicos en la promoción del crecimiento de plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en condiciones controladas

Valeria Fernández *, Verónica Rodríguez **, Luberto Sanchez ***, Rossana Timaure ****, Alexis Valery *****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.70662

ABSTRACT

The need for food production worldwide is constantly increasing, generating a deterioration of the environment, which requires the implementation of less harmful crop management techniques, one of these strategies is the use of microorganisms with the potential to increase plant growth. The evaluation of the effect of inoculation in pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds of nine fungal strains (HC1, HC2, HC3, HC4, LBH1, LBH33, LBH59, LBH9 and VP) was proposed. The seeds were sown in two types of tray sizes (128 and 200 alveoli) and the percentage of germination, stem length and diameter, root length, aerial and root dry weight were measured after five weeks of growth. The results show that the HC2 and LBH9 strains have the greatest potential to increase the variables evaluated under the study conditions. Just as there are strains that increase the growth of plants, there are also those that inhibit it, which makes it necessary to evaluate them in different crops to generate a proper management of them, optimizing the use of resources and, in turn, producing crops with better development of aerial parts and roots and, consequently, higher productivity.

Keywords: biofertilizers, crops, seed trays.

RESUMEN

La necesidad de producción de alimentos en todo el mundo aumenta constantemente generando un deterioro del medio ambiente, que requiere la implementación de técnicas de manejo de cultivos menos dañinas, Una de estas estrategias es el uso de microorganismos con el potencial de aumentar el crecimiento de las plantas. Fue propuesto la evaluación del efecto de la inoculación en semillas de pimentón (*Capsicum annuum* L.) con nueve cepas de hongos

* Ingeniero Agrónomo, Grupo de Investigación en Biotecnología Agrícola y Ambiental, Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Táchira, Venezuela. valerylinda1@gmail.com

** Ingeniero Químico. Grupo de Investigación en Biotecnología Agrícola y Ambiental, Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Táchira, Venezuela. veronicaalerm25@gmail.com

*** Magister en Agronomía. Grupo de Investigación en Biotecnología Agrícola y Ambiental, Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Táchira, Venezuela. lasanchez@unet.edu.ve

**** Doctora en Estadística, Instituto de Estadística, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. rttg@mail.com

***** Doctor en Ecología Tropical, Grupo de Investigación en Biotecnología Agrícola y Ambiental, Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Táchira, Venezuela. Correspondence: avalery@unet.edu.ve <https://orcid.org/0000-0003-2094-5418>

(HC1, HC2, HC3, HC4, LBH1, LBH33, LBH59, LBH9 y VP). Las semillas se sembraron en dos tipos de bandeja de siembra (128 y 200 alvéolos) y el porcentaje de germinación, longitud y diámetro del tallo, longitud de la raíz, peso seco aéreo y de la raíz, se midieron después de cinco semanas de crecimiento. Los resultados muestran que las cepas HC2 y LBH9 tienen el mayor potencial para aumentar las variables evaluadas bajo las condiciones del estudio. Del mismo modo que hay cepas que aumentan el crecimiento de las plantas, hay otras que las inhiben, lo que hace necesario evaluarlas en diferentes cultivos para generar un manejo adecuado de las mismas, optimizando el uso de los recursos y, a su vez, produciendo cultivos con un mejor desarrollo de las partes aéreas y las raíces y, en consecuencia, una mayor productividad.

Palabras claves: biofertilizantes, cultivos, bandejas de siembra.

Recibido: noviembre 29 de 2024

Aprobado: 10 de abril de 2025

INTRODUCTION

The rhizosphere is known as the fraction of soil next to the roots of plants (Kuppe *et al.*, 2022; Prasad *et al.*, 2019), where microorganisms are attracted by various metabolites that are exuded by the roots. Most of these nutrients not only benefit from nutrient secretion but also have a positive influence on plants through mechanisms involved in the stimulation of plant growth, such as the germination of seeds, rooting, and elongation of the stem, among other phenological and physiological characteristics, due to the production of compounds such as vitamins and phytohormones (Kloepper *et al.*, 1991; Santoyo *et al.*, 2019), in addition to the dissolution and mineralization of phosphates, sulfur oxidation, and increased availability of nitrogen (Franco, 2008; Raj *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2002; Saharan and Nehra, 2011). The relationships established in this context most of the time between beneficial microorganisms and plants are of the mutualistic type (Bastías *et al.*, 2022).

One of these mutualistic relationships that occur in the soil involves fungi and bacteria that are closely related to the roots of plants and that produce substances that regulate plant growth (Celis and Gallardo, 2008; Santoyo *et al.*, 2019); for example, Chang *et al.* (1986) refers to *Trichoderma harzianum* and its mechanisms of action that are based mainly on the stimulation of plant growth, which manifests from the earliest stages of seedling development and allows greater advantages when transplanting (Jamiolkowska and Michałek, 2019; Galeano *et al.*, 2002).

This potential has allowed a large number of species of microorganisms with specific functions in agriculture to improve plant productivity (Antón, 2004) through plant nutrition programs in the field or in protected systems. This new form of management promotes viable alternatives to reduce production costs and the environmental impact associated with chemical fertilization. According to various studies, this technology allows for an increase in the yield of crops between 17% and more than 50%,

as well as an improvement in soil fertility and a reduction in the population of microorganisms damaging crops (Liu *et al.*, 2020; Morales, 2013; Rai *et al.*, 2020).

Part of the success in the use of rhizospheric microorganisms is related to the type of crop with which one works, by presenting in many cases specificity between microorganisms and plants (Thomson *et al.*, 2010) as well as the viability, diversity and functioning of these soil microorganisms (Khenaka *et al.*, 2019). These findings therefore show that soil fertility depends not only on its chemical composition but also on the quantitative and qualitative nature of the microorganisms that inhabit it, among other conditions (Giri *et al.*, 2005; Shukla, 2019). The literature contains a large amount of information on the beneficial effects of the use of microorganisms on the growth and production of a wide range of crops, such as tomato, corn (do Amaral *et al.*, 2022), rice (Lee *et al.*, 2019), pepper (Linu *et al.*, 2019), and potato (Trdan *et al.*, 2019). Among others, the most common of these include the choice of microorganisms, potential for the crop and its incorporation in crop management, starting with the seed (Cisternas-Jamet *et al.*, 2019).

The objective of this study was to evaluate the effect of different strains of fungal microorganisms on the morphological characteristics of pepper plants cultivated in protected environments, with a view to determining the optimal plant-fungus ratio recommended for this growth stage. Furthermore, the investigation incorporated the utilization of trays of varying dimensions, with the aim of ascertaining the impact of the volume available for root growth on the seedlings.

MATERIALS AND METHODS

Fungal microorganism selection and inoculation of seeds.

Nine fungal strains were selected, all of them selected with the criterion of phosphate dissolution under laboratory conditions, and with potential to promote plant growth, being isolated from different plant rhizospheres:

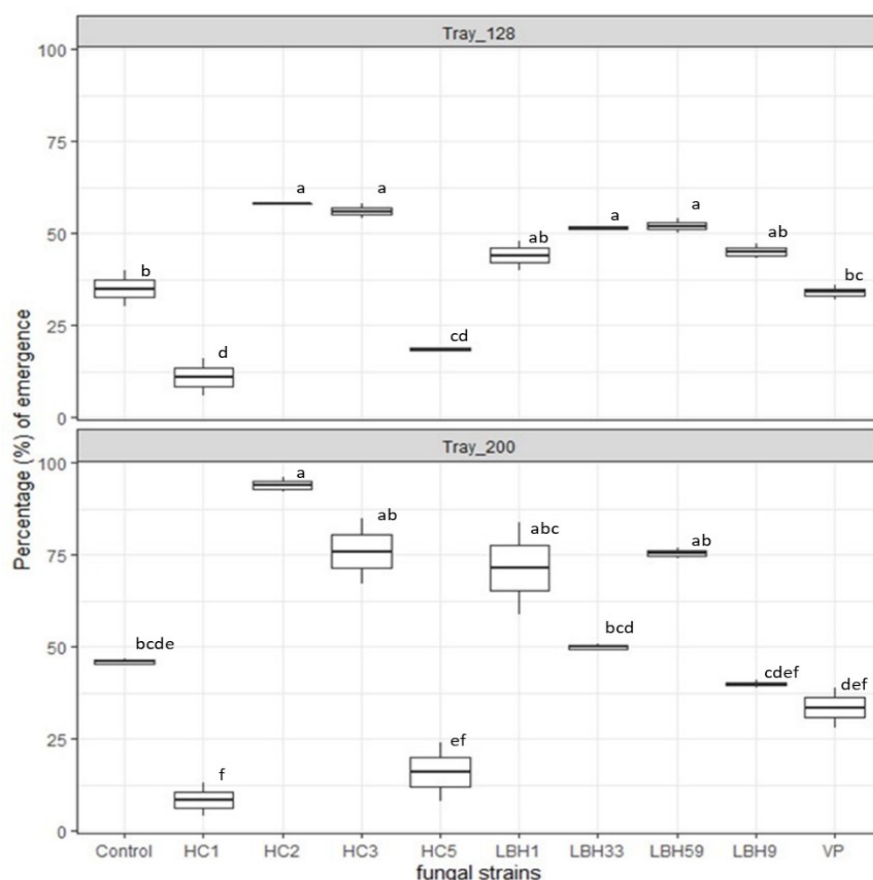


Figure 1. Percentage (%) of emergence of pepper plants according to treatment evaluated in trays with 128 and 200 alveoli. Different letters represent significant difference ($p_{\text{value}} < 0.05$) for each variable by tray type.

Penicillium spp strain HC1, HC2, HC3 and HC5 from the rhizosphere of coffee plants (*Coffea arabica* L.); *Penicillium* spp strain LBH01, *Aspergillus* sp. strain LBH09 and *Trichoderma* spp strain LBH33 from vetiver plants (*Chrysopogon zizanioides*); a strain of *Bauberia bassiana* strain LBH59; and one of *Trichoderma* sp. strain VP, which were obtained from the strain collection of Grupo de Investigación en Biotecnología Agrícola y Ambiental, Universidad Nacional Experimental del Táchira.

All the strains were seeded in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA) for activation. In this phase, the viability, purity and activity of the fungus were verified by means of the texture and coloration on both sides of the Petri dish, in addition to the production of resistance structures. A solution with each fungal strain was prepared at a concentration of 10^7 conidia.mL⁻¹.

The pepper seeds were washed with running water to eliminate the chemical products present and then with sterile distilled deionized water to eliminate the residual traces of these products. They were then dis-

infected by immersion in 80% ethanol for two minutes and washed five consecutive times with sterile distilled and deionized water to remove residual ethanol. finally, they were allowed to drain under sterile conditions in a laminar flow chamber.

The disinfected seeds were placed in the different solutions of pre-prepared fungal conidia, and sodium alginate (2%) was added to the suspension as an adherent. The suspensions were placed in an orbital shaker for one hour, at a temperature of 25°C. Finally, the inoculated material was transported to a laminar flow chamber, allowing the seeds to drain through a sterile medical gauze strainer until the seeds were dried at the ambient temperature of the laboratory (25°C).

Growth of pepper plants in trays of different sizes

The seeds were placed in horticultural trays of 128 and 200 cells, one tray per fungus strain, which were filled with commercial substrate previously sterilized. Subsequently, seven days after sowing, the evaluations began with the percentage of emergence. After 5 weeks, stem diameter,

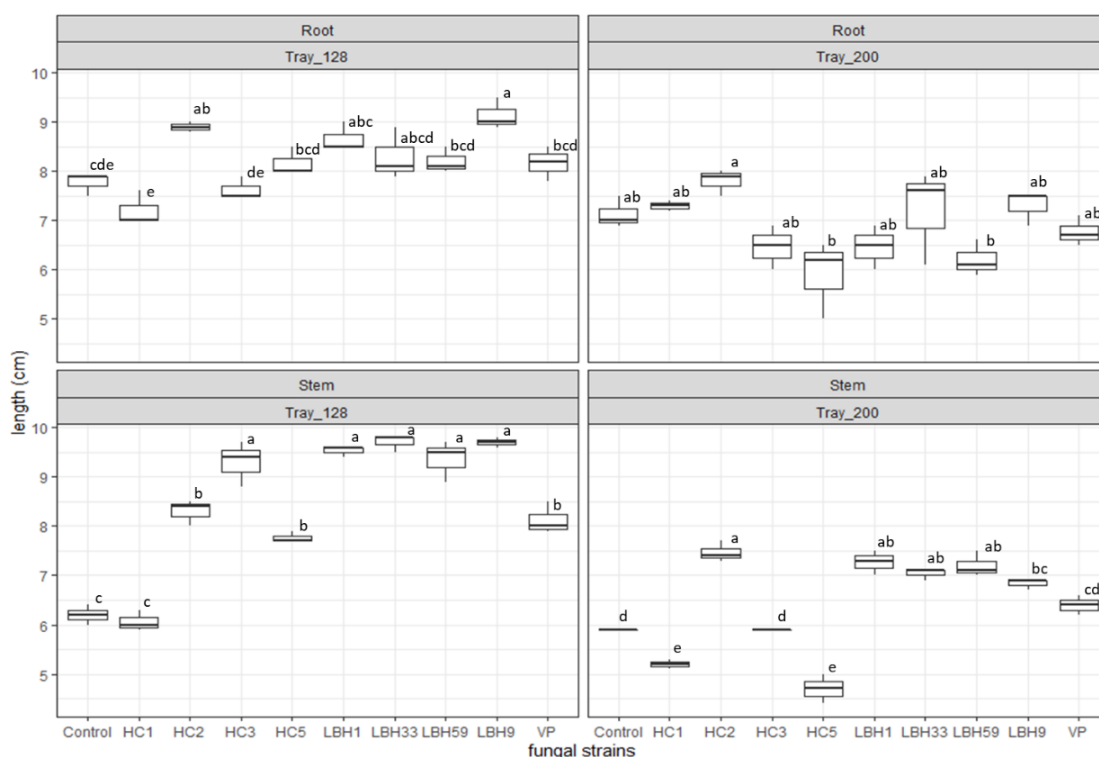


Figure 2. Effect of inoculation with fungal microorganisms on the length (cm) of the stem and on the root of pepper seedlings. Different letters represent significant difference ($p_{\text{value}} < 0.05$) for each variable by tray type.

stem and root length, and aerial and root dry weights of the seedlings were determined. The trays were kept in a greenhouse with constant irrigation management and temperatures ranging between 22 and 28°C. The aerial and root material, separately, was placed in labeled paper bags, dried and previously weighed on an analytical balance, and placed in an oven with forced air circulation at 70 °C for 72 hours for dry weight determination.

Statistical analysis

Three seedlings were randomly selected from the central part of each of the three trays, according to alveolus size, for each inoculated fungus strain, including the control (non-inoculated seed), for a total of nine experimental units per treatment. The results were analyzed descriptively, followed by an analysis of variance using the R-project/RStudio program.

RESULTS

Percentage of seedling emergence pepper

The percentage of emergence of the seedlings showed that there was an interaction between the evaluated factors and between the strains of the fungal microorganisms used and the size of the alveoli of the tray, suggesting that this variable responds randomly to both factors (Figure 1).

This led to the testing of media for each type of tray. Treatments that allow an increase in emergence compared to the control include, for example, treatments with strains 59, HC3 and HC2 in both types of trays. In contrast, there are treatments that seem to inhibit the emergence of seedlings due to the effect of the inoculated strain, such as strains HC1 and HC5. On the other hand, the favorable effect observed on the emergence of pepper plants with the use of trays containing 200 alveoli could be related to better drainage after irrigation, which was attributed to the lower proportion of substrate per alveolus.

Length of the stem, diameter of the stem and length of the root of pepper seedlings

The factorial statistical analysis revealed an interaction between the variables of stem length and diameter, and root length, with the strains and size of the alveoli. This indicates that modifying one of the conditions leads to alterations in the response, necessitating the evaluation of results based on tray size, akin to the approach employed for germination percentage. It is noteworthy that these three variables presented the highest values, especially in tray 128, compared to those of the 200 alveoli trays. A comparison with the control treatment revealed that, in both cases, the trays contained strains that enhanced the measured variable and others that inhibited it.

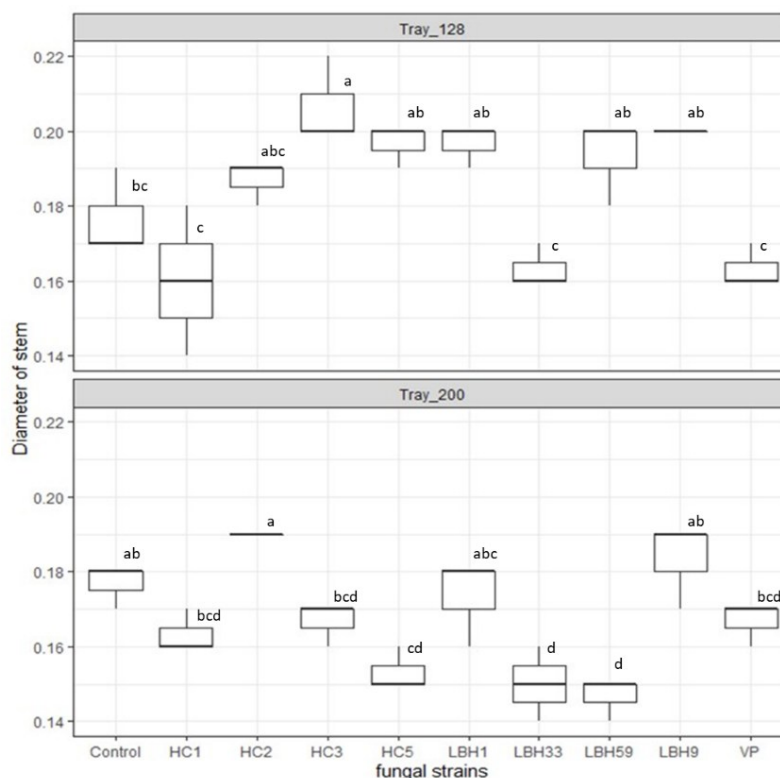


Figure 3. Effect of inoculation with fungal microorganisms on the diameter of the stem (cm) of pepper plants. Different letters represent significant difference ($p_{\text{value}} < 0.05$) for each variable by tray type.

In the 128 alveolar tray, stem length exhibited an increase in the presence of strains LBH33, LBH9, LBH1, LBH59 and HC3 (Figure 2) in comparison to the control and other strains. Furthermore, strain LBH9 resulted in increased root length, while strain HC3 led to augmented stem diameter (Figure 3). Conversely, strain HC1 exhibited an inhibitory effect on these variables in this type of trays (Figure 2 and 3).

In the case of 200-cell trays, stem length and diameter, and root length exhibited an enhancement in response to inoculation with fungal strain HC2 (Figures 2 and 3). Conversely, fungal strain HC5 exerted an inhibitory effect on stem and root length, while fungal strains LBH59 and LBH33 demonstrated an inhibition on stem diameter.

Dry weight of the aerial parts and roots of the pepper plants

The factorial analysis related to the dry weight of the aerial and root parts demonstrated no interaction between the factors evaluated, indicating a significant difference ($p_{\text{value}} < 0.05$) for the size of the alveoli. The results demonstrate that the trays exhibiting smaller alveoli produced plants with greater weight, both aerial and root (Figure 4). This phenomenon may be attributed to

the rapid identification of root limits by the roots, which stimulates increased root development towards the lower part of the alveolus in search of nutrients and water. Consequently, this may promote more vigorous aerial growth. Conversely, the increased planting density engenders competition among plants, thereby prompting accelerated growth in pursuit of light, culminating in enhanced aerial and root development.

When analyzing the type of tray separately, it was observed that for both the evaluated variables and the types of trays under study, there were no strains that were significantly different from those in the control treatment, and a numerical difference was presented on average. Among the dry weight of the aerial parts of the pepper plants planted in the trays of 128 alveoli, there were strains 59 and LBH9, while in the trays of 200 alveoli, except for strain HC5, all of which had average dry weights greater than that of the control. On the other hand, the dry weight of the roots was similar to that of the control plants, where for 128 trays, the average dry weight was greater for the HC2 and 59 strains, and for 200 trays, and the average dry weight was greater for the HC2 strain. It should be noted that depending on

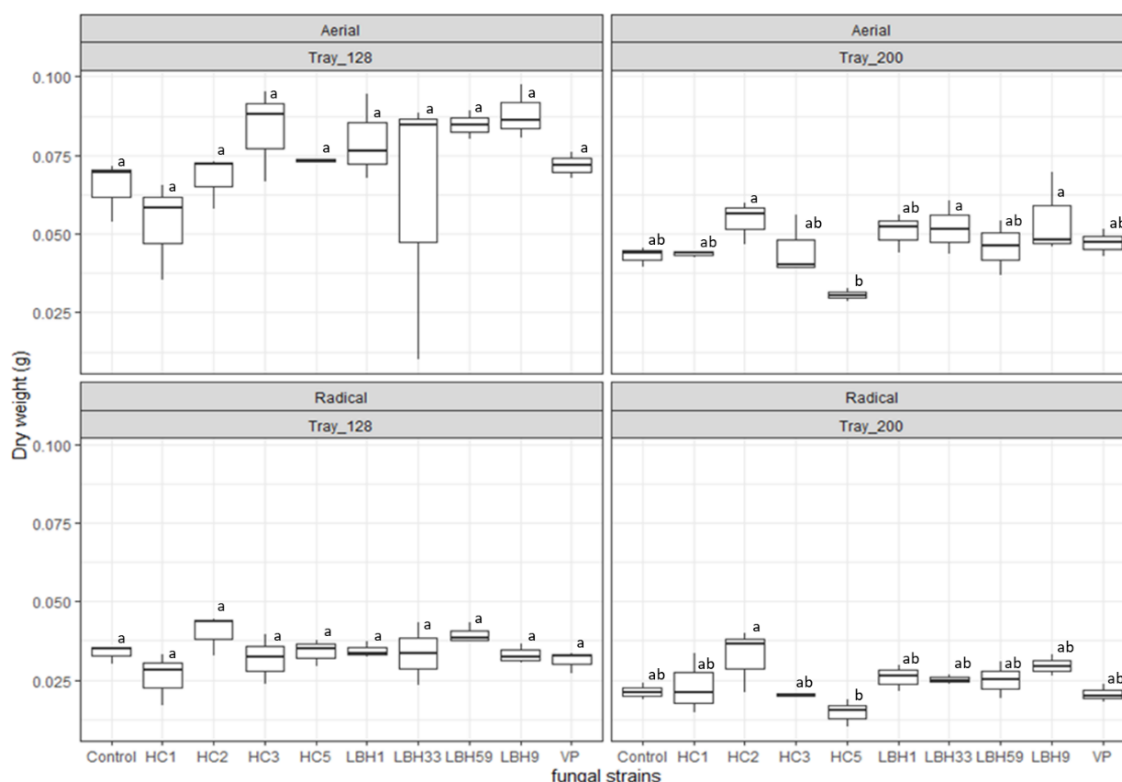


Figure 4. Effect of the inoculation of fungal microorganisms on the dry weight (g) of the stem and of the root of pepper seedlings. Different letters represent significant difference ($p_{\text{value}} < 0.05$) for each variable by tray type

the type of tray, a strain that gives lower averages to the control in both variables is presented for the trays of 128 the CH1 strain and for those of 200 the CH5 strain.

DISCUSSION

Percentage of seedling emergence pepper

The results of the effect on the inoculation of fungal microorganisms, of increase or inhibition of seed germination and emergence of seedlings, show the possible specificity of the strains with culture in this stage; likewise, different authors, who point out the capacity of certain microorganisms, for example, the *Penicillium* y *Trichoderma* strains (Odon *et al.*, 2020), of originating products such as gibberellins and indole acetic acid, among other compounds, which stimulate the germination of the seeds depending on the crop, are presented (Abdenaceur *et al.*, 2022; Tao *et al.*, 2019). Similarly, microorganisms have been reported to have negative effects on seed germination and the emergence of plants. An example of this phenomenon was presented by Reyes *et al.* (2008), who evaluated the effect of rhizospheric microorganisms on the germination of pepper seeds and reported that 10% of them inhibited the ger-

mination of plants, which could be related, among other conditions, to the production of substances such as phosphinothricin (Venkatachalam *et al.*, 2010).

Length of the stem, diameter of the stem and length of the root of pepper seedlings

In various investigations, similar results have been found for the use of strains of microorganisms to increase and promote growth in different agricultural crops (Alvarez and Reyes, 2015; Chakraborty *et al.*, 2010; Galeano *et al.*, 2002; Linu *et al.*, 2019) or, on the contrary, their negative effect (Rokni *et al.*, 2021). It is important to note that the influence of each strain on the variables is random. This means that an increase in one variable can be accompanied by a greater or equal increase in another variable, or alternatively, a negative effect may be exerted on the second variable. The influence will depend on the effect of the microbial strain on plants (Diniz *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2019). According to the literature (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2023; Sokolova *et al.*, 2011), this type of behaviour is related to the compounds generated by microorganisms, such as phytohormones and organic acids.

Dry weight of the aerial parts and roots of the pepper plants

Variables such as weight are related as part of the quality of the seedlings to be taken to the field and have a greater probability of establishment, which is possible with seed inoculation with growth-promoting microbial strains, similar results are presented by Reyes *et al.*, (2008) when finding microorganisms with biofertilizing potential that increased variables of agronomic importance in bell pepper, even when other microbial strains inhibited some variables. This last inhibition may be related, among other factors, to the sensitivity of the seed to the substances generated by the microorganisms and/or to the microbial concentration that competes for nutritional resources (Cardarelli *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 2020).

The response to microbial inoculation depends on the stage at which the inoculation was performed; for example, the results showed that the *Trichoderma* sp. strain can be inoculated into seeds and produce seedlings, although this approach is not among the best methods. In other investigations carried out with the *Trichoderma* sp. strain and rational applications of fertilizer, a tendency to increase yield per pepper plant under field conditions up to 18% was shown (Sánchez *et al.*, 2018). Similarly, when this strain was applied in combination with an *Enterobacter* sp. strain, the number of flower buds significantly improved by 62%, the height of the plant and the number of leaves by 23%, on average, compared to those in the control treatment (Sánchez and Reyes, 2018), which explains the effect that the inoculation of a microorganism can generate individually or in a microbial consortium on the growth of the plants according to the growth stage.

Additionally, the size of the alveoli of the tray is important for the response of both the plant and the inoculant (Vagnoni *et al.*, 2014). These factors are related to the volume of the alveoli of the trays and the increase in restriction of the roots of the plants; therefore, plants that grow in small volumes undergo morphological and physiological changes in response to this reduction. These changes affect the amount of compounds exuded by the plant in the root system, which could in turn influence the effect of the inoculated strains, demonstrating the complexity of the system (Chapin *et al.*, 2002).

CONCLUSIONS

The factor “valuable size of the tray” showed a significant difference in the morphological variables evaluated in the pepper seedlings and in the effect of the inoculated strains, revealing that the tray with 128 alveoli presented the best behavior.

While various strains can be inoculated at the tray level, various strains can be inoculated to improve the growth of paprika plants. In this sense, the strain LBH9 influences the length of the stem, the radical length and the dry weight of the aerial part of the plant, while for radical dry weight, the strain HC2 and the diameter of the stem are the strains. This raises the possibility and need to evaluate the use of these consortiums during the production of seedlings.

The presence of strains that inhibit the variables evaluated shows the need to evaluate the compatibility of crops with potential microorganisms for plant development, seeking to avoid production loss due to incompatibilities.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, Alexis Valery and Rossana Timaure; methodology, Valeria Fernandez, Alexis Valery and Luberto Sanchez; software, Rossana Timaure; validation, Veronica Rodriguez and Alexis Valery; formal analysis, Valeria Fernandez and Luberto Sanchez; research, Valeria Fernandez and Alexis Valery; resources, Luberto Sanchez; original drafting, Valeria Fernandez, Veronica Rodriguez and Alexis Valery; writing, revising and editing, Veronica Rodriguez and Alexis Valery; visualization, Alexis Valery; supervision, Alexis Valery; project management, Luberto Sanchez. Project management, Luberto Sanchez; project management, Luberto Sanchez; and fundraising, Luberto Sanchez.

FUNDING

This research was funded by the Decanato de Investigación, Universidad Nacional Experimental del Táchira, under the 02-001-2022 project

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of the data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

REFERENCES

- Abdenaceur, R., Farida, B. T., Mourad, D., Rima, H., Zahia, O., & Fatma, S. H. (2022). Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth. *International Microbiology*, 25(4), 817-829.
- Alvarez, L., & Reyes, I. (2015) Microagregados rizosféricos de vetiver con inoculación fungica y aplicación

- de roca fosforica en suelos carboniferos. XXI congreso venezolano de la cs. Del suelo, 1-5.
- Antón, F. (2004). Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud. An. R. Acad. Farm, 743-776.
- Bastías, D. A., Applegate, E. R., Johnson, L. J., & Card, S. D. (2022). Factors controlling the effects of mutualistic bacteria on plants associated with fungi. *Ecology Letters*, 25(8), 1879-1888.
- Cardarelli, M., Woo, S. L., Roupheal, Y., & Colla, G. (2022). Seed treatments with microorganisms can have a biostimulant effect by influencing germination and seedling growth of crops. *Plants*, 11(3), 259.
- Celis, L. & Gallardo, I. (2008). Estandarización de métodos de detección parapromotores de crecimiento vegetal (Acido Indol-acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 159 pp.
- Chakraborty, B., Chakraborty, U., Sha, A., Sunar, K. & Dey, P. (2010). Evaluation of phosphate solubilizers from soils of North bengal and their diversity analysis. *World Journal of Agricultural Sciences* 6(2):195-200.
- Chang, Y. C., Chang, Y. C., Baker, R., Kleifeld, O., & Chet, I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70: 145 – 148.
- Chapin III, F., Matson, P., & Mooney, H. (2002). Principles of terrestrial ecosystem ecology. *Springer*, pp 436.
- Cisternas-Jamet, J., Salvatierra-Martínez, R., Vega-Gálvez, A., Uribe, E., Goñi, M. G. & Stoll, A. (2019). Root inoculation of green bell pepper (*Capsicum annuum*) with *Bacillus amyloliquefaciens* BBC047: effect on biochemical composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 30:99 (11):5131-5139.
- Diniz, K. A., Silva, P. D. A., Oliveira, J. A., & Evangelista, J. R. E. (2009). Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms and coating with micro-nutrients, aminoacids and plant growth regulators. *Scientia Agrícola*, 66, 293-297.
- do Amaral Júnior, W. E., Esteves, F. R., de Menezes Filho, A. C. P., & Ventura, M. V. A. (2022). Evaluation of *Azospirillum brasilense* dose response on fresh and dry matter of shoot and root of corn plants. *Revista de Agricultura Neotropical*, 9(4), e6993-e6993.
- Franco, C. (2008). Evaluación de caracteres PGRP en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral. España. Universidad de Granada.
- Galeano Revert, M., Méndez, F., & Urbaneja, A. (2002). Efecto de *Trichoderma harzianum* Fifai (cepa T-22) sobre cultivos hortícolas. *Agrícola vergel*, 21(251), 628-632.
- Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, R., & Varma, A. (2005). Microbial diversity in soils. *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*, Springer- Verlag. Berlin, 19-55.
- Jamiołkowska, A., & Michałek, W. (2019). Effect of mycorrhiza inoculation of pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) on the growth and protection against *Fusarium oxysporum* infection. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 18(1), 161-169.
- Khenaka, K., Canfora, L., Benedetti, A., Leulmi, N., & Boulahrouf, A. (2019). Effect of *Capsicum annuum* cultivated in sub-alkaline soil on bacterial community and activities of cultivable plant growth promoting bacteria under field conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(10): 1417-1430.
- Kloepper, J. W., Zablutowicz, R. M., Tipping, E. M., & Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. En: Keister DL, Cregan PB, eds. The rhizosphere and plant growth. Dordrecht, Netherlands: *Kluwer Academic Publishers*. 315-326
- Kuppe, C. W., Schnepf, A., von Lieres, E., Watt, M., & Postma, J. A. (2022). Rhizosphere models: their concepts and application to plant-soil ecosystems. *Plant and Soil*, 474(1), 17-55.
- Lee, K.-E.; Adhikari, A.; Kang, S.-M.; You, Y.-H.; Joo, G.-J.; Kim, J.-H.; Kim, S.-J. & Lee, I.-J. (2019). Isolation and Characterization of the High Silicate and Phosphate Solubilizing Novel Strain *Enterobacter ludwigii* GAK2 that Promotes Growth in Rice Plants. *Agronomy*. 9: 144.
- Linu, M. S., Asok, A. K., Meenu Thampi, J., Sreekumar & Jisha M. S. (2019). Plant Growth Promoting Traits of Indigenous Phosphate Solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Chilli (*Capsicum annuum* L.) Rhizosphere, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 50(4): 444-457.
- Liu, Q., Meng, X., Li, T., Raza, W., Liu, D., & Shen, Q. (2020). The growth promotion of peppers (*Capsicum annuum* L.) by *Trichoderma guizhouense* NJAU4742-based biological organic fertilizer: Possible role of increasing nutrient availabilities. *Microorganisms*, 8 (9), 1296.
- Morales Guzmán, J. (2013). Evaluación de la producción y calidad de pimienta (*Capsicum annuum* L.) Cvcannon obtenido mediante biofertilización (Doctoral dissertation).
- Odoh, C. K., Eze, C. N., Obi, C. J., Anyah, F., Egbe, K., Unah, U. V. & Adobu, U. S. (2020). Fungal biofertilizers for sustainable agricultural productivity. *Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture*:

Volume 1: Perspective for Diversity and Crop Productivity, 199-225.

- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Santoyo, G., & Glick, B. R. (2023). Recent advances in the bacterial phytohormone modulation of plant growth. *Plants*, 12(3), 606.
- Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M., & Jat, L. K. (2019). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture: Perspectives and Challenges, Chapter Seven Pages 129-157, in PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture Editor(s): Amit Kishore Singh, Ajay Kumar, Pawan Kumar Singh. Woodhead Publishing.
- Rai, P. K., Singh, M., Anand, K., Saurabh, S., Kaur, T., Kour, D., Nath Yadav, A. & Kumar, M. (2020). Role and potential applications of plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agriculture. In New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Elsevier. pp. 49-60.
- Raj, S. N., Shetty, N. P., & Shetty, H. S. (2005). Synergistic effects of Trichoshield on enhancement of growth and resistance to downy mildew in pearl millet. *Bio-Control*, 50, 493-509.
- Reyes, I., Álvarez, L., El-Ayoubi, H. & Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*. 20 (1):37-48.
- Reyes, I., Bernier, L., & Antoun, H. (2002). Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. *Microbial Ecology*, 44, 39-48.
- Rokni, N., Alizadeh, H. S., Bazgir, E., Darvishnia, M. & Mirzaei-Najafgholi, H. (2021). The tripartite consortium of *Serendipita indica*, *Trichoderma simmonsii*, and bell pepper (*Capsicum annum*). *Biological Control*, 158, 104608.
- Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.
- Sánchez, L. & Reyes, I. (2018). Incidencia de la inoculación con microorganismos rizosféricos benéficos y roca fosfórica sobre el crecimiento del pimentón. *Revista Científica UNET*. 30(1):122-128.
- Sánchez, L., Dávila, B., Briceño, J. & Valery, A. (2018). Los biofertilizantes como una herramienta de la agricultura sostenible en los cultivos del pimentón y del café. *Revista Científica UNET*. 30(2):435-443.
- Santoyo G., Sánchez-Yáñez J.M. and de los Santos-Villalobos S. (2019). Methods for Detecting Biocontrol and Plant Growth-Promoting Traits in Rhizobacteria. Chapter 8. 133-149 In: Reinhardt D., Sharma A. (eds) Methods in Rhizosphere Biology Research. *Rhizosphere Biology*. Springer, Singapore
- Shukla, A. K. (2019). Ecology and Diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Landscape, Chapter One - Pages 1-15, in PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture Editor(s): Amit Kishore Singh, Ajay Kumar, Pawan Kumar Singh. Woodhead Publishing.
- Sokolova, M. G., Akimova, G. P., & Vaishlya, O. B. (2011). Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47, 274-278.
- Tao, S., Wu, Z., Wei, M., Liu, X., He, Y. & Ye, B. (2019). *Bacillus subtilis* SL-13 biochar formulation promotes pepper plant growth and soil improvement. *Canadian Journal of Microbiology*. 65:333-342
- Thomson, B. C., Ostle, N., McNamara, N., Bailey, M. J., Whiteley, A. S., & Griffiths, R. I. (2010). Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. *Microbial ecology*, 59, 335-343.
- Trdan, S., Vučajnk, F., Bohinc, T. & Vidrih, M. (2019). The effect of a mixture of two plant growth-promoting bacteria from Argentina on the yield of potato, and occurrence of primary potato diseases and pest – short communication, *Acta Agriculturae Scandinavica*, Section B – Soil & Plant Science, 69(1): 89-94.
- Vagnoni, R., Buyatti, M. & Favaro, J. (2014). Efecto del tamaño de celda de bandejas de siembra sobre la morfología y fisiología de plantines de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Cátedra de Cultivos Intensivos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral. P. Kreder 2805 (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina.
- Venkatachalam, P., Ronald, J., & Sambath, K. (2010). Effect of soil *Streptomyces* on seed germination. *Int. J. Pharma. BioSci*. 1:145- 155.
- Xiao, Z., Zou, T., Lu, S., & Xu, Z. (2020). Soil microorganisms interacting with residue-derived allelochemicals effects on seed germination. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(4), 1057-1065.

Optimizing *ex vitro* Acclimatization of *Cinchona* spp.: Towards the establishment of an industrial crop in Colombia

Optimización de la aclimatación *ex vitro* de *Cinchona* spp.: Hacia el establecimiento de un cultivo industrial en Colombia

Juan David Saavedra Correa*, Silvia Lizette Bustamante Rodríguez**, Robert Theiler***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.118377

ABSTRACT

Efforts to optimize *ex vitro* transfer techniques of un-rooted *in vitro* shoots of *Cinchona* spp. (Rubiaceae) a native tree of the andean forests, are crucial for promoting sustainable cultivation practices of this medicinal plant. Renowned for its historical significance and effectiveness in treating malaria and other ailments, the tree holds a prominent position in botanical research, food industry, and pharmaceutical applications due to its production of alkaloids such as quinine and quinidine. This study aimed to improve the acclimatization process of un-rooted *in vitro* shoots of *Cinchona*, facilitating their transplantation to field conditions for establishing a plantation in Colombia. The results revealed that compared to commercial available substrates (pH higher than 5.5), the utilization of peat moss substrate (pH lower than 4 and electric conductivity lower than 100 $\mu\text{S} / \text{cm}^{-1}$) led to significantly higher survival rates (>87%) and improved growth outcomes. This underscores the efficacy of peat moss in facilitating the acclimatization process of *ex vitro* plants over a 12-week period, ensuring robust development and survival of the plants, which guarantees vigorous specimens for field plantation.

Key words: *Cinchona*, *Ex vitro* transfer, Acclimatization, Unrooted shoots.

RESUMEN

Los esfuerzos para optimizar las técnicas de transferencia *ex vitro* de brotes no enraizados *in vitro* de *Cinchona* spp. (Rubiaceae), un árbol nativo de los bosques andinos, son cruciales para promover prácticas de cultivo sostenible de esta planta medicinal. Reconocida por su importancia histórica y su eficacia en el tratamiento de la malaria y otras dolencias, la planta ocupa una posición destacada en la investigación botánica, la industria alimentaria y las aplicaciones farmacéuticas debido a su producción de alcaloides como la quinina y la quinidina. Este estudio tuvo como objetivo mejorar el proceso de aclimatación de los brotes de *Cinchona* propagados *in vitro* no enraizados, facilitando su trasplante a condiciones de campo y sentando las bases para establecer una plantación en Colombia. Los resultados revelaron que, en comparación con los sustratos comerciales disponibles (pH superior a 5.5), la utilización de sustrato

* MSc - Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Mail: jusaavedrac@unal.edu.co - <https://orcid.org/0000-0003-1527-0428>

** MSc - Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Mail: slbustamanter@unal.edu.co - <https://orcid.org/0000-0002-2595-9758>

*** PhD - Formerly Horticultural Department, Agroscope Changins-Wädenswil, Wädenswil, Switzerland. Mail: theiler.robert.colombia@gmail.com - <https://orcid.org/0009-0003-3705-6542>

de turba (pH inferior a 4 y conductividad eléctrica inferior a 100 $\mu\text{S} / \text{cm}^{-1}$) condujo a tasas de supervivencia significativamente más altas (>87%) y mejores resultados de crecimiento. Esto destaca la eficacia de la turba en la facilitación del proceso de aclimatación de plantas *ex vitro* durante un período de 12 semanas, asegurando un desarrollo y supervivencia robustos de las plantas, lo que garantiza especímenes vigorosos para la plantación en campo.

Palabras clave: Cinchona, Transferencia *ex vitro*, Aclimatación, Brotes no enraizados.

Recibido: enero 17 de 2025

Aprobado: 10 de abril de 2025

INTRODUCTION

Originating in the Andean regions of Bolivia, Peru, Ecuador, and Colombia, *Cinchona spp.* holds a profound historical significance as a traditional remedy known as "quina-quina" for treating symptoms of fever (Taylor, 1943). The bark of the Cinchona tree is highly valued for its bioactive alkaloids—quinine, quinidine, cinchonine, and cinchonidine—which confer its medicinal properties (Schaepmeester, 2021). In addition, due to the bitter taste, quinine is actively used in the beverage industry for producing tonic water (Nikolaeva *et al.*, 2019; Pain, 2019). Global production of Cinchona alkaloids is estimated at approximately 600 tons per year, with 40% destined to the food and beverage industry and 60% for pharmaceutical applications (Schaepmeester, 2021; Yip *et al.*, 2023). This high global demand for Cinchona bark and its derivatives underscores the critical need for sustainable cultivation practices, to ensure the availability of the resource.

The therapeutic use of cinchona trees dates back to the early 16th century, when Spanish colonizers documented that indigenous Andean civilizations used their bark to treat fevers (Díaz-Piedrahita, 2003; Sandoval & Echandía, 1986). By the 17th century, Jesuit missionaries in Peru recognized its therapeutic effectiveness in combating malaria (Jaramillo-Arango, 1949; Achan *et al.*, 2011), in the following decades, the cinchona bark trade to Europe became popular; however, concerns about over-exploitation increased in the 18th century, prompting scientific expeditions to the Andean mountains by Dutch, English, and French scientists in the mid-19th century, to obtain seeds and seedlings and start plantations in their colonies (Taylor, 1943; Crawford, 2014, 2016). Subsequently, the establishment of Cinchona plantations in Java (Indonesia), India, and Africa, during the late 19th century transformed the global Cinchona bark trade and malaria treatment (Roersch van der Hoogte & Pieters, 2014).

In the 20th century, efforts to improve Cinchona plantations productivity were established in central Africa by the Dutch, Belgians, and Germans at Bukavu, Democratic

Republic of Congo (Pharmakina SA, 2016). However, the spread of Cinchona root disease caused by the soil-borne pathogen *Phytophthora cinnamomi* led to high losses of trees in certain plantations (Theiler, 2014). Pharmakina S.A. initiated a project with ACW (Agroscope Changins-Wädenswil, Switzerland) to identify and multiply *P. cinnamomi* tolerant plants (mainly obtained by seed-grown field plants) through *in vitro* techniques. Some of these *P. cinnamomi* tolerant Cinchona genotypes were kept *in vitro* at ACW and eventually transferred to the Tissue Culture laboratory at the Instituto de Biotecnología (IBUN) at the Universidad Nacional de Colombia for *in vitro* micro-propagation and *ex vitro* acclimatization (Theiler, 2014). This attempt is part of a broader initiative to establish a small plantation in Colombia to produce cinchona bark. These undertakings are indispensable for initiating a sustainable cultivation and preservation of the Cinchona tree in Cundinamarca, Colombia.

In vitro culture techniques provide a disease-free controlled environment for the massive propagation of Cinchona plants in short periods (Armijos-González & Pérez-Ruiz, 2016; Moraes *et al.*, 2021; Vivanco-Galván *et al.*, 2022; Duta-Cornescu *et al.*, 2023), setting the foundation for subsequent transplantation to field conditions. However, the transition from *in vitro* to *ex vitro* conditions poses significant challenges. *In vitro* plants are characterized by underdeveloped cuticles and low stomatal functionality, making them highly susceptible to desiccation, transplant shock, and nutrient deficiencies when transferred to *ex vitro* environments (Perea Dallos *et al.*, 2009; Mahendra *et al.*, 2020). Consequently, this step impacts plant survival and growth rates; thus, micropropagated plants often lack the physiological adaptations necessary to survive *ex vitro*, leading to reduced survival rates and hindered growth (Oakes *et al.*, 2020; Shiwani *et al.*, 2022).

Therefore, optimizing *ex vitro* acclimatization techniques becomes essential for starting sustainable cultivation and conservation practices for *Cinchona spp.*, improving plant health and overall productivity. Several studies have focused on the *in vitro* conservation of Cinchona species (Hunter, 1972; Armijos-González & Pérez-Ruiz, 2016; Lima-Jimenez, 2018; Serrano *et al.*, 2019; Vivanco-

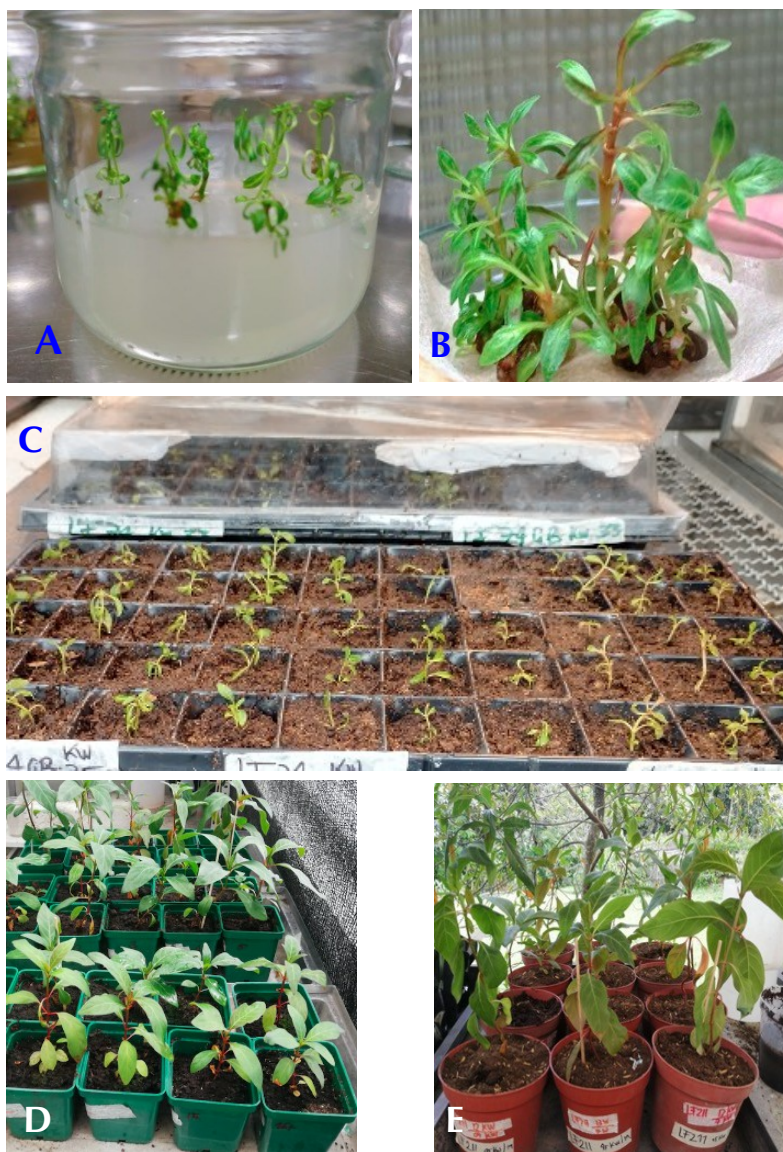


Figure 1. Acclimatization *ex vitro* of *Cinchona* spp. genotypes. (a) Freshly subculture shoots *in vitro*. (b) Clusters of micropropagated *in vitro* shoots after 12-week culture period. (c) Un-rooted *in vitro* shoots were transferred to seedling trays for the initial stage of the acclimatization phase. (d) After 12 weeks of acclimatization with substrate S5. (e) *Cinchona* plants are ready for transfer to soil after 6 months under shade conditions.

Galván *et al.*, 2022), nevertheless, there is a lack of research related to the *ex vitro* acclimatization process in cinchona. To address this knowledge gap, this study aims to refine *ex vitro* acclimatization techniques for *Cinchona* spp. by evaluating various substrates, facilitating the transition of *in vitro* plants to field conditions, as well as the long-term preservation of this economically significant plant species and establishing a future sustainable production system in Colombia.

MATERIALS AND METHODS

Selection of Plant Material

Four different genotypes of *Cinchona* spp. hybrids of *Cinchona calisaya* (formerly *C. ledgeriana*) and *Cinchona pubescens* (formerly *C. succirubra*) (Andersson, 1998; Schaepmeester, 2021), were selected based on their potential tolerance to the pathogen *Phytophthora cinnamomi*. These selections were part of a research project between Pharmakina (DRC) and ACW

Table 1. pH and Conductivity average values of each substrate evaluated during the acclimatization stage.

Substrate	pH	Electric Conductivity (EC)
		$\mu\text{S} / \text{cm}^{-1}$
(S1) Compost / Garden soil (1:1)	7.00	90
(S2) Sandy Soil	5.10	<50
(S3) Commercial garden soil (Anasac®)	5.25	320
(S4) Peat substrate / Commercial garden Soil (Anasac®) (1:1)	5.38	910
(S5) Peat moss substrate (Pindstrub®)	3.73	86

(Switzerland), aimed at ensuring a sustainable quinine bark supply in central Africa nearly four decades ago. These genotypes, identified as LC29, LF211, LF40, LF74 and LF74GB (an *in vitro* selection of LF74 with larger leaf blades), were transferred to the laboratory of Plant Tissue Culture at the Instituto de Biotecnología (IBUN) of the Universidad Nacional de Colombia, in Bogotá, approximately ten years ago (Theiler, 2014).

Before acclimatization, the Cinchona plants were maintained and propagated *in vitro* by shoots in a modified Murashige and Skoog (M&S) medium supplemented with 1 mg/L of benzylaminopurine (BAP) and 0.1 mg/L of indole-3-butyric acid (IBA) (Hunter, 1979), in glass jars of 300 and 450 ml (Figure 1a), *in vitro* subcultures were performed every 12 weeks to prepare the plants for transfer to *ex vitro* conditions (Figure 1b). Maintaining a temperature range of $24^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, with a photoperiod consisting of 14 hours of light and 10 hours of darkness under white light, at an intensity of $25\text{--}35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photon flux density (PFD).

Acclimatization and Substrate Selection

In vitro shoots from each Cinchona genotype, with a minimum of three pairs of leaves, without roots and a length of ≥ 2 cm, were chosen for the acclimatization and hardening phase. This selection process aligns with established protocols recognized for enhancing plant adaptability to external conditions (Jagiello-Kubiec *et al.*, 2021; Shiwani *et al.*, 2022). The rootless shoots were placed in seedling trays (Figure 1c) equipped with transparent plastic covers, which created a microenvironment conducive to maintaining humidity levels for four weeks, facilitating a gradual transition from *in vitro* to *ex vitro* conditions.

Initially, a preliminary experiment was conducted to assess the survival rates of the selected shoots across five substrate variations: compost and garden soil mix (1:1) (S1), Sandy soil (S2), Commercial garden soil (Anasac®)

(S3), peat substrate mixed with commercial garden soil (1:1) (S4), and peat moss substrate (Pindstrub®) (S5) (Table 1).

The trays were placed in a greenhouse at the IBUN, to maintain optimal controlled environmental conditions, with a temperature range of $25\text{--}28^{\circ}\text{C}$ during the day and $17\text{--}22^{\circ}\text{C}$ during the night, and an exposure to 12 hours of daily light with a light intensity between 16 to $24 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and a relative humidity (RH%) level above 70%. After four weeks the survival rate was calculated according to the equation: Survival Rate (%) = (Number of surviving plants / Total number of plants) $\times 100$.

Second stage of acclimatization

Upon completion of the initial acclimatization phase, the plant shoots were exposed to ambient conditions by gradually removing the covers, allowing them to adapt incrementally to environmental conditions. Additionally, plants were watered two times per week and received a sprayed foliar fertilization with a diluted M&S medium salts solution at pH 5.8 every two weeks. During twelve weeks' period, continuous monitoring of plant growth parameters, including shoot length, nodes, and leaf count, was conducted to evaluate the effectiveness of the acclimatization technique employed.

Data collection, and statistics analysis

During the initial stage, 100 un-rooted *in vitro* shoots (20 per genotype) were planted in each of the five substrates under evaluation to assess viability based on survival rates. After identifying the substrate with the highest survival rate in a period of four weeks, the main experiment proceeded with 15 *in vitro* rootless shoots per Cinchona genotype chosen as replicates, which was repeated three times over the course of a year. Observations on shoot length, leaf pairs, and node number, were recorded during 12th week after transfer to *ex vitro* conditions. The final survival rate and growth parameters

data were analyzed statistically using the nonparametric Kruskal-Wallis Test (Kruskal & Wallis, 1952), as the data did not meet the assumptions of normality and homogeneity of variances. The differences amongst the mean values ($P < 0.05$) were calculated by Wilcoxon signed-rank test using the R program (v.4.0.5. R Development Core Team, 2021). All the results are presented in the form of mean \pm SD.

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro multiplication

Five *in vitro* genotypes of *Cinchona spp.* originating from established Congolese plantations (Theiler, 2014), were micropropagated using a modified MS medium (Hunter, 1979). The micropropagation resulted in plant clusters with shoots ranging from 2 to 3 cm in length within a three-month subculture cycle (Figure 1b). Before the acclimatization phase, it was determined to exclude the *in vitro* rooting phase as part of protocol optimization efforts, recognizing the inherent complexities associated with *in vitro* rooting, including plant recalcitrance and slow root initiation particularly in woody plants species including *Cinchona tree* (Abdalla *et al.*, 2022).

Survival rates in the different substrates

Rootless shoots were transplanted into the five soil substrates under evaluation (Table 1), throughout the initial 4-week acclimatization period in the greenhouse. Shoots of *Cinchona spp.* were covered during this phase to facilitate the hardening process while maintaining high humidity levels. After this period, the average survival rate

was assessed (Figure 2). The peat moss substrate (S5) yielded an 87.3% survival rate, which was significantly higher ($P < 0.05$) compared to the survival rates in the other remaining substrates (S1, S2, S3, and S4). where the survival rate dropped to below 20%.

Survival rates following the initial stage of acclimatization exhibited a pronounced inclination towards acidic soils, the experiment indicated the limitation to successfully establish *in vitro* shoots in soils where the pH concentration is above 5.5. Consequently, peat moss substrate (Pindstrub®) (S5) was selected as the optimal choice with an average pH of 3.65 and electrical conductivity (EC) of $86 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$. S5 is characterized by having a low pH, high water retention capacity, and high porosity (Shin *et al.*, 2012; Pandey *et al.*, 2019). These properties are advantageous for rootless shoots as they ensure consistent moisture around the developing basal area where root initiation typically occurs, accompanied by the promotion of soil aeration ensuring sufficient oxygen supply necessary for gas exchange and nutrient absorption (Clapa *et al.*, 2013; Ben & Friedman, 2018). Additionally, the combination of low EC and acidic nature could probably have minimized salt stress in the micropropagated plants and could have provided a more balanced and readily available nutrient source compared to higher EC substrates (Prasad, 2022). Furthermore, in the peat moss substrate (S5), survival rates were consistent across all genotypes, with no significant differences in survival rates between them ($P > 0.05$). This commercial substrate stood out for its performance compared to others evaluated, emphasizing its uniform

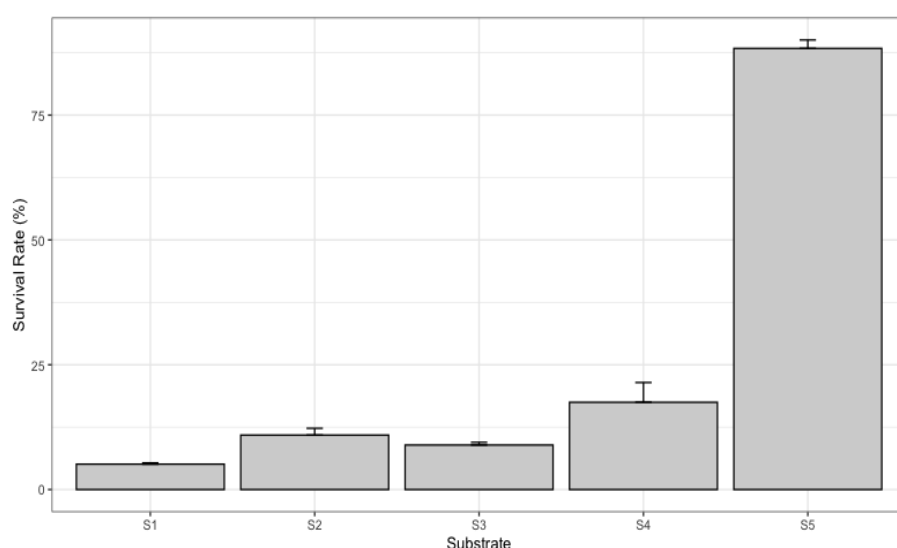


Figure 2. Effect of different substrates on *ex vitro* survival percentage of *Cinchona* rootless shoots during 4 weeks, S1 - Compost and garden soil mix (1:1), S2 - Sandy soil, S3 - Commercial garden soil (Anasac®), S4 - Peat substrate mixed with commercial garden soil (1:1), and S5 - Peat moss substrate (Pindstrub®).

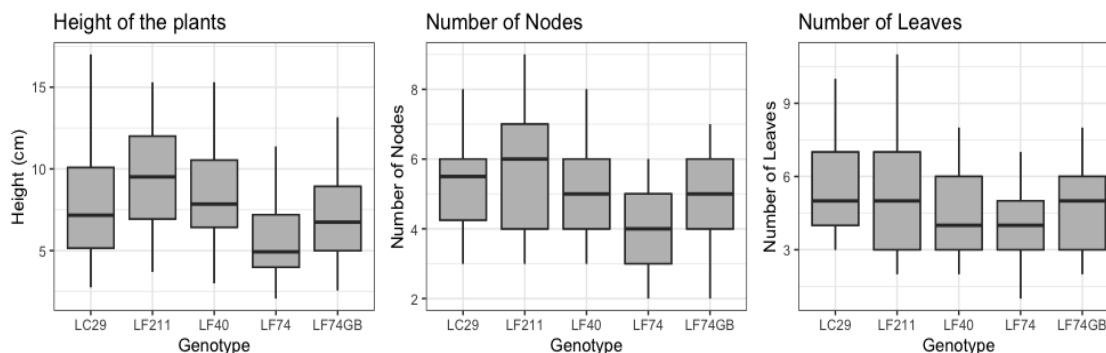


Figure 3. Growth variations among the *Cinchona* spp. genotypes after an acclimatization period of 12-weeks in the substrate S5.

Table 2. *Cinchona* spp. growth by genotype over a period of 12 weeks of acclimatization. Means in each column followed by the same letters are not significantly different according to Wilcoxon's rank sum tests at $P < 0.05$. Values are mean \pm standard error.

Genotype	Shoots Height (cm)	Number of Nodes	Number of leaf pairs
	Mean \pm SE	Mean \pm SE	Mean \pm SE
LC29	7.91 \pm 0.52 a	5.35 \pm 0.18 a	5.36 \pm 0.26 a
LF211	9.42 \pm 0.46 b	5.67 \pm 0.20 a	5.40 \pm 0.33 a
LF40	8.51 \pm 0.46 ab	5.12 \pm 0.16 ac	4.45 \pm 0.25 b
LF74	5.61 \pm 0.35 c	4.03 \pm 0.15 b	4.37 \pm 0.21 b
LF74GB	7.06 \pm 0.38 ab	4.86 \pm 0.16 c	4.72 \pm 0.24 ab

efficacy in supporting survival across various genetic backgrounds within the *Cinchona* genotypes.

Conversely, the low survival rates observed in substrates S1, S2, S3, and S4 compared to peat moss (S5) are probably due to a combination of factors related to their pH and electrical conductivity (EC). Most of the substrates have a neutral to slightly acidic pH (around 7.0 and 5.25, respectively) which might not be optimal for *Cinchona* shoots development. This observation aligns with existing reports highlighting the plant's preference for acidic soils in its natural habitats (Gómez Silvera *et al.*, 2016; Villar Cabeza *et al.*, 2018; Rufasto Peralta, 2021). Additionally, Substrates such as S3 and S4, which have a high EC value (320 and 910 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ respectively) could have induced salt stress in the rootless shoots, hindering their ability to absorb water and nutrients (Zsolt *et al.*, 2020). While S2 has a more favorable pH (5.10), its very low EC ($<50 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$) might indicate a lack of readily available nutrients, likely contributing to the poor survival rates seen in these substrates.

Second stage of acclimatization

Due to these results, the shoots were maintained in peat moss substrate for an additional eight weeks, after this period the growth of *Cinchona* spp. genotypes were evaluated (Table 2). Wilcoxon's rank sum tests indicated there were significant differences ($P < 0.05$) between genotypes in terms of shoot height, the number of nodes and leaf pairs. Genotype LF211 stood out with the tallest shoots (9.4 cm \pm 3.0), the highest average number of nodes (5.6 \pm 1.3), and the most leaf pairs (7.0 \pm 2.5). Conversely, LF74 exhibited the lowest values in all three categories: shoot height (5.6 cm \pm 2.4), number of nodes (4.0 \pm 1.0), and number of leaf pairs (4.9 \pm 1.0). LC29, LF40 and LF74GB displayed intermediate values for all parameters.

The variations in growth parameters among the different *Cinchona* genotypes (Figure 3) underline the significance of their distinct physiological responses and the interplay between genetics and environmental factors during *ex vitro* acclimatization. This diversity in growth



Figure 4. Acclimatized *Cinchona* plants after transplantation to field conditions in Sasaima, Cundinamarca, Colombia.

attributes reflects the inherent variations dictating the plants' growth patterns and resource allocation strategies (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). LF211's taller shoot height and greater number of nodes and leaves suggest a robust growth phenotype, potentially indicating an adaptation to the peat moss substrate. In contrast, LF74's comparatively shorter shoot height and fewer nodes and leaf pairs may imply a less vigorous growth phenotype, emphasizing the importance of genotype selection for optimal cultural practices. However, the sustained high survival rates exhibited in all genotypes, despite differences in growth parameters, demonstrate the promising potential of *Cinchona* genotypes to thrive under the controlled *ex vitro* environmental conditions proposed in this research.

Furthermore, a key aspect of successful *ex vitro* acclimatization involves gradually exposing the plants to fluctuating humidity conditions (Hazarika *et al.*, 2006; Perea Dallos *et al.*, 2009; Chandra *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2015; Mahendra *et al.*, 2020). By systematically removing the transparent covers for limited periods throughout the last 8 weeks of the experiment, the plants progressively acclimated to fluctuations in humidity and temperature, mimicking the *ex vitro* environment. This approach culminated in the complete removal of covers at week 10, signifying a milestone indicating sufficient adjustment for field transplantation, and promoting enhanced plant resilience and vitality. After twelve weeks the *Cinchona spp.* plants from the greenhouse at IBUN were transplanted to plastic pots (Figure 1d) and relocated to

a farm situated in the coffee production area of Sasaima, Cundinamarca, where the acclimatized *Cinchona* plants were carefully maintained under shaded and protected conditions, in a substrate comprised of a (1:1) mixture of peat moss substrate (S5) and field soil with a pH level averaging 6.5 and EC concentrations ranging between 380-425 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$. Over the course of six months in this environment, the plants grew to a height of ≥ 30 cm (Figure 1e), after which they were transplanted into field conditions (Figure 4).

CONCLUSION

The optimization of *ex vitro* acclimatization techniques for un-rooted *in vitro* shoots of *Cinchona spp.* genotypes, particularly through substrate selection and systematic management of environmental factors, underscore the role of strategies in promoting survival rates on *in vitro* plant shoots, maintaining high levels of relative humidity ($>90\%$) during this stage is essential to encourage plant survival and facilitate the transition from rootless *in vitro* shoots to *ex vitro* conditions. Likewise, the research highlighted the effectiveness of the peat substrate (pH 3.73 and EC of 86 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$) with a high survival rate compared to other substrates. Furthermore, the analysis of growth parameters showed variations between the genotypes, indicating their different physiological responses and their adaptability to the peat substrate. These conditions during the acclimatization phase were essential since it improved the resistance and vitality of the plants for a successful transplantation to field conditions. These

results can contribute to the establishment of a commercial plantation in Colombia, generating a robust stock material from hybrid plants. Likewise, our findings could have a connotation for conservation efforts, in the reintroduction processes of threatened *Cinchona* species through *in vitro* culture techniques.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), particularly the Laboratory of Plant Tissue Culture for the support provided in the development of this research.

REFERENCES

- Abdalla. N., El-Ramady. H., Seliem. M. K., El-Mahrouk. M. E., Taha. N., Bayoumi. Y., Shalaby. T. A., & Dobránszki. J. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*. 8(8). Article 8. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>
- Achan. J., Talisuna. A. O., Erhart. A., Yeka. A., Tibenderana. J. K., Baliraine. F. N., Rosenthal. P. J., & D'Alessandro. U. (2011). Quinine. an old antimalarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*. 10(1). 144. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-144>
- Andersson. L. (1998). A revision of the genus *Cinchona* (Rubiaceae—Cinchoneae). *Memoirs of The New York Botanical Garden*. 80: 1–75.
- Armijos-González. R., & Pérez-Ruiz. C. (2016). *In vitro* germination and shoot proliferation of the threatened species *Cinchona officinalis* L (Rubiaceae). *Journal of Forestry Research*. 27(6). 1229-1236. <https://doi.org/10.1007/s11676-016-0272-8>
- Ben. N., & Friedman. S. (2018). Review and Evaluation of Root Respiration and of Natural and Agricultural Processes of Soil Aeration. *Vadose Zone Journal - Wiley Online Library*. 17(1:47). <https://doi.org/10.2136/vzj2017.06.0119>
- Chandra. S., Bandyopadhyay. R., Kumar. V., & Chandra. R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: From laboratory to land. *Biotechnology letters*. 32. 1199-1205.
- Clapa. D., Fira. A., & Joshee. N. (2013). An efficient *ex vitro* rooting and acclimatization method for horticultural plants using float hydroculture. *HortScience*. 48 (9). 1159-1167. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.9.1159>
- Crawford. M. J. (2014). An empire's extract: chemical manipulations of cinchona bark in the eighteenth-century spanish atlantic world. *Osiris*. 29(1). 215-229. <https://doi.org/10.1086/678104>
- Crawford. M. J. (2016). The andean wonder drug: cinchona bark and imperial science in the spanish atlantic. 1630-1800. University of Pittsburgh Press.
- Deng. Z. C., Jin. H., & He. H. (2015). An efficient micropropagation system for *Morinda officinalis* How. (Rubiaceae). an endangered medicinal plant. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 17(6). 1609-1618.
- Díaz-Piedrahita. S. (2003). Las quinas en el mundo y en Colombia. *Revista Medicina Colombia*. Vol. 25(2 (62)). 128-132 (in Spanish).
- Duta-Cornescu. G., Constantin. N., Pojoga. D.-M., Nicuta. D., & Simon-Gruita. A. (2023). Somaclonal variation—advantage or disadvantage in micropropagation of the medicinal plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(1). 838. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>
- Espinosa-Leal. C. A., Puente-Garza. C. A., & García-Lara. S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: Means for production of biological active compounds. *Planta*. 248(1). 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Gómez Silvera. A., Beraun Macedo. L. A., Gómez Rengifo. O. J., & Llatas Ducep. E. (2016). Procesos de regeneración natural de la quina o cascarilla (*Cinchona spp.*): En los bosques de neblina del distrito de Kañaris. región Lambayeque. Instituto Nacional de Innovación Agraria. (in Spanish) <https://bit.ly/4eFu6Dk>
- Greenwood. D. (1992). The quinine connection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 30(4). 417-427. <https://doi.org/10.1093/jac/30.4.417>
- Hazarika. B. N., Teixeira da Silva. J., & Talukdar. A. (2006). Effective acclimatization of *in vitro* cultured plants: Methods. physiology and genetics. *Floriculture. ornamental and plant biotechnology*. 2. 427-438.
- Hunter. C. S. (1979). *In vitro* Culture of *Cinchona Ledgeriana* L. *Journal of Horticultural Science*. 54(2). 111-114. <https://doi.org/10.1080/00221589.1979.11514857>
- Jagiello-Kubiec. K., Nowakowska. K., Łukaszewska. A. J., & Pacholczak. A. (2021). Acclimation to *ex vitro* conditions in ninebark. *Agronomy*. 11(4). 612. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040612>
- Jaramillo-Arango. J. (1949). A critical review of the basic facts in the history of *Cinchona*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 53(352). 272-311. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1949.tb00419.x>
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583–621.
- Lima Jiménez, N. R., Moreno Serrano, J. A., Eras Guzmán, V. H., Minchala Patiño, J., González Zaruma, D., Yaguana Arévalo, M., & Valarezo Ortega, C. (2018). Propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(2), 169–178.

- Mahendra. R., Chauhan. N., Sharma. J., Rana. K., & Bakhshi. M. (2020). *Ex-vitro* establishment of tissue cultured plants in fruit crops-a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 9. 3321-3329. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.911.397>
- Moraes. R. M., Cerdeira. A. L., & Lourenço. M. V. (2021). Using micropropagation to develop medicinal plants into crops. *Molecules*. 26(6). 1752. <https://doi.org/10.3390/molecules26061752>
- Nikolaeva. A. A., Korotkova. E. I., Tomsk Polytechnic University. Lipsikh. O. I., & Tomsk Polytechnic University. (2019). Determination of quinine in drugs and beverages by fluorimetric method. *Bulletin of the Karaganda University. «Chemistry» Series*. 94(2). 56-61. <https://doi.org/10.31489/2019Ch2/56-61>
- Oakes. A. D., Pilkey. H. C., & Powell. W. A. (2020). Improving *ex vitro* rooting and acclimatization techniques for micropropagated american chestnut. *Journal of Environmental Horticulture*. 38(4). 149-157. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-38.4.149>
- Pain. S. (2019). A toast to tonic. *New Scientist*. 244(3261). 62-64. [https://doi.org/10.1016/S0262-4079\(19\)32439-X](https://doi.org/10.1016/S0262-4079(19)32439-X)
- Pandey. K., Kuldeep. P., & Kumar. P. (2019). *In vitro* and *ex vitro* approaches for hardening of tissue culture plants (1.a ed.). New Delhi Publishers. https://www.researchgate.net/profile/Nilanjaya-Dr/publication/372629569_Plant_stress_Biology/links/64c2a0b76f28555d86d7fef2/Plant-stress-Biology.pdf#page=231
- Perea Dallos. P., Teresa. G., A. C. M. H., Gabriel. G. M., & E. C. S. J. (2009). Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*: Manual de prácticas de laboratorio. (in Spanish) <https://bit.ly/4cdyQhX>
- Pharmakina SA. (2016). Quinine sulfate manufacturers. exporters & wholesalers: about pharmakina. *Pharmakina*. <https://www.pharmakina.com/about-pharmakina/quinine-manufacturers-company-background/>
- Prasad. M. (2022). Review of the use of Peat Moss in Horticulture. <https://bit.ly/3VDCHhl>
- Roersch van der Hoogte. A., & Pieters. T. (2014). Science in the service of colonial agro-industrialism: The case of cinchona cultivation in the Dutch and British East Indies. 1852–1900. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*. 47. 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2014.05.019>
- Rufasto Peralta. Y. (2021). Calýdad de sýtyo de *cinchona sp.*, en relacýon a varýables edafoclýmátýcas en el bosque montano la palma. Provincia de chota [Universidad Nacional Autónoma de Chota]. <https://bit.ly/4ccGYPO>
- Sandoval. Y., & Echandía. C. (1986). La historia de la quina desde una perspectiva regional: Colombia.1850-1882. *Anuario Colombiano de Historia Social y de la Cultura*. 0(13-14). 153-187 (in Spanish).
- Schaepe-meester. D. H. (2021). Trees against malaria : alkaloid concentrations and management of cinchona trees in peru and the DR Congo [Ghent University]. <https://bit.ly/3xovr0S>.
- Serrano, J. A. M., Ruíz, C. P., Fierro, I. M., & Fierro, J. M. (2019). Effect of culture medium on morphogenic processes *in vitro* in *Cinchona officinalis* L. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 51(1), 55–68.
- Shin. B. K., Son. J. E., & Choi. J. M. (2012). Physico-chemical properties of peatmoss and coir dust currently used as root medium components for crop production in korean plant factories. *Journal of Bio-Environment Control*. 21(4). 362-371.
- Shiwani. K., Sharma. D., & Kumar. A. (2022). Improvement of plant survival and expediting acclimatization process. en S. Gupta & P. Chaturvedi (Eds.). *Commercial scale tissue culture for horticulture and plantation crops* (pp. 277-291). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-19-0055-6_12
- Taylor. N. (1943). Quinine: the story of cinchona. *The Scientific Monthly*. 57(1). 17-32.
- Theiler, R. (2014, year). Cinchona: A journey around the world [Seminar]. Personal communication, Seminario de Investigación del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Topcuoğlu. B., & Turan. M. (2018). Peat. BoD – Books on Demand.
- Villar Cabeza. M. Á., Marcelo Bazán. F. E., & Baselly Villanueva. J. R. (2018). Estudio silvicultural de la quina: *Cinchona officinalis* L. Instituto Nacional de Innovación Agraria. <https://bit.ly/45Cj0Lv>
- Vivanco-Galván. O., Jiménez. Y., Castillo Malla. D. P., & Lucero. H. (2022). Blue LED light enhances the growth of *Cinchona officinalis* L. cultured *in vitro*. En R. Shinar. I. Kymissis. & E. J. List-Kratochvil (Eds.). *Organic and hybrid Sensors and Bioelectronics*. XV (p. 35). SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.2633167>
- Yip. A., Sivarajah. S., & Natkunarajah. J. (2023). H22 Barking up the right tree: History of quinine. *British Journal of Dermatology*. 188(Supplement_4). ljad113.304. <https://doi.org/10.1093/bjd/ljad113.304>
- Zsolt. S.-V., González Orega. S., Cantor. M., Denisa Andreea. J., Boscaiu. M., & Vicente. O. (2020). Effects of drought and salinity on two commercial varieties of *Lavandula angustifolia* Mill. *Plants*. 9. 637. <https://doi.org/10.3390/plants9050637>.

Optimización del crecimiento y la luminiscencia de *Vibrio harveyi* CBM-992 en función de las concentraciones de nutrientes

Optimization of growth and luminescence of *Vibrio harveyi* CBM-992 as a function of nutrient concentrations

Ayamey Pérez Oduardo*, Eudalys Ortiz Guilarte**, Thais Renee Chong Almaguer***, María Victoria Iglesias Rodríguez****, Carlos Álvarez Valcárcel*****, Gladys Margarita Lugioyo Gallardo*****, Roberto Rafael Núñez Moreira*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.112972

RESUMEN

La bioluminiscencia es un proceso bioquímico; que ocurre en vertebrados, invertebrados, plantas y bacterias, mediante el cual estos organismos emiten luz. Se han empleado diferentes especies de bacterias en la detección de contaminación ambiental, tanto en aguas como en sedimentos, pues al exponerse ante diferentes agentes tóxicos disminuyen su luminiscencia. En la presente investigación se optimizó el crecimiento y la luminiscencia de la cepa de *Vibrio harveyi* CBM-992 a partir de la variación de las concentraciones de triptona, extracto de levadura y glicerol en el medio basal LM; mediante el método de superficie de respuesta. Además, en el medio óptimo para la bioluminiscencia, se evaluó su atenuación frente a diferentes concentraciones de HgCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, mediante un diseño en bloques completamente aleatorizados. El análisis matemático demostró que el valor óptimo de crecimiento y luminiscencia se alcanza a concentraciones de los nutrientes inferiores a las del medio basal LM. En particular, se definió la composición de un medio que garantiza un aumento de la luminiscencia (5.3 %) con una reducción de la concentración de los nutrientes entre un 6-18 %, que permitirá disminuir costos de producción a escalas superiores de fermentación. El análisis de la EC_{50} frente a tres metales tóxicos evidencia que la nueva formulación del medio no afecta la capacidad

* Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0006-1748-463X>

** PhD. Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; laly@icimar.cu (Autor de correspondencia); <https://orcid.org/0000-0001-8043-4076>

*** Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0002-9058-7716>

**** MSc. Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0000-0002-1548-4285>

***** PhD. Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0000-0002-9640-3474>

***** PhD. Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0000-0001-7517-8063>

***** PhD. Departamento de Microorganismos, Instituto de Ciencias del Mar, Agencia de Medio Ambiente, La Habana, Cuba; robertico@icimar.cu (Autor de correspondencia); <https://orcid.org/0000-0001-7327-9442>

de respuesta de *Vibrio harveyi* CBM-992, con una secuencia de toxicidad: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{Fe}^{3+}$. Estos resultados constituirán información básica imprescindible para el futuro diseño de un bioensayo para la detección de contaminantes.

Palabras claves: emisión de luz; crecimiento microbiano; toxicidad; metodología de superficie de respuesta.

ABSTRACT

Bioluminescence is a biochemical process that occurs in vertebrates, invertebrates, plants, and bacteria by which these organisms emit light. Different species of bacteria have been used to detect environmental contamination, both in water and sediments, because their luminescence decreases when exposed to different toxic agents. In the present investigation, the growth and luminescence of the *Vibrio harveyi* CBM-992 strain were optimized by varying the concentrations of tryptone, yeast extract and glycerol in the basal LM medium using the response surface methodology. Furthermore, in the optimal medium for bioluminescence, its attenuation against different concentrations of HgCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ and $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ was evaluated using a completely randomized block design. Mathematical analysis showed that the optimum value of growth and luminescence was obtained at nutrient concentrations lower than those of the basal LM medium. In particular, the composition of a medium that guarantees an increase in luminescence (5.3%) was defined, with a reduction of the nutrient concentration between 6-18%, which will allow to reduce the production costs at higher fermentation scales. The analysis of the EC_{50} against three toxic metals shows that the new formulation of the medium does not affect the response capacity of *Vibrio harveyi* CBM-992, with a toxicity sequence: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{Fe}^{3+}$. These results will constitute essential basic information for the future design of a bioassay for the detection of contaminants.

Keywords: light emission; microbial growth; toxicity; response surface methodology.

Recibido: febrero 14 de 2024

Aprobado: 18 de abril de 2025

INTRODUCCIÓN

La emisión de luz por bacterias luminiscentes es el resultado del sistema enzimático luciferina-luciferasa que se encuentra íntimamente relacionado con los procesos de transferencia de energía en las células e indica el estado metabólico de la célula (Martín *et al.*, 2010). De esta manera, una atenuación de la luminiscencia evidencia una afectación en el proceso de respiración celular. Contaminantes químicos y biológicos, así como algunos factores físicos del ambiente pueden afectar la respiración celular y alterar la síntesis de proteínas y lípidos modificando por tanto la luminiscencia.

Los análisis de toxicidad mediante diferentes técnicas han avanzado en los últimos años como una herramienta eficiente para la evaluación de riesgos ambientales por el incremento de la actividad industrial (Park *et al.*, 2023; Blanco *et al.*, 2017; Boehler *et al.*, 2017). Estas metodologías constituyen una alternativa de interés a los análisis físico-químicos que, por sí solos, no brindan información sobre la toxicidad de las muestras ambientales, son más laboriosos, consumen más tiempo y requieren de equipamiento altamente específico y costoso (Mahendran *et al.*, 2022; Quinn *et al.*, 2018).

Los bioensayos basados en la luminiscencia bacteriana se caracterizan por ser rápidos, sencillos y de alta sensibilidad y por tanto permiten reducir el costo y el tiempo

de operación (Mahendran *et al.*, 2022; Halmi *et al.*, 2019; Halmi, 2016). Estos ensayos se fundamentan en la sensibilidad de las bacterias luminiscentes a la presencia de sustancias tóxicas o a las condiciones adversas del medio, que disminuyen su emisión de luz.

El diseño de un bioensayo, a partir de un grupo de microorganismos tan diverso como las bacterias luminiscentes marinas, requiere de investigaciones básicas que permitan establecer con éxito las condiciones para su empleo como biosensores rutinarios. Estas investigaciones incluyen la selección e identificación taxonómica de la cepa de bacteria, la evaluación de condiciones de cultivo a diferentes escalas de fermentación, la estimación de su sensibilidad frente a agentes tóxicos; así como la formulación y establecimiento de condiciones para su empleo como biosensores ambientales (Veysi & Zeinoddini, 2023; Muneeswaran *et al.*, 2021; Shanware *et al.*, 2013).

En los procesos biológicos resulta complejo establecer condiciones óptimas para obtener mayor rendimiento de un producto determinado. La identificación y la selección de las variables independientes, así como el método de optimización empleado, dependerán de las características y condiciones de trabajo. En particular, la fermentación microbiana es un proceso complejo de reacciones metabólicas dependientes de varios factores relacionados con los nutrientes del medio de cultivo y

las condiciones de operación, entre otras (Schlembach *et al.*, 2021, Pérez *et al.*, 2019; Simutis & Lübbert, 2015).

Las investigaciones relacionadas con maximizar la luminiscencia en cultivos sumergidos han estado relacionadas fundamentalmente con *Photobacterium phosphoreum* y dirigidas a la evaluación convencional de la influencia de un factor sobre la variable respuesta (Parmar *et al.*, 2020). Esas investigaciones implican largos periodos de investigación y no permiten identificar las posibles interacciones entre estos factores (Eisapour *et al.*, 2013; Khani 2011). El empleo de las metodologías de superficie de respuesta han sido utilizadas en tecnología de bioprocesos para la obtención de metabolitos de diferente naturaleza (Jacek *et al.*, 2021; Bilgi *et al.*, 2016; Scordia *et al.*, 2010) porque evalúan el efecto que ejerce la variación cuantitativa o cualitativa de cada factor y la de sus interacciones sobre la variable respuesta (Montgomery, 2004). Actualmente, esta metodología ha permitido establecer con éxito los factores y las interacciones que mayor influencia ejercen sobre la emisión de luz en cultivos de bacterias luminiscentes (Muneeswaran *et al.*, 2021; Parnar *et al.*, 2020; Adnan *et al.*, 2019).

La caracterización de bacterias luminiscentes aisladas de la plataforma cubana se ha dirigido a su utilidad como bioindicadores de calidad ambiental en ecosistemas marinos de Cuba. Estas investigaciones han incluido aspectos relacionados con el aislamiento, identificación y fisiología de estos microorganismos (Iglesias *et al.*, 2020a; 2020b; Delgado-Gómez *et al.*, 2017). En particular, la evaluación de cuatro medios de cultivos recomendados en la literatura especializada para este grupo de bacterias, permitió la selección del medio basal LM (Baumann & Baumann, 1981) para el crecimiento y emisión de luz de la cepa de *Vibrio harveyi* CBM- 992 (Iglesias *et al.*, 2020b).

La presente investigación tiene como objetivo optimizar el crecimiento y la luminiscencia de *V. harveyi* CBM- 992 mediante la evaluación de la variación de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio basal LM (Baumann & Baumann, 1981).

MATERIALES y MÉTODOS

Microorganismo empleado

La cepa luminiscente *V. harveyi* CBM-992 empleada en este estudio fue aislada de las aguas de la plataforma noroeste de Cuba (Iglesias *et al.*, 2020b). Se encuentra depositada en la Colección de Bacterias Marinas del Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR), La Habana, Cuba.

Condiciones de cultivo

Las variantes de medio de cultivo a evaluar fueron definidas en función de las concentraciones de triptona, extracto de levadura y glicerol del medio basal LM (Baumann & Baumann, 1981). Los experimentos fueron desarrollados a escala de zaranda en Erlenmeyers de 500 mL de capacidad con 100 mL de medio de cultivo e incubados de acuerdo a las condiciones propuestas por Iglesias *et al.* (2020b).

Diseño de superficie de respuesta para maximizar el crecimiento y la luminiscencia

La optimización del crecimiento y la luminiscencia mediante la variación de las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno se realizó por el método de superficie de respuesta del diseño central compuesto de Box y Hunter (Jiménez, 2015; López Planes, 1988). Para calcular los niveles de concentración de las variables independientes: triptona, extracto de levadura y glicerol se utilizó el medio basal LM (Baumann & Baumann, 1981) como centro del plan factorial. Las variantes de medio de cultivo incluyeron valores mínimos (-1), puntos centrales (0) y valores máximos (+1) de los nutrientes de acuerdo a las combinaciones del diseño central compuesto de Box y Hunter (Tabla 1).

Este diseño consistió en 19 corridas experimentales, que incluyeron cinco repeticiones en el centro del plan (medio LM). Para cada tratamiento se evaluaron como variables respuesta la DO y la luminiscencia.

Para evaluar la significación de los coeficientes en el modelo de regresión se aplicó el test de Student y el test de Fischer para comprobar el ajuste del modelo. Los valores óptimos se calcularon al igualar a cero la prime-

Tabla 1. Concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno para optimizar el crecimiento y la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992 mediante un diseño central compuesto de Box y Hunter.

Composición del medio (g/L)			
Nutriente	Nivel bajo (-1)	Centro del plan (0)	Nivel alto (+1)
Triptona	3.0	5.0	7.0
Extracto de levadura	3.0	5.0	7.0
Glicerol	2.5	3.5	4.5

ra derivada para las variables dependientes (crecimiento microbiano y luminiscencia) en función de cada variable independiente. La obtención del máximo local se demostró mediante la evaluación de los valores óptimos en la segunda derivada.

El crecimiento microbiano, expresado como unidades de densidad óptica (DO) a 620 nm se determinó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1201. Por su parte, la luminiscencia se determinó mediante el empleo de un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301pc, de manera que la fuente de luz de excitación fue bloqueada para evitar que incidiera sobre la muestra.

Los valores de luminiscencia se determinaron a partir de la integración de los espectros de emisión obtenidos entre 400 y 600 nm, mediante los programas Fluorescence Spectroscopy, Optima 2,20R2 y Origin 8.0 y fueron expresados como unidades arbitrarias de luminiscencia (ual).

Los resultados de crecimiento y luminiscencia fueron procesados con el programa Statgraphics 19, mediante el cual se obtuvo la ecuación de regresión con los coeficientes significativos (Pareto estandarizado), la superficie de respuesta y de contorno; así como el valor óptimo del modelo obtenido para cada variable dependiente.

Ensayo de toxicidad

A partir del cultivo *V. harveyi* CBM-992 en el medio obtenido para maximizar la luminiscencia, se evaluó su atenuación frente a tres compuestos tóxicos, que incluyeron las sales de metales: HgCl₂, K₂Cr₂O₇ y Fe₂(SO₄)₃.

El efecto de la concentración de los compuestos tóxicos se evaluó mediante un diseño en bloques completamente aleatorizados para los metales seleccionados a diferentes concentraciones (Tabla 2). Las diluciones de cada sustancia fueron preparadas en solución salina según lo descrito por Stuart *et al.* (1999).

Para cada evaluación fue expuesto el cultivo en su máxima luminiscencia a las soluciones de los tóxicos en una relación 1:1 (v:v) y como control del ensayo se utilizó solución salina por solución del tóxico. La luminiscencia

se evaluó a los 5 y 15 min de incubación para determinar su atenuación por efecto de los tóxicos (Futra *et al.*, 2014; Villaescusa *et al.*, 1997). La concentración del tóxico que provocó una disminución de un 50 % de la luminiscencia original (EC₅₀) se determinó de acuerdo a la ISO-11348-1 (2007) para este tipo de ensayos.

Las evaluaciones se realizaron por triplicado. Para el procesamiento estadístico de los datos se usó análisis de varianza de clasificación simple con un coeficiente de significación del 95 % y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan (Lerch, 1977). Todos los resultados fueron procesados con el paquete estadístico Spss v.21.0 y Excel 7.0 para Windows.

RESULTADOS

Optimización del crecimiento y la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992

En todas las variantes de medio de cultivo del diseño central compuesto de Box y Hunter se produjeron variaciones del crecimiento microbiano y la luminiscencia del cultivo *V. harveyi* CBM-992. El procesamiento inicial de los resultados mediante regresión lineal multifactorial determinó las ecuaciones para las variables dependientes (crecimiento microbiano y luminiscencia) en función de los nutrientes evaluados, de acuerdo a las expresiones 1 y 2.

$$Y_1 = 6,41323 + 0,0823092X_1 - 0,107472X_2 + 0,00865347X_3 - 1,35345X_1^2 - 0,18X_1X_2 - 0,0525X_1X_3 - 1,20496X_2^2 - 0,1X_2X_3 - 1,10066X_3^2 \quad (1)$$
$$R^2 = 0,963$$
$$Y_2 = 131,802 - 9,94863X_1 - 23,553X_2 - 2,68079X_3 - 30,8341X_1^2 - 0,80125X_1X_2 - 10,8313X_1X_3 - 26,0841X_2^2 + 2,50125X_2X_3 - 41,6528X_3^2 \quad (2)$$
$$R^2 = 0,910$$

Y₁: DO Y₂: Luminiscencia X₁: Triptona X₂: Extracto de levadura X₃: Glicerol

El diagrama de Pareto estandarizado para cada variable dependiente muestra gráficamente la magnitud y dirección de los efectos de las variables independientes sobre el crecimiento microbiano y la luminiscencia de la cepa *V. harveyi* CBM-992 (Figura 1). El análisis de varianza para la DO indicó que tres efectos tienen influencia significativa negativa en el crecimiento microbiano de la cepa evaluada para un nivel de confianza del 95 % (Figura 1a). Por su parte, para la lumi-

Tabla 2. Concentraciones empleadas en la evaluación del efecto de diferentes sales de metales sobre la luminiscencia *V. harveyi* CBM-992.

Compuesto	Concentraciones (mg/L)									
HgCl ₂	3.70	1.85	0.93	0.46	0.23	0.12	0.06	0.03	-	-
K ₂ Cr ₂ O ₇	900.00	450.00	225.00	112.50	56.00	28.00	14.00	7.00	3.50	1.76
Fe ₂ (SO ₄) ₃	370.00	185.00	92.50	46.25	23.13	11.56	5.78	2.89	1.45	0.72

niscencia resultaron cuatro efectos significativamente negativos para esta variable con un nivel de $p < 0.05$ (Figura 1b). En particular, la concentración de triptona, extracto de levadura y glicerol en su expresión cuadrática tuvieron un efecto estadísticamente negativo sobre el crecimiento y la luminiscencia de CBM-992, que indica que la variable respuesta disminuye cuadráticamente, a medida que el nivel de estos factores se incrementa (Rodríguez, *et al.* 2017).

El análisis del diagrama de Pareto estandarizado de la influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento microbiano y la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992 (Figura 1) determinó las ecuaciones de ajuste para los coeficientes significativos (ecuaciones 3 y 4).

Las ecuaciones del modelo de regresión para las variables dependientes DO (Y_1) y luminiscencia (Y_2) permitieron obtener las superficies de respuesta y de contorno, donde se observa gráficamente el comportamiento de esas variables en función de los niveles de las interacciones: triptona-extracto de levadura, triptona-glicerol y glicerol-extracto de levadura. Los resultados muestran un óptimo local de cada variable dependiente para la zona de estudio (Figura 2 y Figura 3). En particular, como resultado del análisis del diseño para esa zona de óptimo local se obtiene un máximo de crecimiento microbiano de $DO = 6.44$, que no difiere del valor obtenido en el medio basal LM (6.41). En contraste, para la luminiscencia se alcanzó un valor máximo de 137.9 ual, superior al del medio de cultivo LM (130.9 ual).

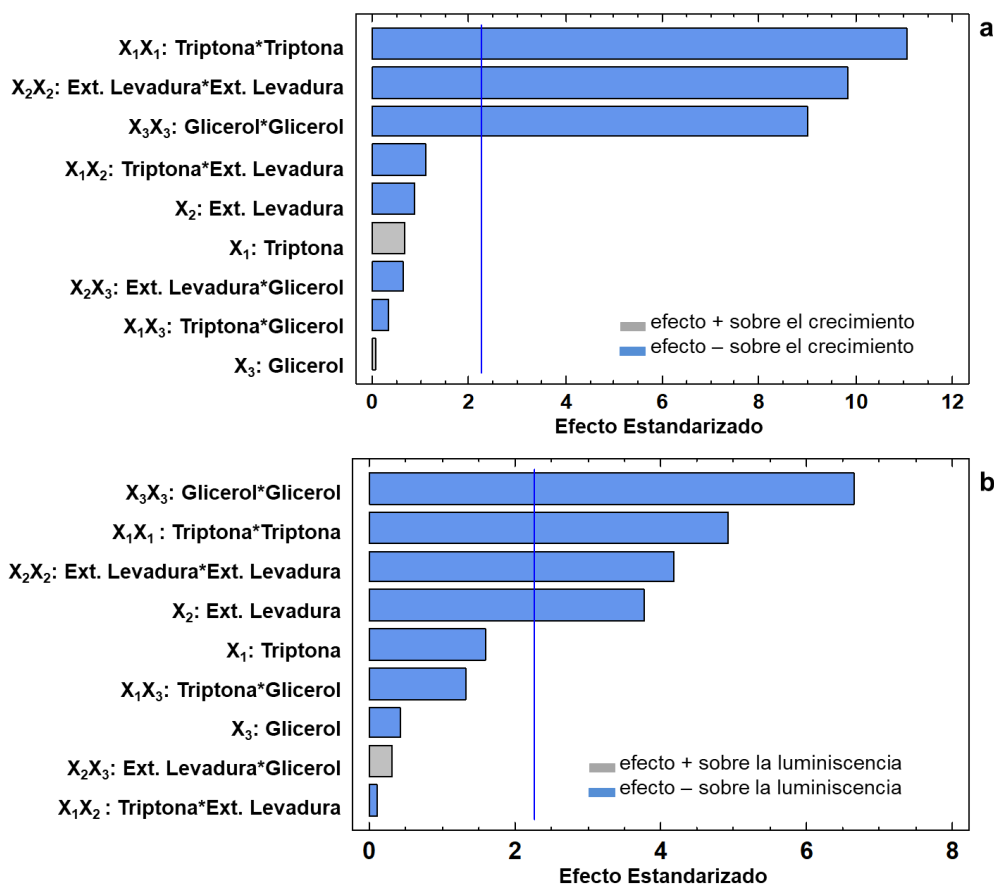


Figura 1. Diagrama de Pareto estandarizado para la DO (a) y la luminiscencia (b) de *V. harveyi* CBM-992 para un nivel de confianza del 95%. Las barras que sobrepasan la línea vertical representan los coeficientes significativos para cada una de las variables dependientes ($p < 0.05$).

$$Y_1 = 6,41323 - 1,35345X_1^2 - 1,20496X_2^2 - 1,10066X_3^2 \quad (3)$$

$$Y_2 = 131.802 - 23.553X_2 - 30.8341X_1^2 - 26.0841X_2^2 - 41.6528X_3^2 \quad (4)$$

Y_1 : DO Y_2 : Luminiscencia X_1 : Triptona X_2 : Extracto de levadura X_3 : Glicerol

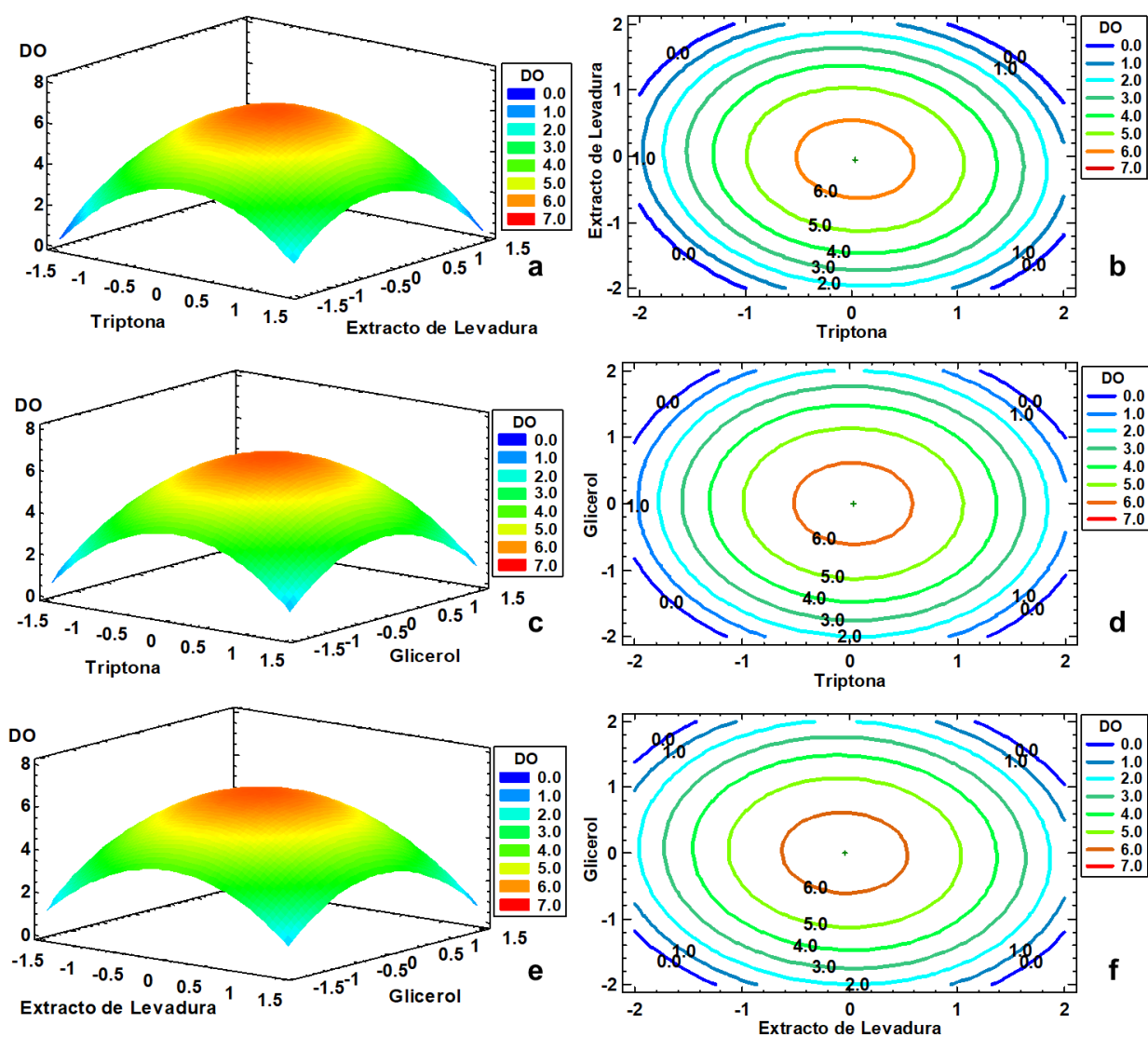


Figura 2. Superficies de respuesta de la optimización del crecimiento microbiano de la cepa *V. harveyi* CBM-992 para las interacciones a. triptona-extracto de levadura, c. triptona-glicerol y e. extracto de levadura-glicerol. Transformaciones canónicas de la superficie de respuesta para las interacciones b. triptona-extracto de levadura, d. triptona-glicerol y f. extracto de levadura-glicerol.

Tabla 3. Concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno que maximizan el crecimiento y la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992 para el diseño central compuesto de Box y Hunter.

Nutriente	Medio LM	Medio óptimo de crecimiento	Medio óptimo de luminiscencia
Triptona (g/L)	5.00	5.07	4.70
Extracto de levadura (g/L)	5.00	4.90	4.10
Glicerol (g/L)	3.50	3.01	2.97

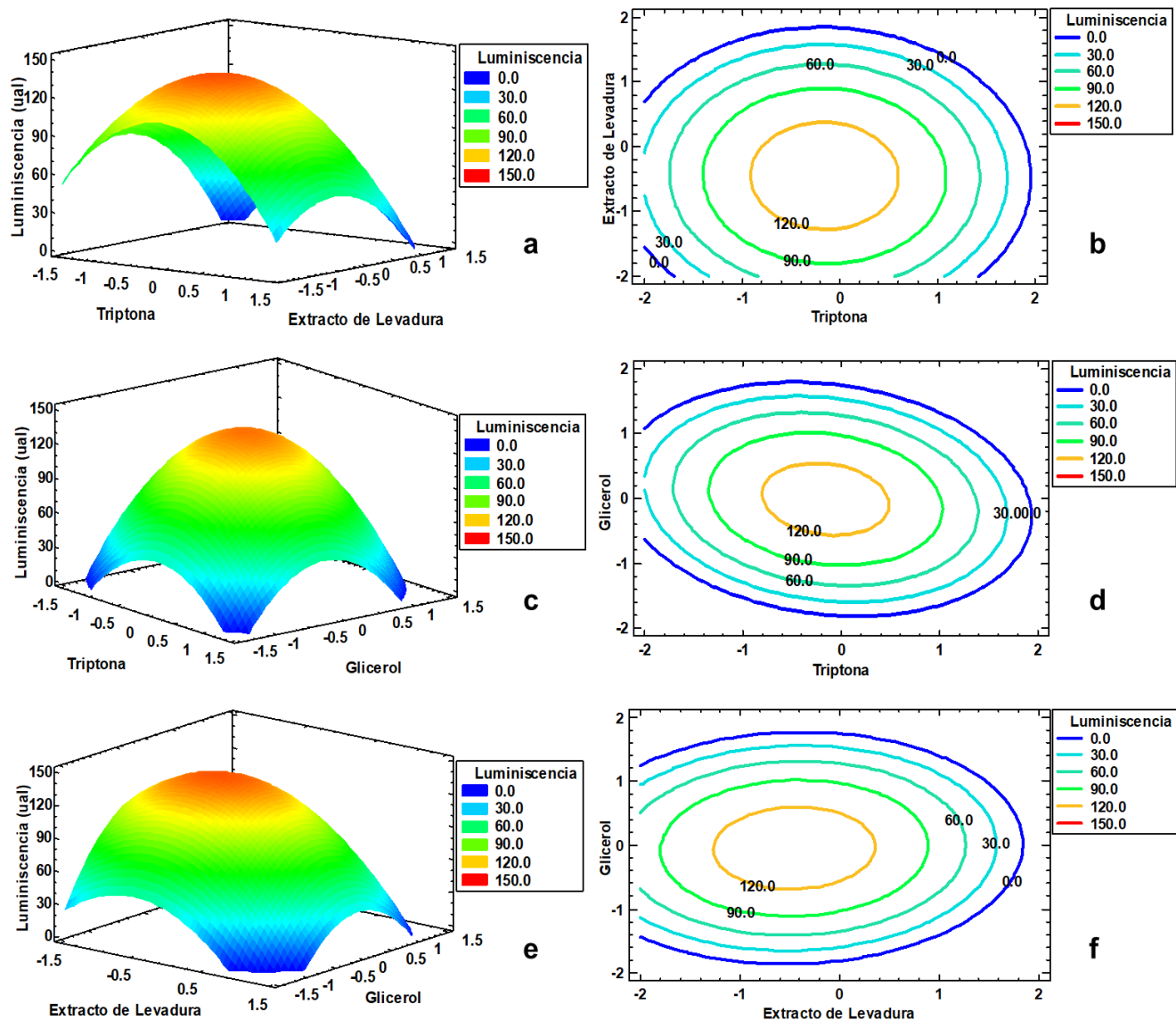


Figura 3. Superficies de respuestas de la optimización de la luminiscencia de la cepa *V. harveyi* CBM-992 para las interacciones a. triptona-extracto de levadura, c. triptona-glicerol y e. extracto de levadura-glicerol. Transformaciones canónicas de la superficie de respuesta para las interacciones b. triptona-extracto de levadura, d. triptona-glicerol y f. extracto de levadura-glicerol.

El cálculo de la primera derivada de las ecuaciones de ajuste para la DO (Y_1) (3) y luminiscencia (Y_2) (4) determinó las concentraciones de las variables independientes que maximizan el crecimiento y la luminiscencia de la cepa *V. harveyi* CBM-992 (Tabla 3).

Las concentraciones de triptona, extracto de levadura y glicerol reducidas en un 6 %, 18 % y 15 %, respectivamente, maximizan la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992 en un 5 % con respecto a la obtenida en el medio basal LM (Baumann & Baumann, 1981). Por su parte, los resultados del proceso de optimización del medio para

el crecimiento microbiano, no promovió un incremento de biomasa, posiblemente asociado a la calidad del medio original de partida para alcanzar un buen rendimiento. Sin embargo, es de notar que estos resultados se alcanzan con una concentración menor del extracto de levadura (2%) y de glicerol (14%) lo cual tiene implicaciones importantes en los costos del medio de cultivo.

Efecto de diferentes compuestos tóxicos sobre la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992

La concentración efectiva media (EC_{50}) es ampliamente utilizada para la evaluación de la atenuación de la lumi-

Tabla 4. Valores estimados de EC₅₀ de *V. harveyi* CBM-992, basados en la atenuación de la intensidad de la luminiscencia a 5 y 15 min de exposición a compuestos tóxicos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los valores ($p < 0.05$; ANOVA y prueba de Duncan a posteriori).

Tóxico	EC ₅₀ a 5 min (mg/L)	EC ₅₀ a 15 min (mg/L)
HgCl ₂	1.64 ^c ± 0.74	1.52 ^c ± 0.25
K ₂ Cr ₂ O ₇	60.79 ^b ± 5.97	58.44 ^b ± 4.84
Fe ₂ (SO ₄) ₃	168.41 ^a ± 15.64	158.53 ^a ± 10.31

niscencia frente a diferentes compuestos tóxicos, ya que indica la concentración del tóxico que provoca la atenuación de la luminiscencia en un 50 %.

En la Tabla 4 se muestran los valores de EC₅₀ a los 5 y 15 min de exposición al evaluar el efecto de tres compuestos tóxicos sobre la luminiscencia de CBM-992 en el medio de cultivo óptimo para la luminiscencia.

La atenuación de la intensidad de la luminiscencia de CBM-992 expresada como valores de EC₅₀ no difiere estadísticamente a los diferentes tiempos de incubación para un mismo compuesto (Duncan, $p < 0.05$). Asimismo, la secuencia de sensibilidad mostrada por el cultivo a la exposición de estos compuestos fue: Hg²⁺ > Cr⁶⁺ > Fe³⁺, independientemente del tiempo de contacto evaluado.

DISCUSIÓN

Los estudios sobre optimización del crecimiento y emisión de luz por bacterias luminiscentes no aparecen ampliamente difundidos en la literatura especializada. No obstante, existen evidencias de la influencia de diferentes nutrientes y condiciones de cultivo en el crecimiento y luminiscencia de estas bacterias. En particular, para una cepa del género *Vibrio* se ha demostrado una correlación directa entre el crecimiento celular y la concentración de extracto de levadura en el intervalo de 1-9 g/L, aunque a concentraciones de 1 g/L se produce el máximo de luminiscencia (Parmar *et al.*, 2020). Por su parte, para *Photobacterium leiognathi* cepa GoMGM1 se ha demostrado que el extracto de levadura hasta concentraciones de 8 g/L produce un aumento de la luminiscencia, mientras el crecimiento se inhibe a concentraciones superiores de 6 g/L (Muneeswaran *et al.*, 2021).

En el caso de la triptona se ha informado que favorece el crecimiento y la luminiscencia, probablemente por la presencia de la arginina, que estimula la expresión de la luciferasa; así como la transcripción del sistema bioluminiscente (Srivastava & MacLeod, 1971). Asimismo, la efectividad de varias fuentes de nitrógeno como ácido glutámico, peptona y triptona en la luminiscencia de *Photobacterium* sp. cepa MIE, demostró que la triptona

es el componente más favorable para la luminiscencia a una concentración óptima entre 30-40 g/L (Halmi *et al.*, 2014), que resulta superior a la que maximiza la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992.

Referido al glicerol, aparece ampliamente documentado que no tiene un efecto significativo para el crecimiento y la luminiscencia de estas bacterias (Parmar *et al.*, 2020; Nawaz & Ahmed, 2011). Sin embargo; se ha demostrado su importancia para el crecimiento y la emisión de luz en determinadas cepas de bacterias luminiscentes (Adnan *et al.*, 2020; Iglesias *et al.*, 2020b; Halmi *et al.*, 2014).

Determinadas concentraciones de glicerol pueden inducir o inhibir el crecimiento y la luminiscencia de estos microorganismos (Ramesh *et al.*, 2014). El glicerol puede actuar como una única fuente de carbono utilizada por la enzima luciferasa para la producción de luminiscencia. Friedrich y Greenberg (1983) reportaron que el crecimiento de una cepa luminiscente del género *Vibrio* en ausencia de glicerol causó la represión catabólica de la enzima luciferasa. Asimismo, se ha demostrado que la conservación de una cepa de *P. phosphoreum* en alginato-glicerol al 3 % mantiene máximos de luminiscencia aproximadamente por cuatro semanas (Chun *et al.*, 1996). Por su parte, otros autores refieren concentraciones de glicerol que maximizan la luminiscencia en el intervalo de 3-6 % (Halmi *et al.*, 2014; Ramesh *et al.*, 2014).

Para el presente estudio se confirmó que las concentraciones de nutrientes pueden diferir para alcanzar los máximos de crecimiento microbiano y la luminiscencia, aunque las interacciones de estos nutrientes no tuvieron una influencia significativa sobre la variable respuesta; los factores de manera independiente resultaron significativos para el crecimiento y luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992. A pesar de la limitación de los métodos de optimización, para el presente estudio, se evidenció la bondad del diseño central compuesto de Box y Hunter, que permitió un aumento de la luminiscencia en un 5.3 %, con disminución de las concentraciones de diferentes nutrientes con respecto al medio basal LM. Esta nueva formulación de medio de cultivo permitirá un mayor rendimiento a escalas superiores del proceso fermentati-

vo, con la consiguiente reducción de los costos de producción. Asimismo, estos resultados confirman que las condiciones de cultivo y en particular los requerimientos de nutrientes dependen de la cepa seleccionada (Schlembach *et al.*, 2021). En este sentido, es necesario continuar la evaluación de la influencia de factores ambientales, como el pH y la temperatura, que permitan establecer las condiciones de cultivo de una cepa aislada de la plataforma cubana para incrementar los niveles de producción de luminiscencia.

Los estudios fisiológicos a escala de zaranda han permitido la formulación de un medio de cultivo que maximiza la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992. En esas condiciones de máxima luminiscencia mostró sensibilidad frente a los tres compuestos tóxicos evaluados, independientemente del tiempo de contacto evaluado.

El mercurio es uno de los elementos tóxicos más abundantes en la naturaleza y se encuentra entre los metales cuyos efectos adversos sobre los organismos se encuentran bien documentados (Jan *et al.*, 2016). Sin embargo, aún es muy usado con fines industriales en la producción de baterías, combustión de carbón, industria de la pintura, papel, minería, entre otras (Ayangbenro & Babalola, 2017).

Los valores de EC_{50} de *V. harveyi* CBM-992 para el Hg^{2+} a 5 min de exposición ($EC_{50-5min} = 1.64$ mg/L) se encuentran por encima de lo reportado para una cepa de *P. leiognathi* aislada de aguas marinas cubanas ($EC_{50-5min} = 0.21$ mg/L) (Stuart *et al.*, 1999). Sin embargo, la toxicidad de la cepa en estudio para el Hg^{2+} resultó similar a la mostrada por *V. fischeri* en el ensayo Microtox para este compuesto ($EC_{50-5min} = 1.6$ mg/L y $EC_{50-15min} = 0.8$ mg/L) (Cho *et al.*, 2004). Asimismo, la sensibilidad *V. harveyi* CBM-992 frente a este tóxico fue más de nueve veces superior a la de *Vibrio alginolyticus* PBR1 en un medio óptimo de luminiscencia ($EC_{50-15min} = 14.18$ mg/L) (Parmar *et al.*, 2020).

El cromo es un elemento natural abundante en la corteza terrestre; formando parte de diversos compuestos en agua, suelos y efluentes de industrias, debido a que dicho metal es ampliamente utilizado en distintas actividades industriales (Ayangbenro & Babalola, 2017). Para este compuesto tóxico se han reportado valores de EC_{50} similares a diferentes tiempos de incubación en el ensayo de Microtox ($EC_{50-5min} = 18.9$ mg/L y $EC_{50-15min} = 17.2$ mg/L) (Cho *et al.*, 2004), en correspondencia con las EC_{50} de *V. harveyi* CBM-992 frente Cr^{6+} para ambos tiempos de exposición. Los valores de EC_{50} mostrados por la cepa en estudio se encuentran por debajo de los referidos por otros investigadores para este metal, en

condiciones similares de evaluación. Tal es el caso de Lopez-Roldan *et al.* (2012) ($EC_{50-15min} = 190.4$ mg/L), Fulladosa *et al.* (2005a) ($EC_{50-15min} > 500$ mg/L) y Villaescusa *et al.* (1997) ($EC_{50-5min} = 1\ 164$ mg/L y $EC_{50-15min} = 584$ mg/L). Esto evidencia la sensibilidad de la cepa en estudio para la detección de cromo en muestras de agua.

El hierro es uno de los metales trazas más importantes para la vida. Es un elemento que actúa como cofactor de disímiles enzimas que intervienen en procesos metabólicos esenciales para la vida como: respiración, fotosíntesis, fijación de nitrógeno, metanogénesis, transporte de oxígeno y regulación genética (Mackenzie *et al.*, 2008). Sin embargo, en la actualidad se refiere un incremento notable de las partículas de hierro que se vierten en el mar a niveles tóxicos, generadas por las ciudades y la industria procedentes de la fabricación de acero y la quema de carbón (Ayangbenro & Babalola, 2017).

Los valores de EC_{50} para la exposición al Fe^{3+} en esta investigación ($EC_{50-5min} = 168.4$ mg/L, $EC_{50-15min} = 158.5$ mg/L) se encuentran por encima de los descritos en la literatura especializada, lo cual sugiere una menor sensibilidad de *V. harveyi* CBM-992 a este compuesto. Ejemplo de ello son los valores referidos por Cho *et al.* (2004) para *V. fischeri* con EC_{50} de 15.9 y 16.5 mg/L a los 5 y 15 min, respectivamente. Otros autores refieren EC_{50} de 70 mg/L a los 5 min (Futra *et al.*, 2014) y de 52.08 mg/L a los 15 min (Lopez-Roldan *et al.*, 2012).

El análisis de la EC_{50} como medida indirecta de la toxicidad demostraron que el mercurio resultó ser el metal más tóxico para *V. harveyi* CBM-992, similar para una cepa de *P. leiognathi*, aislada de aguas de la plataforma cubana (Stuart *et al.*, 1999). Asimismo, la secuencia de toxicidad coincide con la informada por Futra *et al.* (2014) ($Cu^{2+} > Cr^{6+} > Ag^{+} > Fe^{3+}$).

En general, la atenuación de la luminiscencia de *V. harveyi* CBM-992, expresado como EC_{50} para cada uno de los metales evaluados constituye información básica de su sensibilidad a compuestos tóxicos. Sin embargo, es necesario continuar la evaluación de la atenuación de la luminiscencia frente a otros metales, plaguicidas, hidrocarburos, entre otros, que permitan caracterizar la sensibilidad de la cepa frente a posibles contaminantes ambientales. Asimismo, resulta imprescindible su evaluación frente a combinaciones de estos tóxicos y a muestras naturales con diferentes orígenes de impactos, donde la combinación de múltiples compuestos tóxicos pudiera modificar su respuesta.

Varios estudios han demostrado los efectos tóxicos sinérgicos de los compuestos xenobióticos sobre la

atenuación de la luminiscencia, donde la sensibilidad de estos sistemas biológicos dependerá de diferentes factores, como condiciones de cultivos, tipo y concentración respectiva de los tóxicos, factores físicos, entre otros (Fulladosa *et al.*, 2005b) Estos ensayos basados en la bioluminiscencia bacteriana representan una alternativa para evaluaciones de la calidad de ambientes acuáticos por las ventajas que ofrecen en relación a otras metodologías (Mahendran *et al.*, 2022; Halmi, 2016; Girotti *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

La aplicación del análisis multivariado a la influencia de nutrientes del medio sobre el crecimiento y la luminiscencia permitió la formulación de un medio que maximiza la luminiscencia de la cepa *V. harveyi* CBM-992 y garantiza su sensibilidad frente a compuestos tóxicos. Esta formulación representa una disminución en los futuros costos de producción con vistas a la implementación de un bioensayo para el monitoreo de ambientes marinos contaminados.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Sectorial de Ciencia, Tecnología e Innovación: Uso sostenible de los componentes de la Diversidad Biológica en Cuba; por el financiamiento para la ejecución del proyecto Diseño de un bioensayo para la detección de contaminantes en ecosistemas marinos mediante tres bacterias luminiscentes de la especie *Vibrio harveyi*.

REFERENCIAS

- Adnan, N. A., Halmi, M. I. E., Gani, S. S. A., Zaidan, U. H., Othman, R., & Shukor, M. Y. A. (2020). Statistical modeling for the optimization of bioluminescence production by newly isolated *Photobacterium* sp. NAA-MIE. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90, 797-810.
- Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International journal of environmental research and public health*, 14(1), 94. doi:10.3390/ijerph14010094.
- Baumann, P., & Baumann, L. (1981). The marine Gram-negative eubacteria: genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, & *Alcaligenes*. The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, & identification of bacteria. Berlin: Springer-Verlag. 1302-1331.
- Bilgi, E., Bayir, E., Sendemir-Urkmez, A., & Hames, E. E. (2016). Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. *International journal of biological macromolecules*, 90, 2-10.
- Blanco, M., Pérez-Albaladejo, E., Piña, B., Kušpilić, G., Milun, V., Lille-Langøy, R., . Karlsen, O. A., Goksøyr, A., & Porte, C. (2017). Assessing the environmental quality of sediments from Split coastal area (Croatia) with a battery of cell-based bioassays. *Science of the Total Environment*, 624, 1640-1648.
- Boehler, S., Strecker, R., Heinrich, P., Prochazka, E., Northcott, G. L., Ataria, J. M., Leusch, F. D., Braunbeck, T., & Tremblay, L. A. (2017). Assessment of urban stream sediment pollutants entering estuaries using chemical analysis and multiple bioassays to characterise biological activities. *Science of the Total Environment*, 593, 498-507.
- Cho, J. C., Park, K. J., Ihm, H. S., Park, J. E., Kim, S. Y., Kang, I., Kyu-Ho, L., Deokjin, J., Dong-Hun, L., & Kim, S. J. (2004). A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(2), 338-344. doi:10.1016/j.bios.2004.02.001.
- Chun, U. H., Simonov, N., Chen, Y., & Britz, M. L. (1996). Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*. *Resources, conservation and recycling*, 18(1-4), 25-40.
- Delgado-Gómez, Y. D., Castro, R. U., González, S. S., Rodríguez, M. V. I., Guilarte, E. O., Valcárcel, C. Á., & Gallardo, G. M. L. (2017). Phenotypic characterization and molecular identification of a luminescent marine bacterium isolated from the nw shelf of Cuba. *Biotechnia*, 19(3), 3-10. doi: 10.18633/biotechnia.v19i3.441
- Eisapour, M., Keshtkar, A., Moosavian, M. A., & Rashidi, A. (2013). Bioleaching of uranium in batch stirred tank reactor: Process optimization using Box-Behnken design. *Annals of Nuclear Energy*, 54, 245-250.
- Friedrich, W., & Greenberg, E. (1983). Glucose repression of luminescence and luciferase in *Vibrio fischeri*. *Archives of microbiology*, 134, 87-91.
- Fulladosa, E., Murat, J. C., & Villaescusa, I. (2005a). Effect of cadmium (II), chromium (VI), and arsenic (V) on long-term viability-and growth-inhibition assays using *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 49, 299-306.
- Fulladosa, E., Murat, J. C., & Villaescusa, I. (2005b). Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere*, 58(5), 551-557.
- Futra, D., Heng, L. Y., Surif, S., Ahmad, A., & Ling, T. L. (2014). Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in alginate microspheres for monitoring heavy metal toxicity in environmental waters. *Sensors*, 14(12), 23248-23268. doi:10.3390/s141223248.

- Girotti, S., Bolelli, L., Ferri, E., Carpené, E., & Isani, G. Bioindicators in environmental monitoring: .(2015) bioluminescent bacteria, algae and honeybees. In *International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece*
- Halmi, M. I. E. (2016). Rapid ecotoxicological tests using bioassay systems-a review. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*, 4(1), 29-37.
- Halmi, M. I. E., Jirangon, H., Johari, W. L. W., Abdul Rachman, A. R., Shukor, M. Y., & Syed, M. A. (2014). Comparison of Microtox and Xenoassay light as a near real time river monitoring assay for heavy metals. *The Scientific World Journal*, 2014. doi:https://doi.org/10.1155/2014/834202.
- Halmi, M. I. E., Kassim, A., & Shukor, M. Y. (2019). Assessment of heavy metal toxicity using a luminescent bacterial test based on *Photobacterium* sp. strain MIE. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 30(3), 589-601.
- Iglesias-Rodríguez MV, García-Mesa L, Ortiz-Guilarte E, Álvarez-Valcárcel CM, Lugoioy-Gallardo GM, Núñez-Moreira RR. (2020a). Influencia del pH y la concentración de NaCl en el crecimiento y emisión de luz de dos cepas de *Vibrio harveyi*. *Biotechnol Apl.*, 37(4), 4211-7.
- Iglesias-Rodríguez, M. V., Umaña-Castro, R., Garcia-Mesa, L., Ortiz-Guilarte, E., Núñez-Moreira, R., Álvarez-Valcárcel, C., & Lugoioy-Gallardo, G. M. (2020b). Caracterización fenotípica y molecular, e influencia de medios de cultivo, en el crecimiento y emisión de luz de bacterias del litoral de La Habana, Cuba. *Revista de Biología Tropical*, 68(4), 1298-1310.
- ISO-11348-1. (2007). Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 1: Method using freshly prepared bacteria (ISO 11348-1:2007, IDT).
- Jacek, P., da Silva, F. A. S., Dourado, F., Bielecki, S., & Gama, M. (2021). Optimization and characterization of bacterial nanocellulose produced by *Komagataeibacter rhaeticus* K3. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100022.
- Jan, A. T., Azam, M., Choi, I., Ali, A., & Haq, Q. M. (2016). Analysis for the presence of determinants involved in the transport of mercury across bacterial membrane from polluted water bodies of India. *Brazilian journal of microbiology*, 47, 55-62. doi:10.1016/j.bjm.2015.11.023.
- Jiménez, M. G. (2015). Superficies de respuesta mediante un diseño central compuesto. *Revista Varianza*, 11, 31-36.
- Khani, M. H. (2011). Statistical analysis and isotherm study of uranium biosorption by *Padina* sp. algae biomass. *Environmental Science and Pollution Research*, 18, 790-799.
- Lerch G (1977). *La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas*. Ed. Científico Técnica. La Habana.
- López Planes, R. (1988). *Diseño estadístico de experimentos*. Ed. Científico-Técnica. La Habana.
- Lopez-Roldan, R., Kazlauskaitė, L., Ribo, J., Riva, M. C., González, S., & Cortina, J. L. (2012). Evaluation of an automated luminescent bacteria assay for in situ aquatic toxicity determination. *Science of the total environment*, 440, 307-313.
- Mackenzie, E. L., Iwasaki, K., & Tsuji, Y. (2008). Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*, 10(6), 997-1030. doi:10.1089/ars.2007.1893.
- Mahendran, G., Savitha, T., Khalifa, A. Y., Sharma, A., & Sankaranarayanan, A. (2022). Evaluation of environment by microbial sensors. In *Bioprospecting*. 424. Elsevier-of Microbial Diversity (pp. 407
- Martín, A., Serrano, S., Santos, A., Marquina, D., & Vázquez, C. (2010). Bioluminiscencia bacteriana. *Reduca (Biología)*, 3(5), 75-86.
- Montgomery, D. C. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos*. México, D. F. Limusa Wiley (2ª Ed). México 75-81 pp. p 681.
- Muneeswaran, T., Kalyanaraman, N., Vennila, T., Rajesh Kannan, M., & Ramakritinan, C. M. (2021). Rapid assessment of heavy metal toxicity using bioluminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* strain GoMGm1. *Environmental Monitoring and Assessment*, 18-1, 193.
- Nawaz, A., & Ahmed, N. (2011). Isolation and characterization of indigenous luminescent marine bacteria from Karachi coast. *Academic Research International*, 1(2), 74.
- Park, J., Shin, K., Lee, H., Choi, S., Kim, G., Depuydt, S., De Saeger, J., Heynderickx, P.M., Wu, D., Asselman, J., Janssen, C., & Han, T. (2023). Evaluating ecotoxicological assays for comprehensive risk assessment of toxic metals present in industrial wastewaters in the Republic of Korea. *Science of The Total Environment*, 867, 161536.
- Parmar, P., Shukla, A., Goswami, D., Patel, B., & Saraf, M. (2020). Enhanced detection of heavy metals using *Vibrio alginolyticus* PBR1 by optimizing luminescence medium through statistical modeling. *Environmental Sustainability*, 3(4), 437-452.
- Pérez, C., Oramas, J., Arcadio, E., Miranda, A., Roman, Y., & González, A. (2019). Optimización del medio de cultivo y las condiciones de fermentación para la producción de un biofertilizante a base de

- Pseudomonas fluorescens*. *Biotecnología Vegetal*, 19 (2), 127-138.
- Quinn, C. W., Cate, D. M., Miller-Lionberg, D. D., Reilly III, T., Volckens, J., & Henry, C. S. (2018). Solid-phase extraction coupled to a paper-based technique for trace copper detection in drinking water. *Environmental science & technology*, 52(6), 3567-3573.
- Ramesh, C., Mohanraju, R., Karthick, P., & Narayana, S. (2014). Impact of light, temperature, salinity and glycerol on the intensity of luminescence and growth of marine bioluminescent bacteria *Vibrio campbellii* (strain STF1). *Current Science*, 511-513.
- Rodríguez, M. D., Castrillo, M. L., Velázquez, J. E., Kramer, G. R., Sedler, C., Zapata, P. D., & Villalba, L. (2017). Obtención de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino pretratado secuencialmente con ácido-base. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(2), 317-324.
- Schlembach, I., Grünberger, A., Rosenbaum, M. A., & Regestein, L. (2021). Measurement techniques to resolve and control population dynamics of mixed-culture processes. *Trends in biotechnology*, 39(10), 1093-1109.
- Scordia, D., Cosentino, S. L., & Jeffries, T. W. (2010). Second generation bioethanol production from *Saccharum spontaneum* L. ssp. *aegyptiacum* (Willd.) Hack. *Bioresource Technology*, 101(14), 5358-5365.
- Shanware, A., Thakre, N., & Pande, S. (2013). Isolation and characterization of novel marine luminescent bacteria from Diu beach, India. *Journal of Pharmacy Research* 7(2013) 529-533. doi.org/10.1016/j.jopr.2013.05.019.
- Simutis, R., & Lübbert, A. (2015). Bioreactor control improves bioprocess performance. *Biotechnology journal*, 10(8), 1115-1130.
- Srivastava, V. S., & MacLeod, R. A. (1971). Nutritional requirements of some marine luminous bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 17(5), 703-711.
- Stuart, M., Lugioyo, M., & Álvarez, C. (1999). Atenuación de la luminiscencia de una cepa de *Photobacterium leiognathi*, aislada de aguas cubanas, por acción de xenobióticos y muestras ambientales. *Contribution to Education and environmental protection*, 0, 32-35.
- Veysi, S., & Zeinoddini, M. (2023). Optimized Detection of Water and Food Toxin Contamination Using *Vibrio persian* Bioluminescence Inhibition Assay (VPBIA). *Journal of Water Chemistry and Technology*, 45(6), 564-573. doi.org/10.3103/S1063455X23060073.
- Villaescusa, I., Marti, S., Matas, C., Martine, M., & Ribó, J. M. (1997). Chromium (VI) toxicity to luminescent bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16(5), 871-874.

Efecto inhibidor de los extractos oleaginosos de *Coffea arabica* y *Ananas comosus* sobre *Enterococcus faecalis*

Inhibiting effect on oleaginous extracts of *Coffea arabica* and *Ananas comosus* on *Enterococcus faecalis*

Nelson Alfonso Vega Contreras*, María Angélica Farfan Casadiego**, Angie Lisandra García Pabón***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.119003

RESUMEN

La resistencia de los microorganismos a los agentes antimicrobianos representa un desafío crítico para la salud pública. Entre estos, *Enterococcus faecalis* destaca como una bacteria grampositiva, anaerobia facultativa y oportunista, reconocida como uno de los principales causantes de infecciones nosocomiales. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto inhibidor de los extractos oleaginosos obtenidos de la cáscara de café (*Coffea arabica*) y las hojas de la corona de piña (*Ananas comosus*) sobre el crecimiento de *E. faecalis*, con el fin de explorar alternativas naturales para su control. Metodológicamente, en la investigación se recolectaron 6 kg de hojas de corona de piña y cáscara de café; las hojas fueron deshidratadas en horno y luego molidas hasta obtener una harina fina. La extracción de los compuestos oleaginosos se realizó mediante el método Soxhlet, La identificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida. En cuanto a la evaluación de la actividad antimicrobiana, se utilizó el método de difusión en disco sobre agar Mueller-Hinton, empleando oxacilina como control positivo y DMSO como control negativo. Los resultados se expresaron en milímetros de los halos de inhibición generados por cada concentración de los extractos. A concentración del 100%, el extracto de *A. comosus* presentó un halo de inhibición de 2,34 mm, mientras que el de *C. arabica* alcanzó los 3,11 mm, siendo esta la concentración más efectividad. Se concluyó que los extractos de ambas fuentes vegetales presentan actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*, y el análisis ANOVA confirmó diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

Palabras clave: antimicrobianos, compuestos fenólicos, extractos vegetales, microorganismos, residuos.

ABSTRACT

The resistance of microorganisms to antimicrobial agents represents a critical challenge for public health. Among these, *Enterococcus faecalis* stands out as a gram-positive, facultative anaerobic and opportunistic bacterium, recognized as one of the main causes of nosocomial infections. The present study aimed to evaluate the inhibitory effect of oleaginous extracts obtained from coffee husk (*Coffea arabica*) and pineapple crown leaves (*Ananas comosus*) on the growth of *E. faecalis*, in order to explore natural alternatives for its control. Methodologically, in the research 6 kg of pineapple crown leaves and coffee husk were collected; the leaves were dehydrated in an oven and then ground to

*. Universidad Francisco de Paula Santander, Correo electrónico nelsonalfonsovc@ufps.edu.co, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5013-2146>, Colombia

** Universidad Francisco de Paula Santander, Correo electrónico: mariaangelicafaca@ufps.edu.co, ORCID : <http://orcid.org/0009-0009-4333-6544> , Colombia

*** Universidad Francisco de Paula Santander, Correo electrónico: angielisandragapa@ufps.edu.co, ORCID <http://orcid.org/0009-0009-8619-8364>. Colombia

obtain a fine flour. The extraction of oleaginous compounds was carried out by the Soxhlet method. The identification of phenolic compounds was carried out by liquid chromatography. As for the evaluation of antimicrobial activity, the disc diffusion method was used on Mueller-Hinton agar, using oxacillin as a positive control and DMSO as a negative control. The results were expressed in millimeters of the inhibition halos generated by each concentration of the extracts. At 100% concentration, the *A. comosus* extract presented an inhibition halo of 2.34 mm, while that of *C. arabica* reached 3.11 mm, this being the most effective concentration. It was concluded that extracts from both plant sources showed antimicrobial activity against *E. faecalis*, and ANOVA analysis confirmed significant differences between the treatments applied.

Keywords: antimicrobials, phenolic compounds, plant extracts, microorganisms, residues.

Recibido: febrero 23 de 2025 **Aprobado:** abril 25 de 2025

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es de las principales preocupaciones de la salud pública a nivel mundial (Singaravelu, 2019; Li *et al.*, 2025). Este fenómeno ha sido reconocido por la Organización Mundial de la Salud, como una de las mayores amenazas para la salud humana (OMS, 2020), debido a su impacto en la eficacia de los tratamientos y al aumento de la morbilidad y mortalidad asociadas a infecciones bacterianas (Spellberg *et al.*, 2011). Entre los microorganismos que han desarrollado resistencia a múltiples antibióticos destaca el género *Enterococcus*, considerado uno de los principales patógenos nosocomiales (Almeida-Santos *et al.*, 2025). Su resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos dificulta significativamente su tratamiento (Cercenado, 2011), y lo convierte en un agente causal de entre el 5% y el 15% de los casos de enfermedades como la endocarditis (Escola *et al.*, 2020). La Organización Mundial de la Salud ha clasificado *Enterococcus faecalis* como un patógeno de alta prioridad debido a su resistencia a múltiples fármacos, lo que limita significativamente las opciones terapéuticas disponibles. Este microorganismo representa un desafío creciente en la medicina moderna, ya que está asociado con infecciones graves y de difícil tratamiento (Aguirre & Huatuco, 2014). Se estima que aproximadamente el 80% de las infecciones por *Enterococcus* son causadas por *E. faecalis*, es importante resaltar que, aunque forma parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal, genitourinario y la saliva, puede actuar como patógeno oportunista y provocar complicaciones severas en ciertas condiciones (Rufasto *et al.*, 2023). Estos factores subrayan la urgencia de desarrollar nuevas estrategias para su control. Esta situación ha impulsado la búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces y seguras, entre las cuales los extractos naturales han emergido como una opción prometedoras debido a su amplia gama de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas (Tril *et al.*, 2014). Esta actividad está relacionada principalmente con el alto contenido de compuestos fenólicos, autores como (Vega *et al.*, 2020), (Vega *et al.*, 2024) y (Pérez y Tuberquia, 2023) han demostrado en sus investigaciones que residuos co-

mo la piña (*Ananas comosus*) y el café (*Coffea arabica*), poseen actividad antimicrobiana que puede inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. El consumo de estos alimentos se limita a su pulpa, desechando su cáscara y la corona en el caso de la piña. Estos residuos poseen una gran cantidad de beneficios que pueden ser aprovechados en la industria alimentaria y farmacéutica, entre otros (Cerquera & Ibarra, 2022). En consecuencia, para el aprovechamiento de estos residuos orgánicos, el presente estudio evaluó el efecto inhibidor de los extractos oleaginosos de *Coffea arabica* y *Ananas comosus* sobre *Enterococcus faecalis*.

MATERIALES Y METODOS

FASE I: Recolección, secado y molienda

Se siguió la metodología planteada por (Cangussu *et al.*, 2021), con algunas modificaciones para lo cual se recolectaron 6kg de la cascarilla de café (*Coffea arabica*) y de coronas de la piña (*Ananas comosus*) a partir de los desechos encontrados en la central de abastos, seguidamente se llevó a cabo el proceso de secado con las hojas de la corona de piña (*Ananas comosus*), en la cual se utilizó un horno de secado especializado capaz de deshidratar los alimentos, se ajustó a una temperatura constante de 60°C por un tiempo de 72h (Johny *et al.*, 2023). Durante esta fase se controló y registro el tiempo de secado necesario para obtener una deshidratación adecuada y calcular el porcentaje humedad perdida de la muestra inicial (% H_{hb}) aplicando la ecuación 1, (Subdirección de metrología física, 2022). Posteriormente se llevó a cabo la molienda y tamizado de las hojas de (*Ananas comosus*), y la cascarilla de (*Coffea arabica*). La molienda se realizó con el fin de obtener una harina fina o polvo fino.

$$\%H_{hb} = \frac{m_h - m_s}{m_h} \times 100$$

(Ecuación 1)

FASE II: Extracción, rendimiento e identificación de compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos de la cascari-lla de café (*Coffea arabica*) y la corona de piña (*Ananas comosus*) se realizó mediante el método Soxhlet, utilizando una extracción sólido-líquido. Para cada proceso, se empleó 1 L de etanol al 96% como solvente. Al finalizar la extracción, se llevó a cabo una destilación simple con el objetivo de concentrar y purificar el extracto oleaginoso. Posteriormente, las muestras obtenidas se almacenaron en frascos ámbar para su conservación. El rendimiento del proceso se calculó utilizando la ecuación 2 descrita por (Fuentes & Luis 2013).

$$\%R = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

(Ecuación 2)

La identificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante el análisis de cromatografía líquida de ultra-alta resolución con detector de masas Orbitrap (UHPLC-ESI-ORBITRAP-HRMS), las preparaciones de las muestras analizadas se disolvieron en una muestra en mezcla de metanol: Agua (1:1 v/v) con ácido fórmico 0.2% v/v, vórtex (5 min) y sonicación (5 min) y posterior inyección al equipo cromatográfico. Como estándares de referencia se utilizaron las xantinas: cafeína (Part N° C8960-250G, Sigma-Aldrich), teobromina (Part N° T4500-25G, Sigma-Aldrich) y teofilina (Part N° T1633-25G, Sigma-Aldrich); las catequinas: (±)-catequina (C) (Part N° C1788-500MG, Sigma-Aldrich), (-)-epigallocatequina galato (EGCG) (Part N° E4143-50MG, Sigma-Aldrich), (-)-epicatequina (EC) (Part N° E1753-1G, Sigma-Aldrich), (-)-epicatequina galato (ECG) (Part N° E3893-10MG, Sigma-Aldrich), (-)-epigallocatequina (EGC) (Part N° E3768-5MG, Sigma-Aldrich); los flavonoides: ácido caféico (Part N° C0625, Sigma-Aldrich), ácido p-cumárico (Part N° C9008, Sigma-Aldrich), ácido rosmarínico (Part N° 536954-5G, Sigma-Aldrich), quercetina (Part N° Q4951-10G, Sigma-Aldrich), naringenina (Part N° N5893-1G, Sigma-Aldrich), luteolina (Part N° L9283-10MG, Sigma-Aldrich), kaempferol (Part N° K0133-50MG, Sigma-Aldrich), pinocembrina (Part N° P5239, Sigma-Aldrich), apigenina (Part N° A3145-25MG, Sigma-Aldrich); las antocianinas: cianidina 3-rutinosido (Part N° G36428, Sigma-Aldrich), pelargonidina 3-glucósido (Part N° 53489, Sigma-Aldrich). Se utilizó un Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia (UHPLC), Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.), equipado con una bomba binaria de gradiente (HP G3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC 3000). La interfaz del LC-MS fue la electronebulización (ESI) y el espectrómetro de masas fue de alta resolución

con un sistema de detección de corrientes de iones Orbitrap. Operado en modo positivo con un voltaje de capilar de 3,5 kV. La fase móvil fue A: una solución de ácido fórmico 0,2% v/v en agua, y B: ácido fórmico 0,2% v/v en acetonitrilo. La condición inicial de gradiente fue de 100% A, cambiando linealmente hasta 100% B (8 min); se mantuvo durante 4 min; el retornó a las condiciones iniciales en 1 min; el tiempo total de corrida fue de 13 min, con 3 min para post-corrida. La identificación de los compuestos se realizó usando el modo de adquisición full scan y la extracción de corrientes iónicas (EIC) correspondientes a los [M+H]⁺ de compuestos de interés, medición de masas con exactitud y precisión de $\Delta m/p < 1$ y usando una solución-mix estándar de los compuestos (material de referencia certificado), para la cuantificación de los analitos de interés se usó el método de estandarización externa.

FASE III: Análisis microbiológicos

Para el análisis microbiológico del efecto antimicrobiano se realizaron pruebas de difusión en agar Müller Hinton, las cuales se realizaron por triplicado con la utilización del método de Kirby Bauer (Alhamadani y Oudah, 2022). Seguidamente, en el proceso de preparación de la suspensión bacteriológica se empleó la escala de McFarland (Kuate et al., 2006), como referencia estándar para determinar la concentración de la bacteria para la cual, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 625nm, comúnmente utilizada para para este propósito, asimismo se tomaron alícuotas de 100 μ L (1×10^8 UFC/ml) de *E. faecalis*, las cuales fueron inoculadas en cada una de las placas Petri con agar Müller Hinton, sumergiendo así, un hisopo estéril en la suspensión bacteriana para distribuirlo uniformemente en tres direcciones sobre el agar, se dejó secar la placa a temperatura ambiente para que cualquier exceso de humedad superficial. Para el control positivo se diluyó 5ml de agua destilada en 1g de Oxacilina, obteniendo una concentración apropiada de 0,1% de antibiótico. Para la preparación de los tratamientos tabla 1, se procedió a diluir los extractos en dimetilsulfóxido (DMSO) y se prepararon las concentraciones en tubos de Eppendorf estériles. Seguidamente, los discos de papel filtro se añadieron con una pinza estéril, los cuales eran embebidos con 10 μ L cada uno con las concentraciones de los tratamientos a (25%, 50%, 75% y 100%). Se incubaron las placas en posición invertidas dentro de los 15 min posteriores de la aplicación de los extractos a evaluar, a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24h, pasado el tiempo de incubación se examinó cada placa y se midieron los diámetros (mm) de los halos de inhibición de crecimiento alrededor de cada disco, utilizando una regla milimétrica abarcando así, el diámetro del halo.

Tabla 1. Preparación de tratamientos.

Concentración	Extracto (μL)	DMSO (μL)
25%	25	75
50%	50	50
75%	75	25
100%	100	0
Control positivo	Oxacilina	
Control negativo	DMSO	

FASE IV: Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados para evaluar la variabilidad en la inhibición de *Enterococcus faecalis* causada por los extractos de *Ananas comosus* y *Coffea arabica* en diferentes tratamientos. Para este análisis, se utilizó el software estadístico SPSS versión 29, lo que permitió evaluar los resultados obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

FASE I Recolección, secado molienda

En esta fase se registró el tiempo de secado junto al peso de las hojas obteniendo un resultado de 3,18kg a las 24h, 1,59kg a las 48h y a las 72h con un peso final de 0,76kg, esto con el fin de obtener una deshidratación adecuada y conocer el dato de % de humedad perdida de este proceso, teniendo en cuenta que el resultado fue de 87,33% humedad perdida, a la muestra inicial. En la figura 1 se observa que el peso de la muestra húmeda disminuye, lo que indica la pérdida de agua en la muestra.

Una vez completado el proceso de secado, se procedió a obtener el polvo fino de las hojas de la corona de la piña (*Ananas comosus*) donde se obtuvo 400 gr de harina fina. A su vez se realizó la molienda de la cascara de café (*Coffea arabica*), donde se obtuvo 350 gr de harina fina. Según (Contreras-López, *et al.*, 2019), se encontró que la reducción del tamaño del grano de café mediante molienda fina aumenta significativamente el rendimiento en la extracción.

FASE II: Extracción, rendimiento e identificación de compuestos fenólicos en extractos por cromatografía líquida tipo HPLC

El proceso de extracción se realizó en el quipo Soxhlet, mediante el método de separación solido-liquido, usando 1L de etanol al 96% como solvente, al igual que la metodología propuesta por (Vega y Torres 2021), siendo esto de gran importancia ya que de acuerdo con

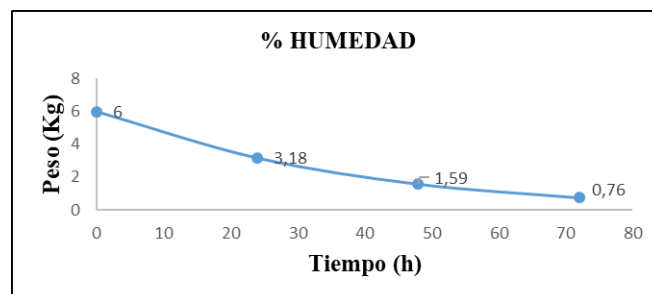


Figura 1. Curva de secado de las hojas de la corona de la piña (*Ananas comosus*).

(Fuentes & Luis 2013), el método de extracción por Soxhlet posee mayor rendimiento a diferencia de extracción asistida por ultrasonidos y extracción por microondas; estas diferencias observadas se deben a que la técnica de arrastre con vapor no entra en contacto directo con el solvente líquido inicialmente, lo que reduce la degradación de compuestos de interés al aumentar la temperatura de operación. Además, el tiempo de contacto entre el solvente fresco y la matriz vegetal permite una extracción eficiente de los compuestos afines. Sin embargo, este método requiere un alto consumo de energía para volatilizar el solvente repetidamente mediante una manta de calentamiento, aunque permite determinar condiciones de extracción óptimas, su uso se limita a la escala de laboratorio. No obstante, su aplicación puede servir para aproximar condiciones para la implementación de otros métodos que pueden ser escalados a nivel piloto o industrial. Se calculó el rendimiento de los extractos oleaginosos teniendo en cuenta la ecuación 2, en la cual se obtuvo 121,944% de rendimiento en el extracto de las hojas de la corona de la piña (*Ananas comosus*) lo que indica que los compuestos fenólicos presentes en las coronas de piña se extraen con alta eficiencia (Vega *et al.*, 2024). En comparación con el extracto de café (*Coffea arabica*) arrojó un rendimiento menor del 29,43%. Estos datos sugieren que, aunque ambos residuos contienen compuestos fenólicos bioactivos, la piña puede ser la fuente más eficiente en términos de cantidad de compuestos extraí-

dos por unidad de peso. Seguidamente se seleccionaron una muestra de 10ml de cada extracto para llevar a cabo el análisis cromatográfico de tipo UHPLC. En este análisis, se determinaron y cuantificaron diversos compuestos fenólicos presentes en los extractos oleaginosos de las hojas de corona de piña (*Ananas comosus*) tabla 2 y cascaras de café (*Coffea arabica*) tabla 3.

En la tabla 2 se presentan los resultados observados en la identificación de compuestos fenólicos en el extracto de *Ananas comosus*, donde se detectaron 28 compuestos. Entre ellos la cafeína, ácido vanílico y ácido *p*-cumárico se encontraron en mayor concentración. El ácido rosmarínico es el polifenol con una mayor concentración (< 2,0) presente en la tabla 2 y se han destacado polifenólicos bioactivos naturales presentes en numerosas especies vegetales (Sanchez, 2018), a su vez posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Almonacid, 2016). En los resultados del estudio realizado por (Ramírez et al., 2019), para el ácido rosmarínico muestran valores inferiores a los obtenidos por (Muñoz et al., 2013), quienes evaluaron distintos métodos de secado y obtuvieron un promedio 20 µg mg⁻¹ (-1) en romero, lo cual, hace referencia a que esta planta es una mejor fuente para la extracción de este compuesto. Por su parte (Li et al., 2014), realizó un estudio en el cual identificó los principales polifenoles presentes en la cascara de piña donde en el cual obtuvo en mayor concentración en la cromatografía el ácido gálico, catequina, epicatequina y ácido ferúlico.

El análisis de los compuestos fenólicos en el extracto de la cascara *Coffea arabica* se reveló la presencia de varios compuestos bioactivos como xantinas (cafeína, teobromina y teofilina), catequinas y flavonoides, que son responsables de las propiedades antioxidantes y antibacterianas del extracto (Biharee et al., 2020; Wu y Brown, 2021; Górnaiak et al., 2019). Estos compuestos son ampliamente conocidos por su capacidad para combatir una variedad de patógenos, incluidos los microorganismos resistentes a los antibióticos. En este sentido, los resultados hasta el momento muestran el potencial de los extractos de café arábica y piña como agentes antibacterianos naturales, destacando el extracto de café por su efecto más potente. De acuerdo a los resultados observados en la tabla 5, se logra evidenciar que la cascara de *Coffea arabica* empleada en este estudio, presenta en mayor proporción los compuestos como la Cafeína, teobromina, teofilina y ácido gálico, con concentraciones de 19385 mg kg⁻¹, 62 mg kg⁻¹, 31 mg kg⁻¹ y 8,0 mg kg⁻¹. Siendo el compuesto principal en la cascara, la cafeína (19385 mg/kg), refleja su acumulación característica en diferentes partes del café, particular-

mente en semillas y subproductos como la cascara. Así como en la investigación realizada por (Ballesteros et al., 2017). Se reportaron valores similares, destacando que la cascara del café puede ser una fuente rica y sostenible de cafeína. De igual manera el ácido gálico es un polifenol ampliamente estudiado por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Aunque presente en menor proporción (8,0 mg kg⁻¹) en la cascara de *Coffea arabica*, su capacidad para neutralizar radicales libres y su sinergia con otros compuestos bioactivos lo convierten en un ingrediente potencialmente valioso. Estudios como los de (Murthy y Naidu, 2012), destacan que los ácidos fenólicos, incluidos el ácido gálico, son prominentes en subproductos del café y contribuyen significativamente a su actividad antioxidante.

FASE 3: Análisis microbiológicos

En cuanto a la actividad antimicrobiana, los estudios microbiológicos demostraron que ambos extractos presentaron un efecto inhibidor sobre *Enterococcus faecalis*, aunque existen claras diferencias en el alcance de este efecto. La aplicación del extracto en concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100% mostró un halo inhibidor de 0mm, 1.33mm, 1.88mm y 2.44mm del crecimiento alrededor de los discos intervertebrales impregnados con el extracto de *Ananas comosus* (figura 2). En el mismo orden secuencial de concentraciones se presentó un halo de inhibición de 1.33mm, 1.66mm, 2mm y 3.11mm para el extracto de *Coffea arabica* el cual presenta un halo significativo desde el primer tratamiento a una concentración mínima de 25%, en comparación con el extracto de piña que no presenta halo de inhibición a esa concentración. El halo fue mayor en la concentración más alta para ambos extractos, lo que indica que la actividad antimicrobiana depende de la concentración del extracto. Lo cual, corresponde con lo encontrado por (Kim et al., 2015), donde El ácido oleanólico mostró actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* a partir de concentraciones de 32 µg/mL, inhibiendo el crecimiento bacteriano. Sin embargo, dependiendo de la cepa, la concentración mínima inhibitoria (MIC) varió hasta 64 µg/mL. Este compuesto actúa dañando la membrana celular bacteriana, lo que conduce a la muerte del microorganismo. El uso de estos extractos en regiones de concentración creciente demostró una clara efectividad de una "respuesta a la dosis", donde los extractos más concentrados produjeron zonas de inhibición más grandes, lo que respalda la posibilidad de que estos extractos puedan ser efectivos como antimicrobianos para el control de *Enterococcus faecalis* bacteria muy resistente a los antibióticos (Paradella et al., 2013). Estos resultados indican que ambos extractos tienen un gran poten-

Tabla 2. Nivel mínimo de cuantificación (NMC=2NMD), tiempo de retención (tR) y resultados de la determinación de compuestos presentes en las hojas de piña.

Compuesto	t _R , min	NMC*, mg Kg ⁻¹	Concentración en las muestras, mg kg ⁻¹
993315-01-EB			
Muestra de extracto de corona de piña <i>Ananas Comosus</i>			
Teobromina	2.3	0.1	28
Teofilina	2.5	0.1	51
Epigallocatequina (EGC)	2,6	0.1	0.5
Catequina (C)	2.7	0.1	<0.1
Epicatequina (EC)	2.9	0.1	1.7
Ácido p-hidroxibenzoico	2.9	0.1	< 0.1
Cafeína	2.8	0.1	4899
Ácido cafeico	3.7	0.1	< 0.1
Ácido vanílico	2.9	0.1	108
Epigallocatequina galato (EGCG)	3.0	0.1	<0.1
Ácido p-cumárico	3.3	0.1	193
Epicatequina galato (ECG)	3.4	0.1	<0.1
Ácido ferúlico	3.4	0.1	9.5
Quercetina	3.2	0.1	52
Ácido rosmarínico	3.7	2.0	< 2.0
Cianidina	3.5	0.1	1.0
Luteolina	4.2	0.1	0.4
Kaempferol	4.6	0.1	0.1
Ácido trans-cinámico	4.4	0.4	19
Naringenina	4.6	0.1	0.3
Apigenina	4.5	0.1	0.6
Pinocembrina	5.5	0.1	0.1
Ácido ursólico	8.4	0.1	6.9
Cianidina 3-rutinosido	2.7	0.1	< 0.1
Pelargonidinagg 3-glucósido	2.8	0.1	< 0.1
Kaempferol 3-glucósido	3.5	0.1	0.8
Rutina	3.2	0.1	21
Ácido gálico	1.9	0.1	< 0.1

Tabla 3. Nivel mínimo de cuantificación (NMC=2NMD), tiempos de retención (tR).

Compuesto	t _R , min	NMC*, mg Kg ⁻¹	Concentración en las muestras, mg kg ⁻¹
993315-01-EB			
Muestra de extracto de corona de piña <i>Coffea arabica</i>			
Teobromina	2.4	0.1	62
Teofilina	2,5	0,1	31
Epigallocatequina (EGC)	2.6	0.1	< 0.1
Catequina (C)	2.7	0.1	0.4
Epicatequina (EC)	2.9	0.1	4.4
Ácido p-hidroxibenzoico	2.9	0.1	6.8
Cafeína	2.8	0.1	19365
Ácido cafeico	3.7	0.1	0.5
Ácido vanílico	2.9	0.1	72
Epigallocatequina galato (EGCG)	3.0	0.1	< 0.1
Ácido p-cumárico	3.3	0.1	3.3
Epicatequina galato (ECG)	3.3	0.1	< 0.1
Ácido ferúlico	3.4	0.1	6.9
Quercetina	3.2	0.1	4
Ácido rosmarínico	3.7	2.0	< 2.0
Cianidina	3.5	0.1	2.5
Luteolina	4.2	0.1	0.2
Kaempferol	4.6	0.1	0.2
Ácido trans-cinámico	4.8	0.4	3.2
Naringenina	4.6	0.1	0.4
Apigenina	4.5	0.1	0.1
Pinocembrina	5.5	0.1	0.5
Ácido ursólico	8.4	0.1	< 0.1
Cianidina 3-rutinosido	2.6	0.1	< 0.1
Pelargonidina 3-glucósido	3.5	0.1	4
Kaempferol 3-glucósido	3.5	0.1	1.6
Rutina	3.2	0.1	15
Ácido gálico	1.9	0.1	8.0

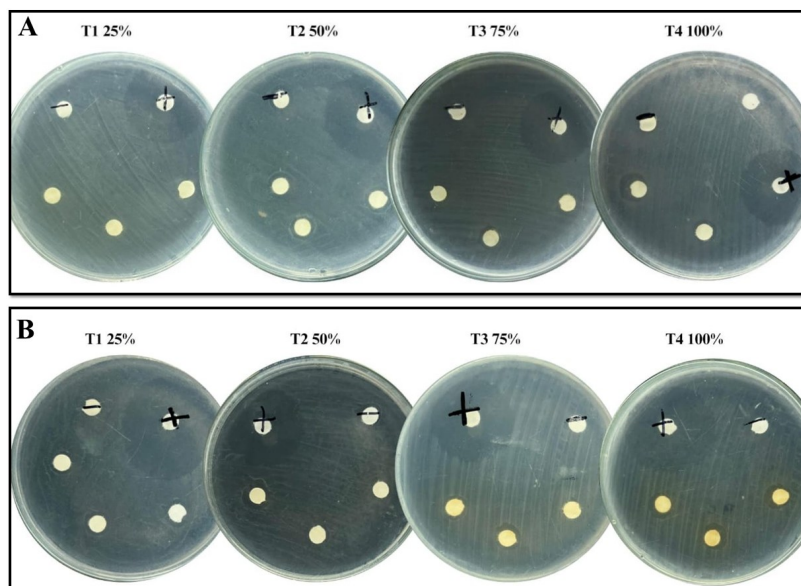


Figura 2. Resultados de la aplicación de los extractos en *Enterococcus faecalis*. A) tratamiento de *Ananas comosus* en *Enterococcus faecalis*. B) Tratamiento de *Coffea arabica*.

cial como alternativas naturales a los antimicrobianos sintéticos, especialmente a la luz de la creciente resistencia microbiana.

FASE 4: Análisis estadístico

En la tabla 4 se puede observar que existe variación en los tratamientos aplicados de *Ananas comosus*, con un valor de Sig. ($<0,001$) es menor que 0,05, lo que confirma que la diferencia entre los grupos es estadísticamente significativa.

En la tabla 6 se puede observar que existe variación en los tratamientos aplicados de *Ananas comosus*, con un valor de Sig. ($<0,001$) es menor que 0,05, lo que confirma que la diferencia entre los grupos es estadísticamente significativa.

Análisis Comparativo de *Ananas comosus* y *Coffea arabica*

De acuerdo con Molina (2017), el p-valor es un indicador estadístico que permite evaluar la validez de la hipótesis nula. Los resultados del análisis ANOVA presentados en la Tabla 10 muestran un valor de p inferior a 0,05, lo que sugiere que la hipótesis nula es falsa. Por lo que existen diferencias significativas entre los dos extractos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos destacan el potencial de aprovechamiento de estos subproductos agroindustriales en la obtención de extractos oleaginosos con posibles aplicaciones biotecnológicas, demostrando que los polifenoles presentes en los extractos de *Ananas comosus* y *Coffea arabica* poseen un efecto inhibitorio sobre *Enterococcus*

Tabla 4. ANOVA: Efecto inhibitorio del extracto oleaginoso de las hojas de la corona de la piña (*Ananas comosus*).

Halos	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	158.32	4	39.58	66.27	$<.001$
Dentro de grupos	19.11	32	.597		
Total	177.43	36			

Tabla 5. ANOVA: Efecto inhibitorio del extracto oleaginoso de la cascara de café (*Coffea arabica*)

Halos	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	161.42	4	40.35	76.46	<.001
Dentro de grupos	16.88	32	.528		
Total	178.31	36			

Tabla 6. ANOVA: Efecto inhibitorio del extracto oleaginoso de la cascara de café (*Coffea arabica*) y efecto inhibitorio del extracto oleaginoso de las hojas de la corona de la piña (*Ananas comosus*).

Halos		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Halos café	Entre grupos	16.08	3	5.36	10.15	<.001
	Dentro de grupos	16.88	32	.52		
	Total	32.97	35			
Halos piña	Entre grupos	29.63	3	9.88	16.54	<.001
	Dentro de grupos	19.11	32	.59		
	Total	48.75	35			

faecalis, lo que sugiere su potencial aplicación en el desarrollo de productos biotecnológicos destinados al tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Francisco de Paula Santander por su valiosa colaboración.

Conflictos de intereses

Los autores declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

REFERENCIAS

- Almeida-Santos, A. C., Novais, C., Peixe, L., & Freitas, A. R. (2025). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: A current perspective on resilience, adaptation, and the urgent need for novel strategies. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 41, 233–252. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2025.01.016>.
- Apaza-Apaza, R. A., Asillo-Choquehuanca, S., Padilla-Cáceres, T. C., Mamani-Cori, V., Catacora-Padilla, P. O., & Apaza-Apaza, F. D. B. (2022). Efectos del xilitol en el crecimiento bacteriano frente a *Streptococcus sanguinis*: Estudio in vitro. *Odontoestomatología*, 24 (40). <https://doi.org/10.22592/ode2022n40e226>.
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3493-3503. <https://link.springer.com/article/10.1007/S11947-014-1349-Z>
- Biharee, A., Sharma, A., Kumar, A., & Jaitak, V. (2020). Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia*, 146, 104720. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104720>.
- Bush, L., & Vazquez, M. (2023). Infecciones por *Enterococcus*. *Manual MSD*. <https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-positive-cocci/staphylococcal-infections>.
- Cangussu, L. B., Melo, J. C., Franca, A. S., & Oliveira, L. S. (2021). Chemical characterization of coffee husks, a by-product of *Coffea arabica* production. *Foods*, 10 (12), 3125. <https://doi.org/10.3390/foods10123125>.
- Elles, N. E. (2010). Validación de la técnica de recuento de coliformes totales y *E. coli* por el método filtración de membrana en el laboratorio de control de calidad de aguas de Cartagena S.A. E.S.P. <https://doi.org/10.22519/21455333.61>
- Gómez Castañeda, M. O., Núñez Sánchez, L. M., Valenzuela Bravo, J., Duarte Muñoz, M., & Gáfar, D. E. (2023). Evaluación fisicoquímica del aceite obtenido de la borra de café (*Coffea arabica*) empleando dife-

- rentes métodos de extracción para su potencial uso en la producción de biodiesel. *CITECSA*, 15(25), 21–27. <https://unipaz.edu.co/revistas/revcitecsa/article/view/345>
- Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18, 241–272. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Johny, V., Kuriakose Mani, A., Palanisamy, S., Rajan, V. K., Palaniappan, M., & Santulli, C. (2023). Extraction and physico-chemical characterization of pineapple crown leaf fibers (PCLF). *Fibers*, 11(1), 5. <https://doi.org/10.3390/fib11010005>
- Kim, S., Lee, H., Lee, S., Yoon, Y., & Choi, K. H. (2015). Antimicrobial action of oleanolic acid on *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus faecalis*. *PLOS ONE*, 10(3), e0118800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118800>
- Kuete, V., Ngameni, B., Simo, C. C. F., Tankeu, R. K., Ngadjui, B. T., Meyer, J. J. M., Lall, N., & Kuiate, J. R. (2006). Actividad antimicrobiana de los extractos crudos y compuestos de *Ficus chlamydocarpa* y *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 17–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.026>
- Li, L., Xu, X., Cheng, P., Yu, Z., Li, M., Yu, Z., ... & Song, X. (2025). *Klebsiella pneumoniae*-derived outer membrane vesicles mediated bacterial virulence, antibiotic resistance, host immune responses and clinical applications. *Virulence*, 16(1), 2449722. <https://doi.org/10.1080/21505594.2025.2449722>
- Paradella, T. C., Koga Ito, C. Y., & Jorge, A. O. C. (2013). *Enterococcus faecalis*: Considerações clínicas e microbiológicas. *Revista de Odontologia da UNESP*, 36(2), 163–168. <https://pesquisa.bvsalud.org/porta/resource/pt/lil-529270>
- Sánchez-Tito, M. A., & Collatupa, J. L. C. (2021). Actividad antibacteriana de un extracto etanólico de propóleo peruano frente a *Streptococcus mutans*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 40(3). <https://revibiomedica.sld.cu/index.php/ibi/article/view/1121/1048>
- Singaravelu, S., Sankarapillai, J., Sasidharn Chandrakumari, A., & Sinha, P. (2019). Efecto de las concentraciones de extracto de corteza de *Azadirachta indica* contra patógenos bacterianos grampositivos y gramnegativos. *Journal of Pharmacology and Bioallied Sciences*, 11(1), 33–37. <https://revodontolunesp.com.br/journal/rou/article/588018097f8c9d0a098b4a37>
- Vega, N. A., Salazar, S. A., Bautista, L. T., & Muñoz, G. E. (2020). Evaluación del efecto inhibitor de la enzima polifenol oxidasa en una salsa de aguacate (*Persea americana*). *Entre Ciencia e Ingeniería*, 14(27), 58–62. <https://doi.org/10.31908/19098367.0007>
- Vega Contreras, NA y Torres Salazar, ML (2021). Evaluación de compuestos fenólicos de (*Citrus sinensis*) y su capacidad antioxidante. *Ciencia en Desarrollo*, 12 (2), 109–117. <https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n2.2021.11635>
- Vega, N. A., Villada Castillo, D. C., & Becerra Moreno, D. (2024). Antimicrobial effect of polyphenolic extracts present in *Ananas comosus*. *Ingeniería Y Competitividad*, 26(2), e–20914003. <https://doi.org/10.25100/iyv.v26i2.14003>
- Wu, M., & Brown, A. C. (2021). Applications of catechins in the treatment of bacterial infections. *Pathogens*, 10(5), 546. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050546>

Análisis y aplicación del acoplamiento molecular de serotonina para la caracterización de dianas terapéuticas en trastornos depresivos

Analysis and application of molecular docking of serotonin for the characterization of therapeutic targets in depressive disorders

Willington Londoño Ramos*, Julio Cesar Caicedo Eraso**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.116996

RESUMEN

La serotonina es un neurotransmisor encargado de muchas funciones dentro del cuerpo humano, además tiene gran influencia en el estado de ánimo de la persona. De otra parte, los fármacos ISRS tienen la función de inhibir el proceso de recaptura de serotonina en la proteína 5HT, en este estudio validamos dicha condición usando acoplamiento molecular, encontrando la gran influencia que tienen estos fármacos en las dianas moleculares de esta proteína. Además, analizamos si un factor epigenético externo como el cortisol, hormona generada en situaciones de estrés, influye en los sitios de unión de la proteína 5HT. Como conclusión, se encontró que el acoplamiento de la hormona cortisol no presento una congruencia con los acoplamientos moleculares de los demás fármacos, siendo esto relevante para determinar que los sitios de unión de estos no se ven afectados directamente por la hormona, a pesar de que esta demuestra gran influencia en estudios realizados *in vitro* e *in vivo*.

Palabras clave: SERT, ISRS, acoplamiento molecular, proteómica, epigenética.

ABSTRACT

Serotonin is a neurotransmitter responsible for many functions within the human body and has a great influence on a person's mood. On the other hand, SSRI drugs have the function of inhibiting the reuptake of serotonin in the 5HT protein. In this study, we validated this condition using molecular docking, finding the great influence that these drugs have on the molecular targets of this protein. In addition, we analyzed whether an external epigenetic factor such as cortisol, a hormone generated in stress situations, influences the binding sites of the 5HT protein. In conclusion, it was found that the coupling of the cortisol hormone did not present congruence with the molecular couplings of the other drugs, being relevant to determine that the binding sites of these are not directly affected by the hormone, despite the fact that it demonstrates a great influence in studies carried out *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: SERT, SSRI, molecular docking, proteomics, epigenetics.

Recibido: noviembre 11 de 2024

Aprobado: abril 21 de 2025

* Universidad de Caldas, <https://orcid.org/0000-0002-8252-4988>, willington.londono@ucaldas.edu.co, Colombia

** Universidad de Caldas, <https://orcid.org/0000-0003-4073-9152>, julioc.caicedo@ucaldas.edu.co, Colombia

INTRODUCCIÓN

El estudio de las ciencias ómicas ha abierto nuevas posibilidades para comprender la base molecular de múltiples enfermedades, incluyendo los trastornos mentales como la depresión, la ansiedad y la adicción. Estas patologías están estrechamente ligadas a factores contextuales y ambientales, los cuales, mediante mecanismos epigenéticos, pueden inducir modificaciones en la expresión génica y aumentar la vulnerabilidad a dichas enfermedades. Ejemplos de estas enfermedades son la depresión, la ansiedad y la adicción, así como su relación con los factores contextuales, que proporcionan el escenario apropiado para entender cómo, los cambios en los genes, dados por mecanismos epigenéticos, son efecto de la exposición a la adversidad ambiental, al estrés social y a las experiencias traumáticas (Roth, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que alrededor de 450 millones de personas padecen trastornos mentales como depresión, trastorno bipolar, demencia y otros desencadenando en tasas de suicidio elevadas (Evans-Lacko *et al.*, 2018). Como se puede observar en la Figura 1, la OMS ha revelado que las tasas de suicidio (estandarizadas por edad, dado que no se especifica si la edad influye en esta tasa) han tenido una disminución comparativa desde el año 2013 hasta el 2019, siendo el continente americano el único que muestra un aumento.

La distribución específica de este aumento se puede ver reflejada en la Figura 2, evidenciando grandes falencias en algunos sectores como Norteamérica y el caribe (estandarizadas por edad, dado que no se especifica si la edad influye en esta tasa).

En Colombia, el ministerio de salud y protección social asocia los trastornos depresivos principalmente con experiencias de violencia comunes dentro del territorio, tales como: el desplazamiento forzado, violencia intrafamiliar y violencia organizada. (Ministerio de Salud y Protección Social, n.d.).

En concordancia con el escenario descrito, se puede explicar cómo el estrés crónico, los factores estresantes, las circunstancias estresantes, la exposición repetida al estrés psicológico, los sistemas de estrés cerebral y las condiciones de vida, son realidades que conducen a cambios desadaptativos que, a largo plazo, aumentan la vulnerabilidad a los trastornos psiquiátricos como la ansiedad y la adicción (Avery *et al.*, 2016), que se asocian con síntomas de depresión (Hayase, 2016), por el impacto en los cambios neurobiológicos subyacentes al trastorno depresivo (Koob *et al.*, 2014).

Sin embargo, los estudios *in vitro* no son los únicos que han sido realizados, también existen los estudios *in silico* que han demostrado explícitamente la generación de estos trastornos. Tal es el caso de la identificación de sitios de unión del péptido LCGA-17 al receptor GABA_A y la subunidad $\alpha 2\delta$ de VGCC (Voltage-Gated Ca²⁺ channels) mediante modelado computacional, demostrando un gran potencial como ansiolítico y antidepresivo causando que los procesos de recaptación de serotonina sean mejores comparados con otros fármacos como el diazepam o la sertralina (Malyshev *et al.*, 2022).

El estudio de estos trastornos a nivel genético no ha sido ajeno a la problemática planteada (Baena *et al.*, 2013), partiendo inclusive de análisis cuánticos estimando la ocupación del sitio de acoplamiento de proteínas, que pueden determinar la depresión a corto plazo en las sinapsis

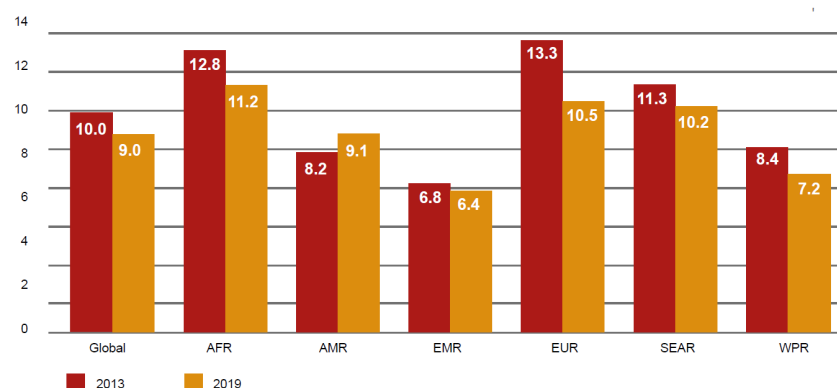


Figura 1. Tasas de suicidio estandarizadas por edad por 100.000 habitantes, por región de la OMS, 2013 y 2019 (ambos sexos) (WHO, 2020).

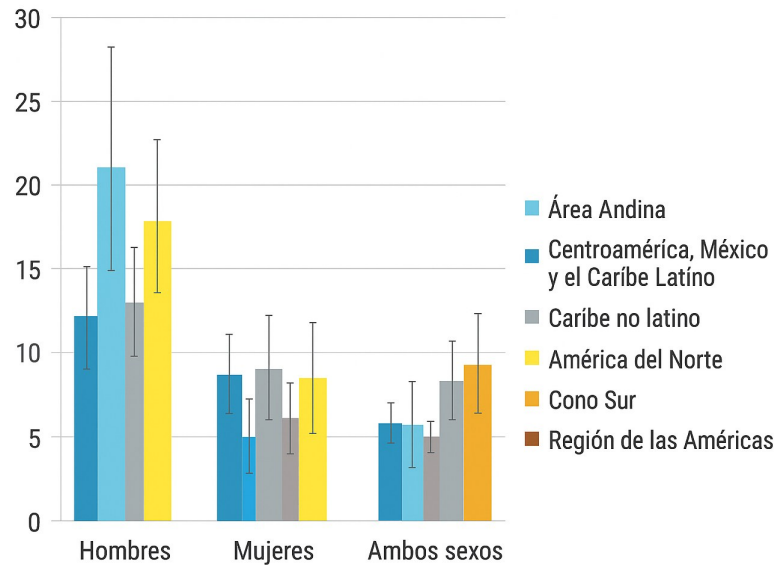


Figura 2. Tasas de mortalidad por suicidio estandarizadas por edad por 100.000 habitantes (IC 95%) en la Región de las Américas y sus subregiones, 2019 (WHO, 2023).

glutamatérgicas del hipocampo (Goode *et al.*, 2020); este análisis determinó que el receptor de serotonina 5-HT_{1A} (5-HT_{1A}R) es una G-proteína receptora ampliamente expresada en el sistema nervioso central (SNC), donde interviene en la modulación de estado anímico.

En el campo de la proteómica tampoco ha sido ajeno al uso de herramientas de aprendizaje de máquina dado que precisamente alrededor de la predicción del comportamiento del 5HT se han realizado estudios que han permitido no solo determinar el proceso de inhibición de la proteína (Kong *et al.*, 2020), sino también el descubrimiento de potenciales nuevos fármacos que ayuden a controlar este proceso de inhibición (Stephenson *et al.*, 2019).

Por todo lo anterior, una de las soluciones propuestas a dicha problemática expone el uso de acoplamiento molecular para construir un análisis computacional descriptivo que facilite la interpretabilidad y comprensión de los datos, que permita encontrar una relación directa entre el tratamiento farmacológico de la ansiedad y/o depresión y los factores contextuales negativos (cortisol) y que nos pueda brindar soluciones a la pregunta: ¿Cómo el modelado molecular de proteínas y su interacción con ligandos específicos (fármacos y hormonas) podrían determinar la asociación entre un trastorno mental específico con un factor contextual negativo y con un componente farmacológico específico aplicado en las dianas moleculares?

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de sitios activos de unión

Las proteínas son macromoléculas que interactúan con otras macromoléculas, y moléculas simples (Rangel-Aldao, 2008), las cuales dependiendo de sus sitios activos de unión pueden inhibir o desarrollar las funciones para las que están destinadas (Stadtman & Levine, 2000). Se seleccionó como diana terapéutica el transportador de serotonina humano (SERT, código UniProt: P31645), específicamente la cadena A de la proteína 5HT, cuya estructura tridimensional fue obtenida del Protein Data Bank (PDB ID: 5I6Z).

Descarga del archivo fasta del PDB

El Protein Data Bank (PDB) (Burley *et al.*, 2019) constituye uno de los repositorios más importantes a nivel mundial para la obtención de estructuras macromoleculares tridimensionales. Entre los formatos disponibles, se incluye el archivo FASTA, el cual contiene la secuencia primaria de aminoácidos de cada proteína depositada en la base de datos. La disponibilidad de estos archivos facilita la identificación, recuperación y procesamiento de secuencias proteicas para análisis posteriores. En el presente estudio, se llevó a cabo la descarga del archivo FASTA correspondiente a la proteína 5HT seleccionada, con el fin de realizar un análisis detallado de sus sitios activos de unión.

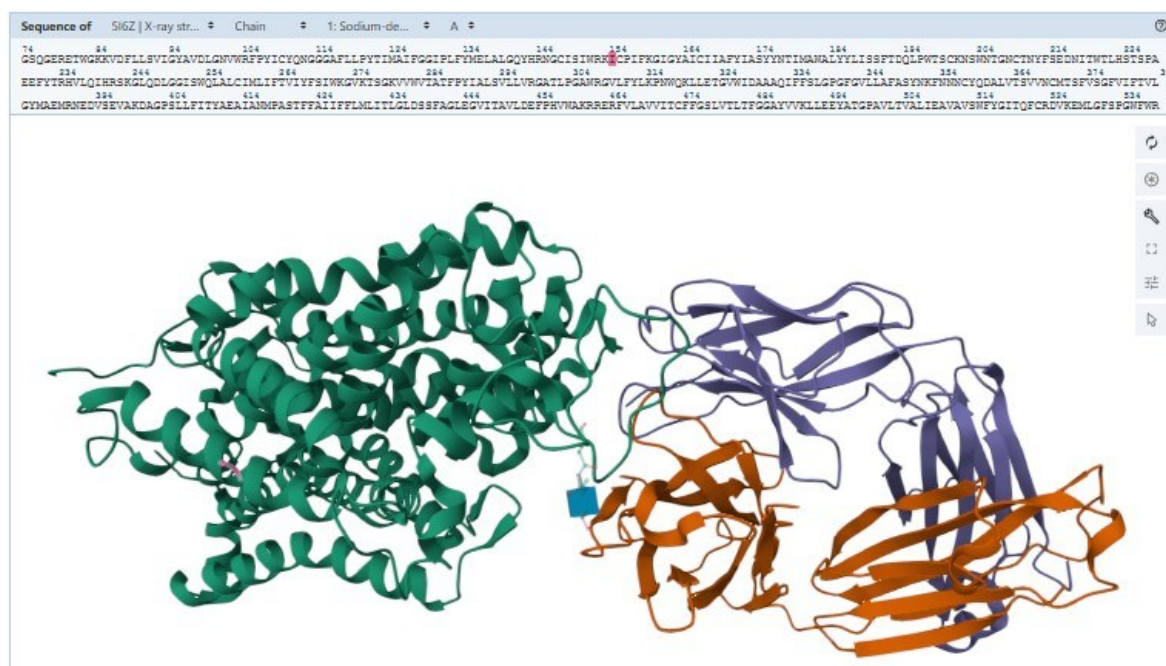


Figura 3. Estructura tridimensional de receptor 5HT. Fuente: PDB (Coleman et al., 2016; Protein Data Bank, n.d.)

Dado que se encontró una diferencia entre el archivo encontrado FASTA en el PDB y en el archivo tridimensional de la proteína de la misma fuente, se procede a realizar un alineamiento de secuencias en Clustal (Clustal, 2023) para determinar si la diferencia era relevante en el proceso de acoplamiento molecular posterior.

Ejecución del alineamiento BLAST

Dadas las características de influencia de los aminoácidos en los sitios de unión posibles de la proteína usamos como referencia la cadena A de la proteína 5HT y realizamos un Blast en UniProt (UniProt, 2023), esta búsqueda nos dará como resultado que sitios de unión de la proteína están identificados por los Nucleótidos respectivos.

Se evaluaron las afinidades de unión (valores de binding affinity en kcal/mol) para cada ligando, considerando como interacción significativa aquellas con valores menores a -7.0 kcal/mol. Las interacciones polares y los residuos involucrados en la unión fueron identificados mediante análisis visual en PyMOL y comparados con la literatura.

Acoplamiento molecular de los ISRS en proteínas SERT(5HT)

Se empleó AutoDock Vina 1.2.0 (Eberhardt et al., 2021) para realizar el acoplamiento molecular entre los ligandos

y la proteína SERT. La preparación de las estructuras (eliminación de agua, adición de hidrógenos, carga de Gasteiger, conversión a formato .pdbqt) se realizó con AutoDock Tools. La visualización y análisis de interacciones moleculares se llevó a cabo con PyMOL (Schrödinger LLC, 2015).

Posteriormente se descargaron los ligandos de estructuras farmacológicas de los ISRS, para eso usamos la base de datos Zinc Docking, referenciados en la tabla 1, que proporcionó la estructura (.mol2) de los fármacos ISRS necesarios para el estudio (Wishart et al., 2006).

Acoplamiento molecular de hormonas liberadas en situación de estrés

Por último, se utilizó de nuevo la base de datos de Zinc Docking (Irwin et al., 2020) para encontrar la estructura (.mol2) de la hormona Cortisol, eje central de nuestra hipótesis y se realizó un acoplamiento molecular con la proteína 5HT desvelando su influencia en los sitios de unión de la proteína.

Todos los archivos .pdbqt, logs y resultados de docking fueron depositados en el repositorio público: <https://github.com/willykaos/proteinsAndLigands.git>

Tabla 1. Composición y enlaces de los fármacos ISRS. Fuente: Zinc Docking (Irwin et al., 2020)

Fármaco	Composición	Descarga
Fluoxetina	Clorhidrato de fluoxetina	https://zinc.docking.org/substances/ZINC000001530637/
Paroxetina	Clorhidrato de paroxetina	https://zinc.docking.org/substances/ZINC000000527386/
Sertralina	Clorhidrato de sertralina	https://zinc.docking.org/substances/ZINC000001853550/
Citalopram	Clorhidrato de citalopram	https://zinc.docking.org/substances/ZINC000003800706/
Venlafaxina	Clorhidrato de venlafaxina	https://zinc.docking.org/substances/ZINC000000006016/

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Acoplamiento molecular de los ISRS en la proteína 5HT

Los resultados obtenidos mediante AutoDock Vina mostraron afinidades de unión consistentes con lo reportado en la literatura, con valores de binding affinity por debajo de -7.0 kcal/mol en todos los ISRS evaluados. La paroxetina presentó la mayor afinidad (-10.1 kcal/mol), seguida de la fluoxetina (-8.9 kcal/mol) y el citalopram (-9.0 kcal/mol), lo cual respalda su uso clínico como fármacos efectivos en el tratamiento de trastornos depresivo(Agarwal et al., 2023; Chocrón Bentata, 2011).

El análisis de interacciones mostró que los residuos polares más frecuentemente involucrados fueron **Ala96**, **Asp98**, **Ser438** y **Thr439**, los cuales coinciden con sitios reportados previamente como claves para la inhibición de la recaptación de serotonina. Dadas las características de influencia de los aminoácidos en los sitios de unión posibles de la proteína se usó como referencia la cadena A de la proteína 5HT y se realizó un Blast en UniProt (UniProt, 2023), esta búsqueda dio como resul-

tado que los sitios de unión de la proteína están identificados por los aminoácidos: **94(G)**, **96(A)**, **97(V)**, **98(D)**, **101(N)**, **336(S)**, **368(N)**, **434(L)**, **437(D)**, **438(S)**, **439(T)**, **494(E)**, **495(Y)**, **556(F)** y **559(S)** (Yang & Gouaux, 2021). Esto sugiere que los ISRS evaluados se unen de forma efectiva a los dominios catalíticos de SERT, bloqueando la función de recaptura.

La figura 4 muestra en color rojo la ubicación de los aminoácidos que son usados como dianas moleculares de los ISRS y en color verde el resto de los aminoácidos que componen la proteína 5HT. En la ubicación de los aminoácidos, se encontró que existe una diferencia dada por la secuencia de referencia encontrada en el PDB, específicamente en el Nucleótido 439(T) una Tiamina ya que en la proteína del PDB está representado por una (S) Serina.

Posteriormente se realizó una alineación de secuencias múltiple para comparar la referencia con la encontrada en el PDB, para esto se usó la herramienta Clustal (Clustal, 2023) para detectar dicha diferencia:

For Educational Use Only

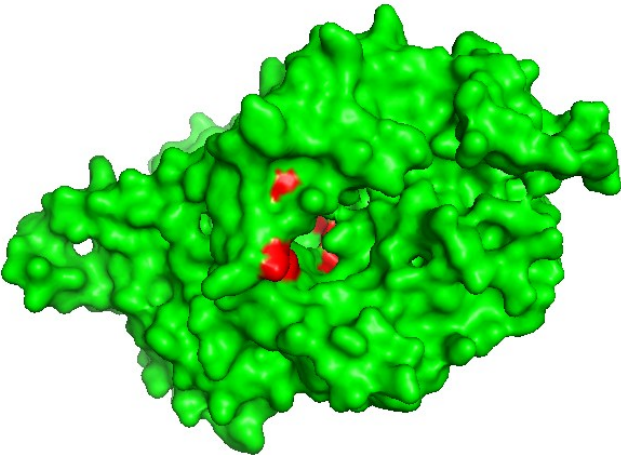


Figura 4. Sitios activos de unión de la Cadena A de la proteína 5HT

Tabla 2. Alineamiento de secuencias FASTA del 5HT. Fuente Clustal (Clustal, 2023).

Fasta	Nombre	Secuencia	Indicador
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	METTPLNSQKQLSACEDGEDCQENGVLQKVVPPTPGDKVESGQISNGYSAVPSPGAGDDTR	60
5I6Z	5I6Z_1 Chain	-----	0
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	HSIPATTTTLVAELHQGERETWGKKVDFLLSVIGYAVDLGNVWRFYPICYQNGGGAFLLP	120
5I6Z	5I6Z_1 Chain	-----GSQGERETWGKKVDFLLSVIGYAVDLGNVWRFYPICYQNGGGAFLLP	47
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	YTIMAIFGGIPLFYMELALGQYHRNGCISIWKRKICPIFKGIGYAICIAFYIASYNTIM	180
5I6Z	5I6Z_1 Chain	YTIMAIFGGIPLFYMELALGQYHRNGCISIWKRKICPIFKGIGYAICIAFYIASYNTIM	107
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	AWALYYLISSFTDQLPWTSCCKNSWNTGNCTNYFSEDNITWTLHSTSPAEFYTFRHVLQIH	240
5I6Z	5I6Z_1 Chain	AWALYYLISSFTDQLPWTSCCKNSWNTGNCTNYFSEDNITWTLHSTSPAEFYTFRHVLQIH	167
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	RSKGLQDLGGISWQLALCIMLIFTVIYFSIWKGVKTSQKVVVVTATFPYIILSVLLVRGA	300
5I6Z	5I6Z_1 Chain	RSKGLQDLGGISWQLALCIMLIFTVIYFSIWKGVKTSQKVVVVTATFPYIILSVLLVRGA	227
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	TLPGAWRGVLFYLPKNWQKLEETGVWIDAAAQIFFSLGPGFGVLLAFASYNKFNNNCYQD	360
5I6Z	5I6Z_1 Chain	TLPGAWRGVLFYLPKNWQKLEETGVWIDAAAQIFFSLGPGFGVLLAFASYNKFNNNCYQD	287
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	ALVTSVNCMTSFVSGVFITVLGYMAEMRNEDEVSEVAKDAGPSLLFITYAEAIANMPAS	420
5I6Z	5I6Z_1 Chain	ALVTSVNCMTSFVSGVFITVLGYMAEMRNEDEVSEVAKDAGPSLLFITYAEAIANMPAS	347
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	TFFAIIFLMLITLGLDSTFAGLEGVITAVLDEFPHVWAKRRERFVLAVVITCFFGSLVT	480
5I6Z	5I6Z_1 Chain	TFFAIIFLMLITLGLDSTFAGLEGVITAVLDEFPHVWAKRRERFVLAVVITCFFGSLVT	407
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	LTFGGAYVVKLLEEYATGPAVLTVLIEAVAVSWFYGITQFCRDVKEMLGFSPGWFWRIC	540
5I6Z	5I6Z_1 Chain	LTFGGAYVVKLLEEYATGPAVLTVLIEAVAVSWFYGITQFCRDVKEMLGFSPGWFWRIC	467
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	WVAISPLFLLFIICFLMSPPQLRFLFYQNYPYWSIILGYCIGTSSFCIPTYIAYRLIIT	600
5I6Z	5I6Z_1 Chain	WVAISPLFLLFIICFLMSPPQLRFLFYQNYPYWSIILGYAIGTSSFCIPTYIAYRLIIT	527
Referencia	sp P31645 SC6A4_HUMAN	PGTFKERIISITPETPTEIPCGDIRLNAV	630
5I6Z	5I6Z_1 Chain	PGTFKERIISITPETPTLVPR-----	549

El acoplamiento molecular realizado con citalopram ilustrado en la tabla 3, mostro una gran afinidad hacia los sitios de unión de la proteína 5HT, mostrando una afinidad de unión de 9.0 Kd c (Gu *et al.*, 2023; Kastritis & Bonvin, 2013) en su más alto acoplamiento.

El scitalopram ha sido ampliamente estudiado en pacientes con desorden de ansiedad y depresión siendo uno de los fármacos más usados en la actualidad gracias a sus efectos potenciales en la mejora de estos pacientes (Agarwal *et al.*, 2023) siendo inclusive usado para otros tratamientos asociados a estos trastornos y comparados con otros medicamentos (Straley *et al.*, 2022).

Como se puede observar en la figura 6, el acoplamiento con más afinidad de unión también demuestra que los sitios de unión se ven influenciados por las cadenas polares (Kumar *et al.*, 2015) encontradas en el ligando.

Podemos observar que la Serina 438 y 439, y el Glutamato 493 son los contactos polares que interactúan con el Citalopram, confirmando así que los encontrados en la Literatura efectivamente tienen incidencia en el proceso de inhibición de la recaptación de serotonina (Yang & Gouaux, 2021).

En el caso de la fluoxetina el resultado sigue siendo optimo encontrando que la interacción con los sitios de unión refleja una afinidad de unión de 8.9 Kd dejándonos como resultado la tabla 4.

La fluoxetina a través de varios estudios de revisión ha sido catalogada como el mejor fármaco recomendado para el tratamiento de trastornos asociados a la depresión y/o ansiedad (Chocrón Bentata, 2011).

Tabla 3. Afinidad de unión Citalopram, Fuente Autodock Vina (Eberhardt et al., 2021).

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
ChainA_citalopram	-9.0	0.0	0.0
ChainA_citalopram	-8.5	5.597	2.42
ChainA_citalopram	-8.5	5.318	2.748
ChainA_citalopram	-8.3	3.302	2.885
ChainA_citalopram	-8.2	5.483	3.451
ChainA_citalopram	-8.1	5.233	3.554
ChainA_citalopram	-7.9	6.872	4.652
ChainA_citalopram	-7.8	6.631	4.063
ChainA_citalopram	-7.7	7.517	5.142

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  METTPLNSQKQLSACEDGEDCQENGVLQKVPTPGDKVESGQISNGYSAVPSGAGDDTR  60
5I6Z_1|Chain          ----- 0

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  HSIPATTTTLVAELHQGERETWGKKVDFLLSVIGYAVDLGNVWRFYPYICYQNGGGAFLLP 120
5I6Z_1|Chain          -----GSQGERETWGKKVDFLLSVIGYAVDLGNVWRFYPYICYQNGGGAFLLP 47
                        *****

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  YTIMAIFGGIPLFYMELALGQYHRNGCISIWKICIPFKGIGYAICIIAFYIASYYNTIM 180
5I6Z_1|Chain          YTIMAIFGGIPLFYMELALGQYHRNGCISIWKICIPFKGIGYAICIIAFYIASYYNTIM 107
                        *****

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  AWALYYLISSFTDQLPWTSCKNWNTGNCTNYFSEDNITWTLHSTSPAEEFYTRHVLQIH 240
5I6Z_1|Chain          AWALYYLISSFTDQLPWTSCKNWNTGNCTNYFSEDNITWTLHSTSPAEEFYTRHVLQIH 167
                        *****

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  RSKGLQDLGGISWQLALCIMLIFTVIYFSIWKGVKTSGBKVWVMTATFPYIILSVLLVRGA 300
5I6Z_1|Chain          RSKGLQDLGGISWQLALCIMLIFTVIYFSIWKGVKTSGBKVWVMTATFPYIILSVLLVRGA 227
                        *****

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  TLPGAWRGVLFYLPKNQKLLLETGVNIDAAAQIFFSLGPGFGVLLAFASYNKFNNNCYQD 360
5I6Z_1|Chain          TLPGAWRGVLFYLPKNQKLLLETGVNIDAAAQIFFSLGPGFGVLLAFASYNKFNNNCYQD 287
                        *****

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  ALVTSVNCMTSFVSGFVIFTVLGYMAEMRNEDVSEAKDAGPSLLFITYAEAIANMPAS 420
5I6Z_1|Chain          ALVTSVNCMTSFVSGFVIFTVLGYMAEMRNEDVSEAKDAGPSLLFITYAEAIANMPAS 347
                        *****

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  TFFAIIFFLMLITLGLDSTAGLEGVITAVLDEFPHVWAKRRERFVLAVVITCFFGSLVT 480
5I6Z_1|Chain          TFFAIIFFLMLITLGLDSTAGLEGVITAVLDEFPHVWAKRRERFVLAVVITCFFGSLVT 407
                        *****

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  LTFGGAYVVKLLEEYATGPAVLTVLIEAVAVSWFYGITQFCRDVKEMLGFSFGWFWRIC 540
5I6Z_1|Chain          LTFGGAYVVKLLEEYATGPAVLTVLIEAVAVSWFYGITQFCRDVKEMLGFSFGWFWRIC 467
                        *****

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  WVAISPLFLFFIICSFLMSPQLRLFQYNYPYWSIILGYCIGTSSFCIPTYIAYRLIIT 600
5I6Z_1|Chain          WVAISPLFLFFIASFLLMSPQLRLFQYNYPYWSIILGYAIGTSSFCIPTYIAYRLIIT 527
                        *****

sp|P31645|SC6A4_HUMAN  PGTFKERIIKSITPETPTPCGDIRLNAV 630
5I6Z_1|Chain          PGTFKERIIKSITPETPTLVPR----- 549
                        *****

```

Figura 5. Alineamiento de Secuencias del 5HT, Visión Simple, Fuente Clustal (Clustal, 2023).

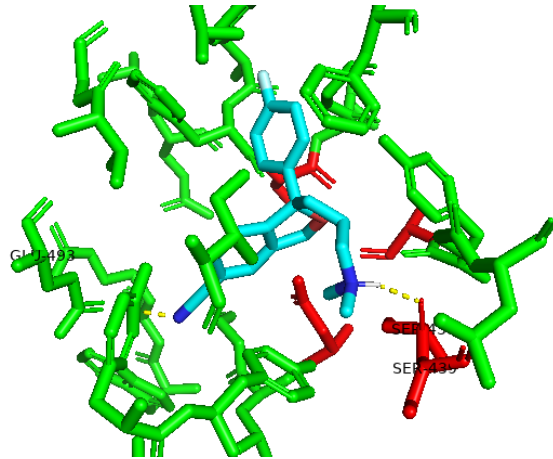


Figura 6. Sitios de unión Citalopram con el mayor Kd (Verde: Proteína, Azul: Ligando, Rojo: Sitios de unión), Fuente Autodock Vina (Eberhardt et al., 2021).

Tabla 4. Afinidad de unión Fluoxetina, Fuente Autodock Vina (Eberhardt et al., 2021)

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
ChainA_Fluoxetine	-8.9	0.0	0.0
ChainA_Fluoxetine	-8.5	2.167	1.471
ChainA_Fluoxetine	-7.8	7.378	4.977
ChainA_Fluoxetine	-7.8	8.639	7.528
ChainA_Fluoxetine	-7.5	5.605	4.293
ChainA_Fluoxetine	-7.5	6.776	4.677
ChainA_Fluoxetine	-7.3	15.88	13.207
ChainA_Fluoxetine	-7.2	5.745	4.461
ChainA_Fluoxetine	-7.0	15.403	12.155

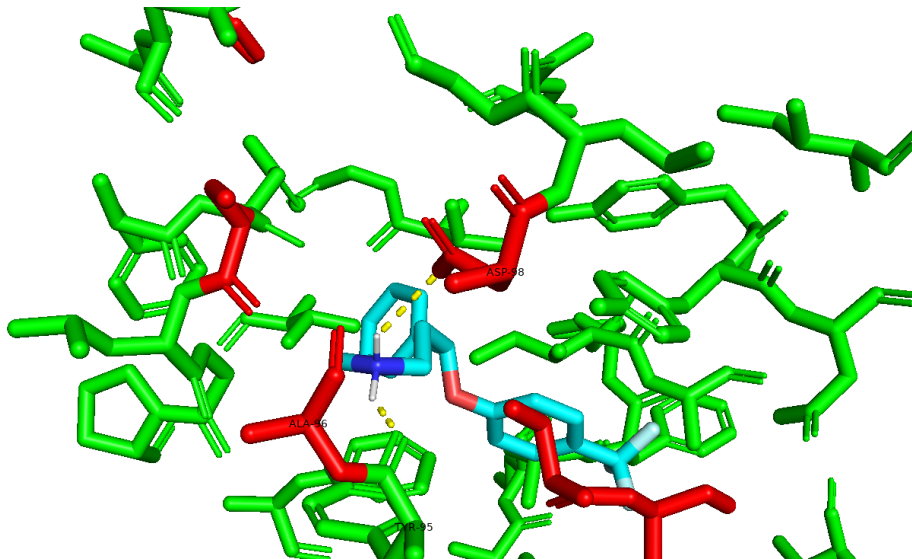


Figura 7. Sitios de unión Fluoxetina con el mayor Kd (Verde: Proteína, Azul: Ligando, Rojo: Sitios de unión), Fuente Autodock Vina (Eberhardt et al., 2021)

Tabla 5. Afinidad de unión Paroxetina, Fuente Autodock Vina (Eberhardt et al., 2021)

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
ChainA_paroxetine	-10.1	0.0	0.0
ChainA_paroxetine	-9.4	6.026	3.38
ChainA_paroxetine	-9.3	6.41	3.456
ChainA_paroxetine	-9.0	6.126	3.523
ChainA_paroxetine	-8.8	6.9	3.623
ChainA_paroxetine	-8.6	7.468	4.576
ChainA_paroxetine	-8.3	7.908	5.353
ChainA_paroxetine	-7.8	9.486	7.225
ChainA_paroxetine	-7.7	15.615	12.338

For Educational Use Only

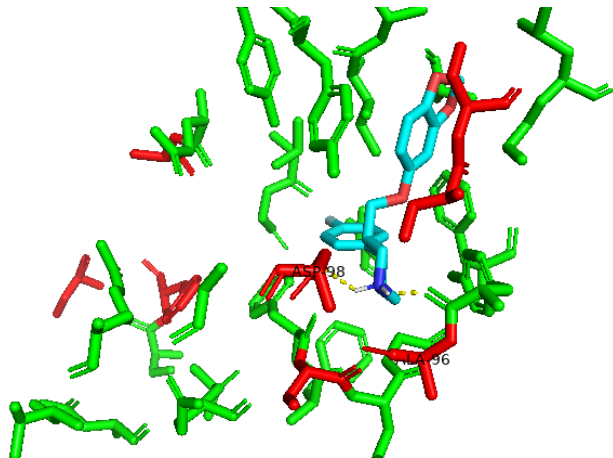


Figura 8. Sitios de unión Paroxetina con el mayor Kd (Verde: Proteína, Azul: Ligando, Rojo: Sitios de unión), Fuente Autodock Vina (Eberhardt et al., 2021)

For Educational Use Only

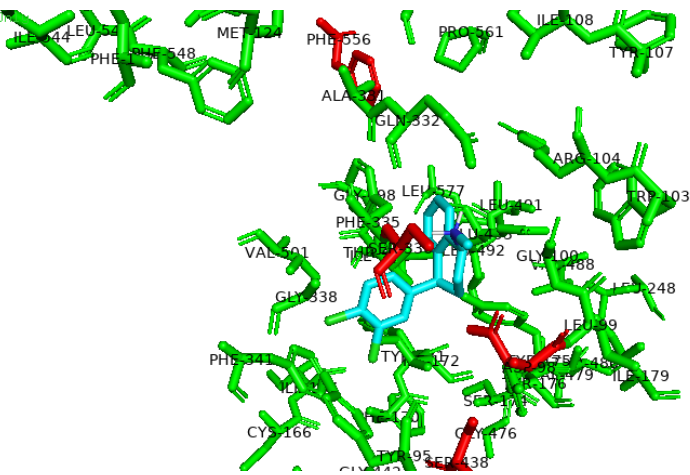


Figura 9. Sitios de unión Setralina con el mayor Kd (Verde: Proteína, Azul: Ligando Rojo: Sitios de unión), Fuente Autodock Vina (Eberhardt et al., 2021)

Podemos también observar en la figura 7 que la Alanina 96 y el ácido aspártico 98 son los contactos polares que interactúan con la fluoxetina, confirmando así que los encontrados en la Literatura efectivamente tienen incidencia en el proceso de inhibición de la recaptación de serotonina (Yang & Gouaux, 2021).

La paroxetina se comporta igual que los demás ISRS, encontrando que tiene en su máxima expresión de cálculo de energía libre 10.1 Kd correspondientes a la tabla 5.

Este resultado se explica gracias a que el ISRS paroxetina inhibe los canales Kv1.3 de una manera que depende de la concentración, el voltaje y la frecuencia (Hwang *et al.*, 2021).

En esta se pudo observar que, como lo muestra la figura 8, también tiene contacto polar con la Alanina 96 y el ácido aspártico 98.

La sertralina, a pesar de que se encuentra en el sitio de acción catalítico de la proteína, no refleja que tenga contacto polar con ninguno de los aminoácidos encontrados en la literatura, sin embargo, la tabla 6 refleja que de cálculo de energía libre es considerable siendo el más alto 8.5Kd.

La falta de contacto polar se puede explicar de varias maneras, una es el BBB (blood-brain barrier) (Xiao *et al.*, 2023) o inclusive a su fácil degradación dentro del cuerpo humano (Zhou *et al.*, 2023).

El resultado de la interacción lo podemos ver reflejado en la figura 9.

Por último, la venlafaxina muestra un comportamiento parecido a todos los elementos demostrados anteriormente, a pesar de que el cálculo de energía libre más alto (7.6Kd) mostrado en la tabla 7 es un poco más bajo que los ISRS estudiados, igual se puede encontrar que realiza su influencia en sitio catalítico de la proteína.

La venlafaxina en todos los escenarios mostro una afinidad cercana a los sitios de unión, por eso su tratamiento generalmente se asocia a trastornos depresivos mayores, dado que su uso tiene varios efectos secundarios asociados a diferentes casos clínicos reportados (Albiñana Pérez *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2023; Rubio Álvaro *et al.*, 2014).

Por el lado de los contactos polares vemos de nuevo en la figura 10 que la serina 438 y 439 vuelve a estar presente lo que nos da una idea de la influencia de este aminoácido en el proceso de inhibición de la serotonina.

El cuadro comparativo de cada uno de los acoplamientos, y sus contactos polares con los encontrados en la literatura se puede observar en la tabla 8.

A pesar de las similitudes estructurales, cada ISRS mostró un patrón de interacción levemente distinto. Paroxetina, fluoxetina y citalopram interactuaron directamente con los residuos previamente descritos en la literatura, mientras que la sertralina, aunque mostró buena afinidad, no estableció contactos polares relevantes, lo cual puede estar asociado a sus propiedades farmacocinéticas, como la facilidad de degradación o el paso por la barrera hematoencefálica (Xiao *et al.*, 2023).

La venlafaxina, por su parte, mostró una afinidad moderada (-7.6 kcal/mol), manteniendo contacto con Ser438

For Educational Use Only

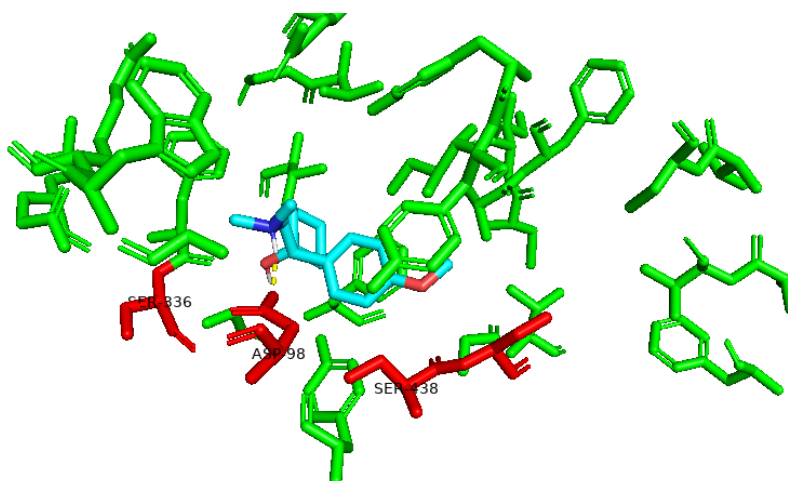


Figura 10. Sitios de unión Venlafaxina con el mayor Kd (Verde: Proteína, Azul: Ligando, Rojo: Sitios de unión), Fuente Auto-dock Vina (Eberhardt *et al.*, 2021)

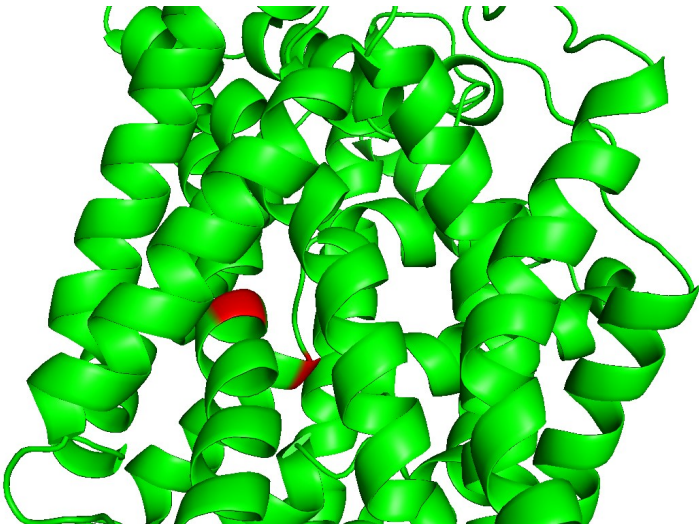


Figura 11. Sitios de unión con el mayor Kd, (Verde: Proteína, Rojo: Sitios de unión) Fuente Autodock Vina (Eberhardt *et al.*, 2021).

Tabla 6. Afinidad de unión Sertralina, Fuente Autodock Vina (Eberhardt *et al.*, 2021)

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
ChainA_Sertraline	-8.5	0.0	0.0
ChainA_Sertraline	-8.5	6.211	4.279
ChainA_Sertraline	-8.5	4.042	2.623
ChainA_Sertraline	-7.7	5.725	3.79
ChainA_Sertraline	-7.5	5.721	4.002
ChainA_Sertraline	-7.2	11.851	10.208
ChainA_Sertraline	-7.2	22.14	20.577
ChainA_Sertraline	-7.1	18.783	17.247
ChainA_Sertraline	-6.9	18.946	16.793

y Thr439, lo que sugiere una eficacia similar, aunque menor en comparación con otros ISRS. Estos hallazgos coinciden con reportes clínicos que recomiendan este fármaco para casos resistentes o específicos (Rodrigues *et al.*, 2023).

Los fármacos ISRS en efecto, tienen una influencia tanto en el sitio catalítico de la proteína 5HT, como en sus sitios de unión, siendo principalmente el sitio central de la proteína donde se inhibe el comportamiento de la serotonina como neurotransmisor (Coleman *et al.*, 2016). La búsqueda realizada y comprobada refleja que el sitio catalítico de la proteína se encuentra entre los sitios de unión 96 (A) y 439(T).

Acoplamiento molecular del Cortisol en la proteína 5HT

El acoplamiento de hormonas ha sido ampliamente estudiado para determinar la utilización de fármacos en dianas moleculares de gran potencial (Abdulghani *et al.*, 2022; Arthur *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2009), El cortisol (Hidrocortisona) también ha sido de gran interés por parte de la comunidad científica, destacando su estudio en desordenes asociados a la depresión y la ansiedad (Levi *et al.*, 2024), teniendo gran influencia en análisis estadístico y de revisiones (Wang *et al.*, 2024). El acoplamiento molecular del cortisol genero la siguiente tabla de cálculo de energía libre que revela la afinidad de unión que se tiene con la proteína 5HT.

Tabla 7. Afinidad de unión Venlafaxina, Fuente Autodock Vina (Eberhardt *et al.*, 2021)

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
ChainA_venlafaxine	-7.6	0.0	0.0
ChainA_venlafaxine	-7.3	4.102	2.44
ChainA_venlafaxine	-7.3	3.236	2.119
ChainA_venlafaxine	-6.8	6.744	3.871
ChainA_venlafaxine	-6.7	5.781	3.004
ChainA_venlafaxine	-6.7	8.108	3.889
ChainA_venlafaxine	-6.6	4.97	2.522
ChainA_venlafaxine	-6.5	8.005	3.462
ChainA_venlafaxine	-6.4	17.001	13.933

For Educational Use Only

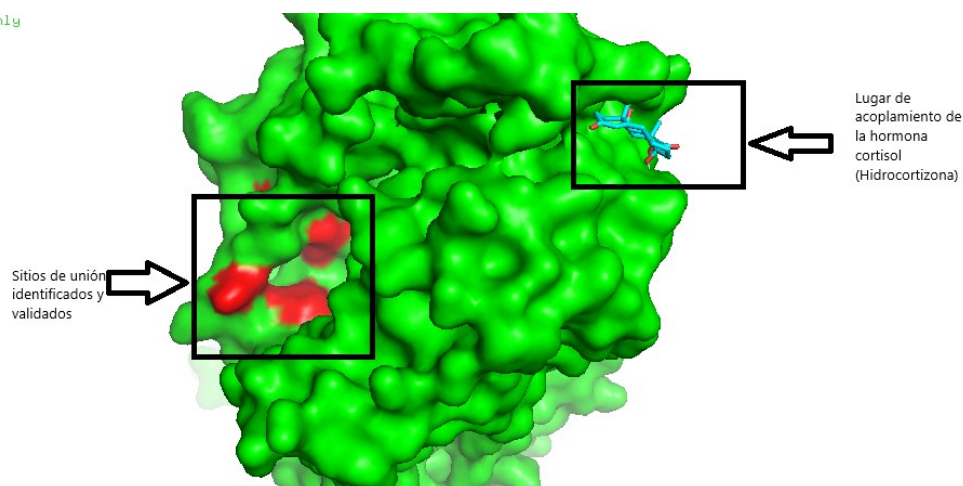


Figura 12. Sitio de unión de la hidrocortisona con el mayor cálculo de energía libre. Fuente Autodock Vina (Eberhardt *et al.*, 2021).

Inicialmente se observa que de las tablas analizadas hasta el momento es el ligando con menos Kd (7.0) que el resto de las moléculas analizadas.

La influencia en los sitios de unión, es decir, los contactos polares que tiene el cortisol con los nucleótidos marcados como sitios de unión de la proteína para lograr el efecto inhibitorio de los fármacos ISRS, es nulo.

Esto indica que la hidrocortisona como respuesta natural del ser humano a situaciones de estrés o ansiedad, no tiene ningún efecto en las dianas moleculares de los fármacos ISRS.

Esto se puede justificar dado que la hidrocortisona y los ISRS operan a través de mecanismos biológicos diferentes (Pasquereau *et al.*, 2021). La hidrocortisona se une a

los receptores de glucocorticoides, influenciando la transcripción de genes relacionados con la respuesta al estrés, mientras que los ISRS específicamente inhiben la recaptación de serotonina en las sinapsis neuronales (Deo & Redpath, 2022). Estudios han demostrado que la hidrocortisona no modula directamente los transportadores de serotonina, los cuales son las dianas moleculares principales de los ISRS (Holsboer, 2000). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la hidrocortisona, a través de su acción en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), puede modular indirectamente la actividad serotoninérgica. El estrés crónico y los niveles elevados de cortisol han sido asociados con alteraciones en los receptores de serotonina y en la expresión de genes relacionados con la serotonina, lo cual podría interferir con la acción de los ISRS (Kiser *et al.*, 2012).

Tabla 8. Afinidad de unión fármacos, Fuente Autodock Vina (Eberhardt *et al.*, 2021)

Fármaco/Sitio de Unión	94 (G)	96 (A)	97 (V)	98 (D)	101 (N)	336 (S)	368 (N)	434 (L)	437 (D)	438 (S)	439 (T)	494 (E)	495 (Y)	556 (F)	559 (S)
Citalopram										X	X				
Fluoxetina		X		X											
Paroxetina		X		X											
Sertralina															
Venlafaxina										X	X				

Tabla 9. Afinidad de unión Hidrocortisona, Fuente Autodock Vina (Eberhardt *et al.*, 2021)

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
ChainA_Hydrocortisone	-7.0	0.0	0.0
ChainA_Hydrocortisone	-6.9	53.121	51.841
ChainA_Hydrocortisone	-6.9	20.707	18.229
ChainA_Hydrocortisone	-6.9	46.738	45.331
ChainA_Hydrocortisone	-6.8	27.259	23.887
ChainA_Hydrocortisone	-6.7	31.625	28.448
ChainA_Hydrocortisone	-6.7	49.505	48.283
ChainA_Hydrocortisone	-6.6	23.316	18.732
ChainA_Hydrocortisone	-6.6	53.683	51.16

La serotonina, al actuar sobre los receptores 5-HT 1A en el hipocampo dorsal, facilita la adaptación al estrés severo e ineludible. Un fallo en este sistema inducido por un estrés severo y/o niveles elevados de corticoides predispondría al desarrollo de déficits conductuales inducidos por el estrés. Este proceso se vería facilitado por el glutamato y el óxido nítrico. Los fármacos que facilitan la neurotransmisión mediada por 5-HT 1A o atenúan la neurotransmisión glutamatérgica/nitrérgica en la formación del hipocampo, por otro lado, promoverían la adaptación al estrés e inducirían efectos similares a los de los antidepresivos (Joca *et al.*, 2007).

Además, este enlace de unión esta solo evaluado como consecuencia de un estrés moderado, lo cual puede ser contrario a estudios *in vitro* donde tiene como muestra el estrés como factor crónico, concluyendo inclusive que: “el cortisol, al mejorar la expresión del transportador de serotonina, podría regular negativamente la disponibilidad de serotonina en la hendidura sináptica” (Tafet *et al.*, 2011).

Por último, algunos estudios clínicos han sugerido que la administración de glucocorticoides puede alterar la respuesta a los ISRS en pacientes con trastornos depresivos. Esto se debe a que el estrés y la activación prolongada del eje HPA pueden llevar a cambios en la sensibilidad de los receptores de serotonina o en la expresión de los transportadores de serotonina, afectando así la eficacia de los ISRS (Anacker *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio confirman que el acoplamiento molecular es una herramienta válida y eficiente para analizar la interacción entre inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) y la proteína transportadora SERT (5HT). Se evidenció que los fármacos evaluados presentan alta afinidad de unión con los sitios activos previamente reportados, especialmente los residuos Ala96, Asp98, Ser438 y Thr439, lo que coincide con su mecanismo de acción descrito en la literatura.

La paroxetina y el citalopram fueron los compuestos con mayor afinidad de unión, mientras que la sertralina, a pesar de tener buena afinidad, no mostró contactos polares relevantes con la proteína, lo cual podría estar relacionado con sus propiedades farmacocinéticas más que con su capacidad inhibitoria directa.

Por otro lado, la evaluación *in silico* del cortisol reveló que no existe interacción directa significativa entre esta hormona y los sitios activos de SERT, lo que descarta su acción directa como modulador competitivo de los ISRS. Sin embargo, se reconoce que el cortisol podría ejercer una influencia indirecta sobre el sistema serotoninérgico a través de mecanismos epigenéticos o del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA), como lo sugieren estudios clínicos y moleculares previos.

En conjunto, este estudio demuestra el potencial del acoplamiento molecular no solo para validar interacciones farmacológicas conocidas, sino también para explorar nuevas hipótesis sobre la modulación epigenética de proteínas diana en trastornos neuropsiquiátricos. Futuros estudios podrían incorporar dinámica molecular, simulaciones de flexibilidad proteica o estudios de expresión génica para complementar estos hallazgos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulghani, M. A. M., Alshehade, S. A., Kamran, S., & Alshawsh, M. A. (2022). Effect of monosodium glutamate on serum sex hormones and uterine histology in female rats along with its molecular docking and *in silico* toxicity. *Heliyon*, 8(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10967>
- Agarwal, C. D., Palka, J. M., Gajewski, A. J., Khan, D. A., & Brown, E. S. (2023). The efficacy of citalopram or escitalopram in patients with asthma and major depressive disorder. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anai.2023.11.004>
- Albiñana Pérez, M. S., Cea Pereira, L., Bilbao Salcedo, J., & Rodríguez Penín, I. (2012). Posible síndrome serotoninérgico relacionado con la administración de venlafaxina y tramadol. In *Farmacia Hospitalaria* (Vol. 36, Issue 6, pp. 548–549). <https://doi.org/10.7399/FH.2012.36.6.49>
- Anacker, C., Zunszain, P. A., Carvalho, L. A., & Pariante, C. M. (2011). The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, 36(3), 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.03.007>
- Arthur, D. E., Soliman, M. E. S., Adeniji, S. E., Adedirin, O., & Peter, F. (2022). QSAR AND MOLECULAR DOCKING STUDY OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE RECEPTOR INHIBITORS. *Scientific African*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01291>
- Avery, S. N., Clauss, J. A., & Blackford, J. U. (2016). The Human BNST: Functional Role in Anxiety and Addiction. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 41, Issue 1, pp. 126–141). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.185>
- Baena, J. A., Valle, D., José, Á., Moreno, R., Jaime Gómez Alegría, C., Esther, D., & Camargo, G. (2013). Comparison of DNA extraction methods from formalin-fixed paraffin sections for RCP amplification. In *Rev. Colomb. Biotecnol* (Issue 1).
- Burley, S. K., Berman, H. M., Bhikadiya, C., Bi, C., Chen, L., Di Costanzo, L., Christie, C., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Ghosh, S., Goodsell, D. S., Green, R. K., Guranovic, V., Guzenko, D., Hudson, B. P., Liang, Y., Lowe, R., Peisach, E., ... Ioannidis, Y. E. (2019). Protein Data Bank: The single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D520–D528. <https://doi.org/10.1093/nar/gky949>
- Chocrón Bentata, L. (2011). Fluoxetine is the most effective medical treatment and sertraline is the best tolerated in patients with generalized anxiety disorder. *FMC Formación Médica Continuada En Atención Primaria*, 18(7), 460. [https://doi.org/10.1016/S1134-2072\(11\)70180-3](https://doi.org/10.1016/S1134-2072(11)70180-3)
- Clustal. (2023). *Clustal Omega*. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/Msa/Clustalo/>
- Coleman, J. A., Green, E. M., & Gouaux, E. (2016). X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature*, 532(7599), 334–339. <https://doi.org/10.1038/nature17629>
- Deo, N., & Redpath, G. (2022). Serotonin Receptor and Transporter Endocytosis Is an Important Factor in the Cellular Basis of Depression and Anxiety. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.804592>
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
- Evans-Lacko, S., Aguilar-Gaxiola, S., Al-Hamzawi, A., Alonso, J., Benjet, C., Bruffaerts, R., Chiu, W. T., Florescu, S., De Girolamo, G., Gureje, O., Haro, J. M., He, Y., Hu, C., Karam, E. G., Kawakami, N., Lee, S., Lund, C., Kovess-Masfety, V., Levinson, D., ... Wojtyniak, B. (2018). Socio-economic variations in the mental health treatment gap for people with anxiety, mood, and substance use disorders: Results from the WHO World Mental Health (WMH) sur-

- veys. *Psychological Medicine*, 48(9), 1560–1571. <https://doi.org/10.1017/S0033291717003336>
- Goode, T. D., Tanaka, K. Z., Sahay, A., & McHugh, T. J. (2020). An Integrated Index: Engrams, Place Cells, and Hippocampal Memory. In *Neuron* (Vol. 107, Issue 5, pp. 805–820). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.011>
- Gu, Y., Zhang, X., Xu, A., Chen, W., Liu, K., Wu, L., Mo, S., Hu, Y., Liu, M., & Luo, Q. (2023). Protein–ligand binding affinity prediction with edge awareness and supervised attention. *IScience*, 26(1). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105892>
- Hayase, T. (2016). Putative epigenetic involvement of the endocannabinoid system in anxiety- and depression-related behaviors caused by nicotine as a stressor. *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158950>
- Holsboer, F. (2000). The Corticosteroid Receptor Hypothesis of Depression. *Neuropsychopharmacology*, 23(5), 477–501. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00159-7)
- Hwang, S., Kim, J. H., & Jo, S. H. (2021). Inhibitory effect of the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine on human Kv1.3 channels. *European Journal of Pharmacology*, 912. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174567>
- Irwin, J. J., Tang, K. G., Young, J., Dandarchuluun, C., Wong, B. R., Khurelbaatar, M., Moroz, Y. S., Mayfield, J., & Sayle, R. A. (2020). ZINC20—A Free Ultralarge-Scale Chemical Database for Ligand Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(12), 6065–6073. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00675>
- Joca, S. R. L., Ferreira, F. R., & Guimarães, F. S. (2007). Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitroergic neurotransmitter systems. In *Stress* (Vol. 10, Issue 3, pp. 227–249). <https://doi.org/10.1080/10253890701223130>
- Kastritis, P. L., & Bonvin, A. M. J. J. (2013). On the binding affinity of macromolecular interactions: Daring to ask why proteins interact. In *Journal of the Royal Society Interface* (Vol. 10, Issue 79). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0835>
- Kiser, D., Steimer, B., Branchi, I., & Homberg, J. R. (2012). The reciprocal interaction between serotonin and social behaviour. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(2), 786–798. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.009>
- Kong, W., Wang, W., & An, J. (2020). Prediction of 5-hydroxytryptamine transporter inhibitors based on machine learning. *Computational Biology and Chemistry*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107303>
- Koob, G. F., Buck, C. L., Cohen, A., Edwards, S., Park, P. E., Schlosburg, J. E., Schmeichel, B., Vendruscolo, L. F., Wade, C. L., Whitfield, T. W., & George, O. (2014). Addiction as a stress surfeit disorder. In *Neuropharmacology* (Vol. 76, Issue PART B, pp. 370–382). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.024>
- Kumar, S., Jena, L., Sahoo, M., Kakde, M., Daf, S., & Varma, A. K. (2015). In Silico Docking to Explicate Interface between Plant-Originated Inhibitors and E6 Oncogenic Protein of Highly Threatening Human Papillomavirus 18. *Genomics & Informatics*, 13(2), 60. <https://doi.org/10.5808/gi.2015.13.2.60>
- Levi, E., Peysachov, G., Admon, R., & Zilcha-Mano, S. (2024). Cortisol interdependence during psychotherapy in major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 163, 106983. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2024.106983>
- Malyshev, A. V., Sukhanova, I. A., Ushakova, V. M., Zorkina, Y. A., Abramova, O. V., Morozova, A. Y., Zubkov, E. A., Mitkin, N. A., Pavshintsev, V. V., Doronin, I. I., Gedzun, V. R., Babkin, G. A., Sanchez, S. A., Baker, M. D., & Haile, C. N. (2022). Peptide LCGA-17 Attenuates Behavioral and Neurochemical Deficits in Rodent Models of PTSD and Depression. *Pharmaceuticals*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/ph15040462>
- Ministro Salud Y Protección Social, E. DE. (n.d.). *Política Nacional de Salud Mental Ministerio de Salud y Protección Social-Resolución 4886 de 2018 2 Por la cual se adopta la Política Nacional de Salud Mental*.
- Pasquereau, B., Drui, G., Saga, Y., Richard, A., Millot, M., Météreau, E., Sgambato, V., Tobler, P. N., & Tremblay, L. (2021). Selective serotonin reuptake inhibitor treatment retunes emotional valence in primate ventral striatum. *Neuropsychopharmacology*, 46(12), 2073–2082. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-00991-x>
- Protein Data Bank. (n.d.). *X-ray structure of the ts2 human serotonin transporter*. <https://www.rcsb.org/3d-View/5I6Z>.
- Rangel-Aldao, R. (2008). De las redes de información celular a la medicina molecular digital From cellular information networks to digital molecular medicine. In *Rev. Colomb. Biotecnol* (Issue 1).
- Rodrigues, P., Guimarães, L., Carvalho, A. P., & Oliveira-Teles, L. (2023). Carbamazepine, venlafaxine, tramadol, and their main metabolites: Toxicological effects on zebrafish embryos and larvae. *Journal of Hazardous Materials*, 448. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130909>
- Roth, T. L. (2013). Epigenetic mechanisms in the development of behavior: Advances, challenges, and future promises of a new field. *Development and Psycho-*

- pathology, 25(4 PART 2), 1279–1291. <https://doi.org/10.1017/S0954579413000618>
- Rubio Álvaro, N., Tejedor Prado, P., Hidalgo Correias, F. J. osé, & García Diaz, B. (2014). Serious QT interval prolongation associated with velafaxine administration. In *Farmacia hospitalaria : órgano oficial de expresión científica de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria* (Vol. 38, Issue 5, pp. 445–446). <https://doi.org/10.7399/fh.2014.38.5.7537>
- Schrödinger LLC. (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version~1.8*.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 191–208. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>
- Stephenson, N., Shane, E., Chase, J., Rowland, J., Ries, D., Justice, N., Zhang, J., Chan, L., & Cao, R. (2019). Survey of Machine Learning Techniques in Drug Discovery. *Current Drug Metabolism*, 20(3), 185–193. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180820112457>
- Straley, C. M., Sochacki, M., Reed, E., Carr, C. N., & Baugh, T. B. (2022). Comparison of the effect of citalopram, bupropion, sertraline, and tricyclic antidepressants on QTc: A cross-sectional study. *Journal of Affective Disorders*, 296, 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.08.149>
- TAFET, G., TOISTER-ACHITUV, M., & SHINITZKY, M. (2011). Enhancement of serotonin uptake by cortisol a possible link between stress and depression. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*.
- UniProt. (2023). *UniProt*. <https://www.uniprot.org>.
- Wang, R., Kogler, L., & Derntl, B. (2024). Sex differences in cortisol levels in depression: A systematic review and meta-analysis. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 72). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2023.101118>
- WHO. (2020). *Mental health atlas*.
- WHO. (2023). *MENTAL HEALTH ATLAS OF THE AMERICAS*.
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Chang, Z., & Woolsey, J. (2006). DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkj067>
- Wu, B., Zhang, Y., Kong, J., Zhang, X., & Cheng, S. (2009). In silico predication of nuclear hormone receptors for organic pollutants by homology modeling and molecular docking. *Toxicology Letters*, 191(1), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.08.005>
- Xiao, Y., Xu, W., Niu, D., Quan, Z., & Wang, L. (2023). Investigation into the Impact of Proton Pump Inhibitors on Sertraline Transport across the Blood-Brain Barrier. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106653. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106653>
- Yang, D., & Gouaux, E. (2021). *Illumination of serotonin transporter mechanism and role of the allosteric site* (Vol. 7).
- Zhou, Z., Wu, D., Wu, H., Fu, B., Wang, X., Ling, J., Jin, X., & Gu, C. (2023). Effect of common low-molecular-weight organic acid on the photodegradation of sertraline by ferrihydrite. *Chemosphere*, 341. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139926>