



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**Bioprospección de plantas amazónicas con alto contenido de flavonoides
como indicador del potencial para la síntesis verde de nZVI**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: MISHALLE NATHALY CULCAY GARCÍA

TUTORA: PhD. YANET VILLASANA

COTUTORA: PhD. CRISTINA QUIROGA

Napo – Ecuador

2024

Carrera de Biotecnología

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 15 de agosto de 2024

Yo, Mishelle Nathaly Culcay García, con documento de identidad Nro. 1500894694, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en el presente documento, son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,



Mishelle Nathaly Culcay García

CI: 1500894694

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Tena, 15 de agosto de 2024

Yo, Mishelle Nathaly Culcay García, con documento de identidad 1500894694 en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Bioprospección de plantas amazónicas con alto contenido de flavonoides como indicador del potencial para la síntesis verde de nZVI”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Atentamente,



Mishelle Nathaly Culcay García

CI: 1500894694

Carrera de Biotecnología

Certificado de dirección de trabajo de titulación

Tena, 15 de agosto de 2024

Certifico que el trabajo de titulación: Bioprospección de plantas amazónicas con alto contenido de flavonoides como indicador del potencial para la síntesis verde de nZVI”, en la modalidad de artículo, fue realizado por Mishelle Nathaly Culcay García, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.



firmado electrónicamente por:
YANET TIBAIRE
VILLASANA AGUILERA

Yanet Villasana Aguilera

C.I: 1757250046

Tutora



firmado electrónicamente por:
CRISTINA ALEXANDRA
QUIROGA LOZANO

Cristina Quiroga Lozano

C.I: 1721055109

Cotutora

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi querido padre, cuyo apoyo incondicional ha sido la fuerza impulsora detrás de cada logro en este viaje académico. Su paciencia infinita, su amor inquebrantable y su capacidad para soportar mis altibajos han sido el cimiento sobre el cual he podido crecer académicamente. Agradezco sinceramente todo lo que has hecho por mí, papá; este logro no habría sido posible sin ti a mi lado.

Además, quiero agradecer a mi tutora Yanet, por ser una guía excepcional en lo académico, y una compañera constante en cada desafío a lo largo de este camino. Su paciencia y dedicación me hizo posible llegar hasta aquí. A mi cotutora Cristina, agradezco de corazón por su apoyo incondicional y su disposición para ofrecerme ayuda en cada etapa de este proyecto. Sin su mano amiga, este trabajo no habría sido posible, su guía y consejos han sido invaluable. A ambas, quiero expresar mi admiración tanto por su destacada labor profesional como por la calidad humana que demuestran. Gracias por su apoyo y por ser modelos a seguir.

No quiero pasar por alto expresar mi profundo agradecimiento a mi madre, quien ha estado siempre pendiente de mí, brindándome un apoyo incondicional que ha sido mi fuente de fortaleza. También quiero reconocer los esfuerzos significativos de mi familia, cuyo respaldo ha sido fundamental en cada paso de este viaje académico. Agradezco sinceramente a los docentes que me han compartido su conocimiento y han contribuido al desarrollo de mis habilidades.

Además, quiero extender mi gratitud a esos amigos y compañeros que han sido mi red de apoyo en los momentos difíciles. Gracias a cada uno de ustedes, he podido crecer académicamente y como persona. Su presencia ha sido un regalo invaluable, y estoy agradecida por compartir este camino con personas tan extraordinarias.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a la persona que, pase lo que pase, ha estado incondicionalmente a mi lado, brindándome todo su amor y apoyo. Esta tesis es para ti, querida tía Fanny. Con todo mi corazón, te dedico este trabajo que refleja no solo mi esfuerzo, sino también el fruto de la inspiración y fortaleza que me has proporcionado a lo largo de este camino académico. Tu constante presencia ha sido mi mayor regalo, y esta tesis lleva consigo el agradecimiento profundo y el amor que siento por ti.

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad.....	ii
Autorización de publicación en el repositorio institucional.....	iii
Certificado de dirección de trabajo de titulación.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
TABLA DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
MÉTODOS.....	8
Obtención de las secuencias que participan en la biosíntesis de flavonoides en <i>A. thaliana</i>	8
Búsqueda de proteínas ortólogas en la base de datos de NCBI	8
Procesamiento de resultados mediante la base de datos de especies vegetales amazónicas.....	9
Identificación de enzimas que participan en la biosíntesis de flavonoides en las especies vegetales amazónicas encontradas.....	9
Selección de las proteínas clave para la predicción de estructura	10
<i>Identificación de los tipos de flavonoides en las especies vegetales amazónicas encontradas</i>	10
<i>Determinación de enzimas clave para la síntesis de los metabolitos seleccionados</i>	10
<i>Selección de las proteínas para realizar predicción de estructura</i>	11

Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas de interés para la inferencia de su función.....	11
Construcción de modelos tridimensional	12
Evaluación de similitud estructural	12
Función prevista de las proteínas	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
Secuencias involucradas en la biosíntesis de flavonoides en <i>A. thaliana</i>	14
Proteínas ortólogas presentes en las especies vegetales amazónicas	19
Enzimas que participan en la biosíntesis de flavonoides en las especies vegetales encontradas	21
Desarrollo de proteínas estructurales mediante modelado 3D	32
Tipos de flavonoides en las especies vegetales amazónicas encontradas	32
Enzimas clave para la síntesis de los metabolitos seleccionados	34
Proteínas de las especies vegetales amazónicas seleccionadas para la predicción de estructuras	35
Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas de interés para la inferencia de su función.....	36
Construcción de modelos tridimensional	37
<i>Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [Manihot esculenta]</i>	37
<i>Dihydroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [Theobroma cacao]</i>	39
<i>Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [Abrus precatorius]</i>	41
<i>Proteína de la familia de la calcona-flavanona isomerasa [Hevea brasiliensis]</i>	42
Proteínas estructuralmente similares a la proteína objetivo	44
<i>Estructuras similares a Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [Manihot esculenta]</i>	44
<i>Estructuras similares a Dihydroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [Theobroma cacao]</i>	46
<i>Estructuras similares a Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol [Abrus precatorius]</i>	48

<i>Estructuras similares a la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [Hevea brasiliensis]</i>	50
<i>Función prevista de las proteínas</i>	52
<i>Función prevista de Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [Manihot esculenta]</i>	52
<i>Función prevista de Dihydroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [Theobroma cacao]</i>	54
<i>Función prevista de Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol [Abrus precatorius]</i>	56
<i>Función prevista de la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [Hevea brasiliensis]</i>	58
<i>Rol de los flavonoles y flavanoles en la síntesis de nanopartículas</i>	59
CONCLUSIONES.....	62
REFERENCIAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides en <i>A. thaliana</i>	14
Tabla 2. Lista de especies vegetales amazónicas y el numero proteínas encontradas mediante el análisis bioinformático.	20
Tabla 3. Código Ec (Enzyme Commission) de las proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides.....	22
Tabla 4. Tipos de flavonoides de las especies vegetales amazónicas encontradas	33
Tabla 5. Proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides en <i>A. thaliana</i> coincidentes con las enzimas seleccionadas	36
Tabla 6. Proteínas seleccionadas para la predicción de estructura	36
Tabla 7. Top 10 de las plantillas utilizadas para la construcción de los modelos 3D de la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [<i>Manihot esculenta</i>].....	38
Tabla 8. Top 10 de las plantillas utilizadas para la construcción de los modelos 3D de la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [<i>Theobroma cacao</i>]	40
Tabla 9. Top 10 de las plantillas utilizadas para la construcción de los modelos 3D de la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [<i>Abrus precatorius</i>]	42
Tabla 10. Top 10 de las plantillas utilizadas para la construcción de los modelos 3D de la proteína de la familia de la calcona-flavanona isomerasa [<i>Hevea brasiliensis</i>]	43
Tabla 11. Estructuras de PDB similares a la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [<i>Manihot esculenta</i>]	45
Tabla 12. Estructuras de PDB similares a la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [<i>Theobroma cacao</i>]	47
Tabla 13. Estructuras de PDB similares a la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [<i>Abrus precatorius</i>].....	49

Tabla 14. Estructuras de PDB similares a la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [<i>Hevea brasiliensis</i>]	51
Tabla 15. Sitios de unión al ligando de la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [<i>Manihot esculenta</i>]	53
Tabla 16. Predicción de los números Ec de la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [<i>Manihot esculenta</i>]	53
Tabla 17. Sitios de unión al ligando de la proteína Dihydroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [<i>Theobroma cacao</i>]	55
Tabla 18. Predicción de los números Ec de la proteína Dihydroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [<i>Theobroma cacao</i>]	55
Tabla 19. Sitios de unión al ligando de la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol [<i>Abrus precatorius</i>])	56
Tabla 20. los números Ec de la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol [<i>Abrus precatorius</i>])	57
Tabla 21. Sitios de unión al ligando de la Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [<i>Hevea brasiliensis</i>]	58
Tabla 22. Predicción de los números Ec de la Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [<i>Hevea brasiliensis</i>]	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de síntesis de flavonoides.	11
Figura 2. Rutas metabólicas asociadas a las biosíntesis de flavonoides en las especies vegetales.....	32
Figura 3. Modelo 3D N°1 de Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [<i>Manihot esculenta</i>] con el C-score más alto de 1.54	38
Figura 4. Modelo 3D N°1 de Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4- reductasa [<i>Theobroma cacao</i>].....	39
Figura 5. Modelo 3D N°1 de Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [<i>Abrus precatorius</i>]	41
Figura 6. Modelo 3D N°1 de la Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [<i>Hevea brasiliensis</i>]	43
Figura 7. Demostración gráfica del ensamblaje de la proteína 1gp6A con la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [<i>Manihot esculenta</i>].....	46
Figura 8. Demostración gráfica del ensamblaje de la proteína 2c29F con la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [<i>Theobroma cacao</i>].....	48
Figura 9. Demostración gráfica del ensamblaje de la proteína 8fetA con la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [<i>Abrus precatorius</i>]	50
Figura 10. Demostración gráfica del ensamblaje de la proteína 8dlcA con la Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [<i>Hevea brasiliensis</i>]	52
Figura 11. Representación gráfica de la síntesis de nanopartículas de plata a partir de extractos de plantas.....	61

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 2.** Script en Python para descargar todas las secuencias de aminoácidos en formato FASTA
- Anexo 3.** Script en bash para individualizar las secuencias de un archivo fasta
- Anexo 4.** Script en bash para realizar blastp
- Anexo 5.** Extracción de las especies vegetales de los resultados de blastp
- Anexo 6.** Búsqueda en la base de datos local (especies vegetales amazónicas)
- Anexo 7.** Términos de búsqueda bibliográfica para la identificación de los tipos de flavonoides en las especies vegetales amazónicas encontradas

RESUMEN

La bioprospección se centra en la búsqueda y comercialización de bio-recursos para descubrir nuevos biomateriales, integrando conocimientos tradicionales con información genética y promoviendo el uso sostenible y el desarrollo socioeconómico. La Amazonia, con hasta 50,000 especies de plantas, ofrece un vasto repositorio de recursos genéticos esenciales para la investigación científica y biotecnológica. Este estudio exploró plantas amazónicas con alto contenido de flavonoides, compuestos con funciones biológicas cruciales y aplicaciones en nanotecnología, especialmente en la síntesis de nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI). Se identificaron proteínas asociadas a la biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis thaliana* utilizando la base de datos Gene Ontology. Las proteínas ortólogas fueron buscadas en la base de datos de NCBI y procesadas mediante la herramienta BLAST para identificar especies vegetales amazónicas. Se identificaron los principales tipos de flavonoides sintetizados por las plantas amazónicas encontradas. La herramienta KEGG se utilizó para mapear rutas metabólicas de flavonoides e identificar las enzimas clave para los metabolitos de interés. Se predijeron estructuras tridimensionales de proteínas clave usando I-TASSER y se analizaron sus funciones biológicas con COFACTOR y COACH. Los resultados mostraron 16 especies previamente no exploradas para la síntesis verde de nZVI, siendo cacao (*Theobroma cacao*), caucho (*Hevea brasiliensis*), yuca (*Manihot esculenta*) y *Abrus precatorius* las especies más representativas. Los principales flavonoides sintetizados por las plantas amazónicas encontradas fueron los flavonoles y flavanoles. Se investigaron el flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa de *Manihot esculenta*, la dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductora de *Theobroma cacao*, la antocianidina reductasa de *Abrus precatorius* y la proteína de la familia de la chalcona-flavanona isomerasa de *Hevea brasiliensis*. Los resultados indicaron que estas proteínas participan en la síntesis de flavonoides en las plantas seleccionadas y que su conservación se observa entre distintas especies. Además, se identificó que los metabolitos flavonoles y flavanoles son esenciales en la síntesis de nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI). En conclusión, la identificación de proteínas asociadas a la biosíntesis de flavonoides en plantas amazónicas puede guiar la bioprospección de especies con alto contenido de flavonoides, ofreciendo un enfoque sostenible y eficiente para la producción de nanopartículas y otros materiales de interés biotecnológico y ambientales.

Palabras clave: Amazonia, bioprospección, flavonoides, nanopartículas, hierro cerovalente.

ABSTRACT

Bioprospecting focuses on the search and commercialization of bio-resources to discover new biomaterials, integrating traditional knowledge with genetic information and promoting sustainable use and socioeconomic development. The Amazon, with up to 50,000 plant species, offers a vast repository of genetic resources essential for scientific and biotechnological research. This study explored Amazonian plants with high flavonoid content, compounds with crucial biological functions and applications in nanotechnology, especially in the synthesis of zerovalent iron (nZVI) nanoparticles. Proteins associated with flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* were identified using the Gene Ontology database. Orthologous proteins were searched in the NCBI database and processed using the BLAST tool to identify Amazonian plant species. The main types of flavonoids synthesized by the Amazonian plants found were identified. The KEGG tool was used to map flavonoid metabolic pathways and identify key enzymes for the metabolites of interest. Three-dimensional structures of key proteins were predicted using I-TASSER and their biological functions were analyzed with COFACTOR and COACH. The results showed 16 previously unexplored species for the green synthesis of nZVI, with cocoa (*Theobroma cacao*), rubber (*Hevea brasiliensis*), cassava (*Manihot esculenta*) and *Abrus precatorius* being the most representative species. The main flavonoids synthesized by the Amazonian plants found were flavonols and flavanols. Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase from *Manihot esculenta*, bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase from *Theobroma cacao*, anthocyanidin reductase from *Abrus precatorius*, and chalcone-flavanone isomerase family protein from *Hevea brasiliensis* were investigated. The results indicated that these proteins participate in the synthesis of flavonoids in the selected plants and that their conservation is observed between different species. In addition, flavonol and flavanol metabolites were identified to be essential in the synthesis of zerovalent iron (nZVI) nanoparticles. In conclusion, the identification of proteins associated with flavonoid biosynthesis in Amazonian plants can guide the bioprospecting of species with high flavonoid content, offering a sustainable and efficient approach for the production of nanoparticles and other materials of biotechnological and environmental interest.

Key words: Amazonia, bioprospecting, flavonoids, nanoparticles, zero valent iron.

Revista "Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology"

Online ISSN: 2169-141X

<https://www.tandfonline.com/journals/ianb20>

INTRODUCCIÓN

La bioprospección consiste en la búsqueda sistemática de bio-recursos para el descubrimiento de nuevos biomateriales y productos naturales valiosos, promoviendo el uso sostenible de los recursos biológicos y el desarrollo socioeconómico (Kathuria & Chourasiya, 2022; Neimark, 2017; Torres & Velho, 2009). La Amazonia, albergando la mayor extensión de bosque tropical del planeta, es un escenario invaluable para la bioprospección, pues sus aproximadamente 50,000 especies de plantas, ofrecen un repositorio abundante y relativamente inexplorado de recursos genéticos y metabólicos que son esenciales para la investigación científica y biotecnológica (Cardoso et al., 2017).

La diversidad biológica de la Amazonia incluye también una amplia riqueza de metabolitos, entre los que figuran los aceites esenciales, alcaloides, cumarinas, esteroides, fenoles, quinonas, saponinas, terpenos y flavonoides (Verdecía et al., 2021). Estos compuestos son reconocidos por sus múltiples funciones biológicas, como el crecimiento y desarrollo de las plantas, la protección contra patógenos y la modulación de las respuestas al estrés en las plantas (Liu et al., 2021; Sasaki & Nakayama, 2015; Winkel-Shirley, 2001). Los flavonoides destacan por su actividad reductora, sus propiedades quelantes y su poder antioxidante, haciéndolos especialmente útiles en el ámbito de la nanotecnología, la fabricación de nuevos materiales y la síntesis de nanopartículas (Aksu Demirezen et al., 2019; Fazlzadeh et al., 2017; Santos-Espinoza et al., 2020).

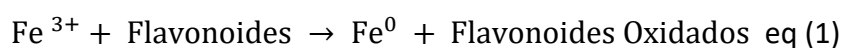
Esta capacidad de los flavonoides para actuar como agentes reductores es particularmente significativa en la síntesis verde de nanopartículas, un método alternativo y ecológico para producir nanopartículas que utiliza extractos de plantas ricos en flavonoides, evitando el uso de agentes reductores químicos, complejos y tóxicos que pueden generar subproductos no deseados y adicionar más riesgos ambientales (Abdo et al., 2023; Hussain et al., 2019). Esta síntesis es una metodología

emergente en la nanotecnología para la remediación ambiental (Abdo et al., 2023; Hussain et al., 2019).

Las nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI), son altamente eficaces para la degradación de contaminantes orgánicos y la remediación de metales pesados en suelos y aguas (Abdo et al., 2023; Puthukkara P et al., 2021; Galdames et al., 2017)), presentándose como una oportunidad para resolver los problemas medioambientales en regiones como la Amazonia, que se han visto afectadas por una creciente contaminación en sus ecosistemas debido a las actividades extractivistas (Mora et al., 2019; Soto-Benavente et al., 2020; Velásquez Ramírez et al., 2020; Nagalakshmaiah et al., 2019).

La producción convencional nZVI se basa en métodos químicos que utilizan reactivos nocivos y peligrosos, como el borohidruro de sodio (NaBH_4) o el hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4), mismos que, además, generan subproductos peligrosos, vulnerando los principios de una gestión ambiental responsable y sostenible (Stefaniuk et al., 2016). La síntesis verde de nZVI por otra parte, se inicia con la preparación de un extracto vegetal rico en compuestos polifenólicos. Estos compuestos, con estructuras complejas de anillos aromáticos y grupos funcionales como hidroxilos y metoxilos, son esenciales para la reducción de iones metálicos a nanopartículas metálicas. Durante la síntesis, el extracto vegetal se mezcla con una solución de iones metálicos, como Fe^{3+} , y el pH se ajusta a valores alcalinos (pH 8-10) utilizando NaOH. En este ambiente, los polifenoles, especialmente los flavonoides, se desprotonan para formar aniones fenólicos (Ar-O^-), que actúan como agentes reductores. La estructura de los flavonoides, que incluye un sistema conjugado de dobles enlaces y grupos donantes de electrones, facilita la transferencia de electrones a los iones metálicos. Esto resulta en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} y, posteriormente, de Fe^{2+} a Fe^0 , el estado metálico cerovalente. Este proceso de reducción es fundamental para la nucleación y crecimiento de nanopartículas (Aksu Demirezen et al., 2019; Fazlzadeh et al., 2017; Velusamy et al., 2016).

La ecuación que describe la síntesis verde de nZVI es la siguiente:



Los flavonoides también desempeñan un papel crucial en la estabilización de las nanopartículas formadas. Químicamente, estas moléculas se adsorben en la superficie de las nanopartículas a través de interacciones de coordinación y enlaces de hidrógeno, formando una capa de capping que previene la aglomeración. La estabilización electrostática se debe a la ionización de los grupos funcionales presentes en los flavonoides, que confiere una carga superficial a las nanopartículas, generando repulsión entre ellas y evitando así la coagulación. Además, la estabilización estérica se ve facilitada por el tamaño voluminoso de los flavonoides, que crea una barrera física alrededor de las nanopartículas. Esto impide que se acerquen demasiado y se aglomeren, manteniendo así la estabilidad coloidal del sistema. Estos mecanismos combinados no solo preservan el tamaño y la morfología de las nanopartículas, sino que también mejoran su funcionalidad, aumentando su superficie activa y facilitando su uso en diversas aplicaciones industriales y ambientales (Santos-Espinoza et al., 2020; Velusamy et al., 2016).

Aunque el proceso de síntesis verde de nZVI está bien estudiado, la selección y el aprovechamiento de las especies vegetales, sobre todo en la Amazonia, aún es un campo relativamente nuevo para la ciencia, y la investigación actual no aprovecha plenamente las posibilidades que estos recursos biológicos locales pueden ofrecer (Bhattacharyya et al., 2010; Borja.Borja et al., 2020; Kahraman et al., 2022; 'Kumar, 2019; Nel et al., n.d.; Vazquez-Duhalt, 2015; Zhang & Yang, 2017).

La exploración experimental de cada especie por individual de la Amazonia sería un proceso lento, costoso y con una alta demanda de recursos. En este contexto, la aplicación de herramientas bioinformáticas ofrece una alternativa eficiente y rápida para la bioprospección. La búsqueda de rutas metabólicas *in silico* permite identificar poblaciones genéticas y diversidad estructural de organismos óptimos para la síntesis química. Estas técnicas *in silico* facilitan la predicción de rutas metabólicas y la identificación de especies amazónicas disponibles en las bases de datos públicas, con perfiles metabólicos adecuados para la producción de compuestos específicos, como los

flavonoides. Además, el análisis bioinformático puede ayudar a mapear la diversidad genética y química, optimizando así la selección de organismos para la síntesis de nZVI. De este modo, se puede maximizar el aprovechamiento de los recursos biológicos de la Amazonia de manera más eficiente y sostenible (Berardini et al., 2015; Bethesda (MD), 2008; Galdames et al., 2017; Kathuria & Chourasiya, 2022; Neimark, 2017; Solís, 2008).

Entre estas herramientas se encuentra BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Bethesda (MD), 2008), un algoritmo heurístico que compara información primaria de secuencias biológicas como nucleótidos, proteínas o aminoácidos con bases de datos de secuencias biológicas, con la finalidad de identificar similitudes por encima de ciertos umbrales predefinidos, como el e-value (valor esperado), el score (puntaje de alineamiento) y la identidad porcentual. Estos umbrales ayudan a determinar la relevancia de las coincidencias encontradas, asegurando que solo las secuencias con una similitud significativa sean destacadas para un análisis más detallado (Altschul et al., 1990).

Por otro lado, el recurso de base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) representa una herramienta integral en bioinformática que amalgama datos genómicos, químicos y sistémicos. KEGG proporciona no solo información sobre secuencias genéticas, sino también mapas detallados de rutas metabólicas, permitiendo vincular secuencias de genes con sus funciones bioquímicas correspondientes (Kanehisa & Sato, 2020). Este recurso es fundamental para la investigación en biología molecular y la comprensión de las interacciones entre genes, proteínas y metabolitos.

Además, el servidor I-Tasser (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) se destaca como uno de los sistemas en línea más destacados para la predicción precisa de estructuras proteicas tridimensionales y la anotación funcional basada en estas estructuras (Yang & Zhang, 2015). Utilizando un enfoque iterativo de ensamblaje por enhebrado, I-Tasser genera modelos estructurales que son útiles para estudios de diseño de fármacos, ingeniería de proteínas y análisis de interacciones moleculares a nivel atómico. Su capacidad para predecir la estructura y función de proteínas de

manera rápida y precisa lo convierte en una herramienta indispensable en el campo de la bioinformática y la biología computacional (Kanehisa & Sato, 2020; Yang & Zhang, 2015). Esta herramienta utiliza la secuencia de aminoácidos para crear modelos estructurales tridimensionales mediante el reensamblaje de fragmentos extraídos de plantillas de subprocesos, donde los conocimientos biológicos de las proteínas objetivo se derivan al comparar estos modelos estructurales con proteínas conocidas en bases de datos funcionales (Yang et al., 2012). Los resultados finales de las predicciones se calculan en función de intervalos de confianza de identidad en las regiones estructuralmente alineadas entre los modelos y las plantillas, evaluadas por métodos estadísticos de ponderación como el TM-score (Yang & Zhang, 2015).

La integración de herramientas bioinformáticas, como BLAST, KEGG y I-Tasser, permite abordar el desafío de identificar proteínas asociadas con la biosíntesis de flavonoides en especies vegetales amazónicas de manera más eficiente y precisa (Bethesda (MD), 2008; Kanehisa & Sato, 2020; Tan et al., 2022; Varadi et al., 2022), lo que permite seleccionar las plantas con mayor potencial para la síntesis verde de nZVI, reduciendo significativamente los costos asociados con la experimentación y apoyando el uso sostenible de los recursos biológicos (Lee et al., 2007; Tan et al., 2022; Chen et al., 2023; Falcone Ferreyra et al., 2012; Kathuria & Chourasiya, 2022; Santos-Espinoza et al., 2020).

Si bien, se ha estudiado ciertos metabolitos secundarios en especies amazónicas del Ecuador, como: Flavonoides, Alcaloides, Saponinas y Triptenos en *Teramnus labialis*, *Tithonia diversifolia* y *Leucaena leucocephala* (Verdecía et al., 2021), para los análisis bioinformáticos, la especie vegetal *Arabidopsis thaliana* se ha convertido en el organismo modelo por excelencia de la ciencia vegetal debido a sus numerosas ventajas. Su genoma compacto, su corto ciclo vital (aproximadamente 6 semanas) y su facilidad de cultivo la convierten en un sistema ideal para estudios genéticos y moleculares (Koornneef & Meinke, 2010). Además, un genoma pequeño (~135 Mb) muy bien caracterizado facilita la identificación y el estudio de genes implicados en procesos biológicos clave como el desarrollo, las respuestas al estrés y la biosíntesis de metabolitos secundarios. Los amplios recursos genéticos disponibles para *A. thaliana*,

incluidas las herramientas genómicas, aumentan aún más su utilidad como organismo modelo (Koornneef & Meinke, 2010). Los conocimientos adquiridos mediante el estudio de esta especie suelen trasladarse a otras especies vegetales, incluidas especies pocos estudiadas, lo que la convierte en una herramienta inestimable en la búsqueda de nuevas especies vegetales que presenten una maquinaria celular para la biosíntesis de metabolitos secundarios.

Por todo lo mencionado, el presente estudio tiene como objetivo identificar y seleccionar especies vegetales amazónicas que muestren mayor homología genómica y estructural con las proteínas de biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis thaliana* mediante herramientas bioinformáticas, como indicador de su capacidad potencial para sintetizar nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI). Para ello, se determinaron las proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis thaliana*. A través del repositorio de NCBI, se realizó una búsqueda utilizando las proteínas de referencia con el fin de identificar, mediante la herramienta BLAST, especies vegetales amazónicas con secuencias ortólogas a estas. Posteriormente, se identificaron las enzimas que participan en la ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en las especies amazónicas seleccionadas. Finalmente, se predijo la estructura tridimensional de las proteínas de interés utilizando la herramienta I-TASSER para inferir su función biológica determinando si esta, se relaciona con la síntesis de flavonoides.

MÉTODOS

Obtención de las secuencias que participan en la biosíntesis de flavonoides en *A. thaliana*

Se realizó una búsqueda en la base de datos de Gene Ontology (GO) para identificar los genes asociados a la biosíntesis de flavonoides. Se trabajó con el proceso biológico denominado “flavonoid biosynthetic process” (GO:0009813) y se descargó la información perteneciente a la especie *Arabidopsis thaliana*. Los datos fueron exportados al programa Microsoft® Excel y se trabajó con los registros de “Gene/product (bioentity)”. Se eliminaron los datos redundantes mediante la opción de “filtro avanzado”, seguida de la opción de “solo registros únicos”. De esta forma, se obtuvieron todos los genes con los identificadores (IDs) en formato TAIR (The Arabidopsis Information Resource). Por otro lado, se descargó un archivo de texto plano del repositorio TAIR (Berardini et al., 2015), el cual contiene los identificadores de secuencia de proteínas (formato TAIR) y la correspondiente adhesión de UniProt. Con el programa Microsoft® Excel se realizó la conversión de los IDs y así obtener los correspondientes identificados de las proteínas en formato UniProt. Para ello se utilizó la función “BUSCARV”, la cual permite buscar y encontrar datos en una columna específica dentro de un conjunto de datos (texto plano del repositorio TAIR), a partir de coincidencias exactas o aproximadas.

Búsqueda de proteínas ortólogas en la base de datos de NCBI

Mediante un script en Python (Anexo 1) se descargaron todas las secuencias de aminoácidos en formato FASTA a partir de los IDs de las proteínas asociadas a la biosíntesis de flavonoides. Luego, mediante un segundo script en bash (Anexo 2) se realizó la individualización de las secuencias de aminoácidos en archivos fasta únicos. Es decir, se transformó un archivo de secuencias múltiple en varios archivos individuales. Después, se realizó la búsqueda mediante el aplicativo BLAST+ de líneas de comando

(Bethesda (MD), 2008). El script en bash (Anexo 3) utilizó la función “blastp” con los parámetros predeterminados y confrontando con la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes (nr) de NCBI (específicamente GenPept, Swissprot, PIR, PDF, PDB y NCBI RefSeq). Este proceso fue enviado para su procesamiento en la nube de NCBI de forma parcelada, debido al alto consumo computacional que conlleva este análisis. Los resultados de estos procesos fueron almacenados en subcarpetas diferentes.

Procesamiento de resultados mediante la base de datos de especies vegetales amazónicas

Para cada uno de los resultados de BLAST de las proteínas analizadas, se extrajo únicamente el nombre de las especies vegetales, mediante un script en bash (Anexo 4). Luego, se descargó una base de datos curada que contiene información sobre especies vegetales amazónicas (Cardoso et al., 2017). Se desarrolló un nuevo script en bash (Anexo 5) para realizar la búsqueda en esta base de datos local, haciendo uso del comando ‘grep’. Este proceso consiguió recuperar todas las coincidencias de especies vegetales para cada una de las proteínas analizadas. Los resultados fueron procesados (gráficas y tabulaciones) mediante el lenguaje de programación de Python.

Identificación de enzimas que participan en la biosíntesis de flavonoides en las especies vegetales amazónicas encontradas

Se realizó una búsqueda de las proteínas que participan en la biosíntesis de flavonoides en *A. thaliana* en el repositorio de “UniProt Knowledgebase” (UniProtKB), un centro de información funcional sobre proteínas, con anotaciones precisas y consistentes (Cardoso et al., 2017), con la finalidad de obtener el número EC (Enzyme Commission numbers) de las proteínas. Posteriormente, se procedió a realizar gráficos de las rutas metabólicas de biosíntesis de flavonoides, biosíntesis de flavonas y flavonoles, para todas las especies amazónicas obtenidas estudiadas mediante el procesamiento de datos en Python. Para realizar estos gráficos, se utilizó la herramienta de mapeo KEGG

(Kanehisa & Sato, 2020), la cual es una base de datos de mapas metabólicos y pueden ser personalizados de acuerdo con el conjunto de datos que se introduzcan.

Selección de las proteínas clave para la predicción de estructura

Identificación de los tipos de flavonoides en las especies vegetales amazónicas encontradas

Para la identificación de los tipos de flavonoides sintetizados por las especies vegetales amazónicas, cuyas rutas metabólicas están documentadas en KEGG, se recopiló información bibliográfica exhaustiva. Se emplearon repositorios académicos como Google Scholar y PubMed, utilizando combinaciones de palabras clave específicas y operadores lógicos para mejorar la precisión y relevancia de los resultados obtenidos. Los términos de búsqueda incluyeron combinaciones como "[Nombre científico de la planta amazónica] AND flavonoids" y "[Nombre científico de la planta amazónica] AND phytochemistry". Los términos reales para la búsqueda de la información se pueden observar en el Anexo 6. La utilización del operador "AND" permitió refinar la búsqueda, asegurando que los resultados incluyeran tanto el nombre científico de la planta como los estudios sobre flavonoides y fitoquímica.

Determinación de enzimas clave para la síntesis de los metabolitos seleccionados

Se utilizó una ruta metabólica estándar para la síntesis de flavonoides en plantas (Chen et al., 2023), con el fin de identificar las enzimas clave en la producción de los metabolitos identificados previamente. A través de una exhaustiva revisión bibliográfica, se identificaron varias enzimas esenciales que desempeñan un papel fundamental en esta ruta química. En particular, se destacó la importancia de la chalcona isomerasa (CHI), esencial en los pasos iniciales en la síntesis de flavonoides, convirtiendo los precursores en chalconas y posteriormente en flavanonas (Liu et al., 2021). Asimismo, la dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) y la antocianidina reductasa (ANR) fueron identificadas como críticas para la formación de flavan-3-oles y

antocianidinas (L. Wang et al., 2016). Además, la revisión bibliográfica subrayó la relevancia de la flavonol sintasa (FLS) en la producción de los flavonoles. La ruta metabólica utilizada se muestra en la Figura 1, ilustrando la participación de estas enzimas clave en la síntesis de los flavonoides (Anwar et al., 2019).

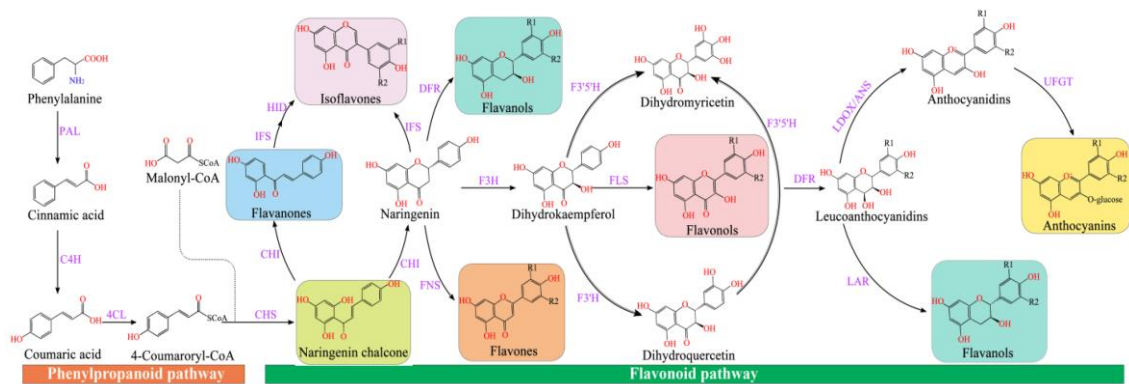


Figura 1. Ruta de síntesis de flavonoides.

Fuente: (Chen et al., 2023)

Selección de las proteínas para realizar predicción de estructura

Las enzimas identificadas en el paso anterior se compararon con las proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis thaliana*. Se seleccionaron aquellas proteínas cuyos nombres coincidieran con las enzimas clave previamente identificadas. Para obtener las secuencias ortólogas de estas proteínas en plantas amazónicas, se realizó un análisis BLAST específico. Este análisis permitió identificar las proteínas ortólogas de *Arabidopsis thaliana* en cada planta amazónica seleccionada. Se escogieron las cuatro plantas amazónicas que presentaron la mayor cantidad de proteínas ortólogas.

Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas de interés para la inferencia de su función.

Para cada una de las proteínas identificadas previamente cuya estructura se quería predecir: Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa de *Manihot esculenta*, Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa de *Theobroma cacao*,

Antocianidina reductasa de *Abrus precatorius*, y la Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa de *Hevea brasiliensis*, se ingresó al servidor de I-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) y se insertó la secuencia de aminoácidos correspondiente.

Construcción de modelos tridimensional

El servidor generó modelos 3D de la estructura de proteínas mediante un proceso iterativo que combina la alineación por threading con la simulación de ensamblaje de fragmentos. Las secuencias de aminoácidos de la proteína objetivo se alinearon con estructuras conocidas en la base de datos de estructuras de proteínas (PDB). A partir de las alineaciones obtenidas, se construyeron modelos preliminares 3D. Estos modelos fueron refinados iterativamente mediante simulación de ensamblaje de fragmentos, lo que permitió optimizar la conformación general de la proteína (Yang & Zhang, 2015).

Evaluación de similitud estructural

El modelo generado por I-TASSER para cada proteína fue comparado con todas las estructuras en la biblioteca PDB utilizando el programa TM-align. Este software calculó la similitud estructural entre el modelo I-TASSER de cada proteína y las proteínas en la base de datos, alineando las estructuras y cuantificando su grado de similitud mediante un puntaje TM-score. Las 5 proteínas de PDB con la similitud estructural más cercana a cada modelo fueron identificadas y reportadas

Función prevista de las proteínas

La función prevista de la estructura predicha para cada proteína se realizó con los programas COFACTOR y COACH, basándose en la estructura generada por I-TASSER. COFACTOR dedujo funciones biológicas de cada proteína objetivo identificando sitios de unión de ligandos y asignando números EC (Enzyme Commission) para clasificar cada proteína como enzima. Este número clasificó la función enzimática de cada proteína de

manera jerárquica, proporcionando información detallada sobre su actividad catalítica y sus mecanismos bioquímicos. Por su parte, COACH combinó los resultados de COFACTOR, TM-SITE y S-SITE para predecir con mayor precisión los sitios de unión de ligandos de cada proteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secuencias involucradas en la biosíntesis de flavonoides en *A. thaliana*

En la Tabla 1 se presenta un conjunto de 88 proteínas estrechamente relacionados con la biosíntesis de flavonoides en *A. thaliana*, según el repositorio Gene Ontology (Carbon et al., 2009). Gene Ontology ofrece un léxico sistemático y estandarizado que sirve de piedra angular para mejorar la comprensión de los datos genómicos. En consecuencia, emerge como una herramienta indispensable en las etapas iniciales de los procesos de bioprospección, proporcionando una base para la exploración sistemática y el descubrimiento de entidades biológicas y sus relaciones funcionales dentro de rutas moleculares complejas.

Se estima que el metaboloma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* supera los 5000 metabolitos, siendo los flavonoides uno de los principales productos secundarios (Saito et al., 2013). Las investigaciones sobre la anotación de proteínas asociadas a flavonoides han sido muy exitosas en esta planta, proporcionando una base sólida para explorar y comprender las vías biosintéticas de estos compuestos. Los flavonoides son metabolitos secundarios polifenólicos con gran potencial para la síntesis de nanopartículas (Sharma et al., 2019) y el conocimiento de las proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides en *A. thaliana* puede revelar similitudes y diferencias que ayuden a identificar plantas amazónicas con alto contenido de flavonoides, potenciales para la síntesis verde de nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI).

Tabla 1. Proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides en *A. thaliana*

Código UniProt	Nombre completo Proteína	Cont*	Plantas
Q8VY70	Dimethylallyl, adenosine tRNA methylthiotransferase	11	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Spirodela intermedia</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Vanilla planifolia</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>

Q8LDM2	Type III polyketide synthase B	9	<i>Spirodela intermedia</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9LH76	Trifunctional UDP-glucose 4,6-dehydratase/UDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose 3,5-epimerase/UDP-4-keto-L-rhamnose-reductase RHM3	9	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q8VZW3	Probable chalcone--flavanone isomerase 3	9	<i>Spirodela intermedia</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Phylla nodiflora</i>
Q9LPV9	WD repeat-containing protein LWD1	9	<i>Spirodela intermedia</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Vanilla planifolia</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9M2K5	Uncharacterized protein	9	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Spirodela intermedia</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Vanilla planifolia</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i>
Q9ZST4	Nitrogen regulatory protein P-II homolog	9	<i>Spirodela intermedia</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Vanilla planifolia</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
O48782	Heme oxygenase 1, chloroplastic	8	<i>Spirodela intermedia</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9XIG1	Sterol 3-beta-glucosyltransferase UGT80B1	8	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Vanilla planifolia</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9LPG6	Trifunctional UDP-glucose 4,6-dehydratase/UDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose 3,5-epimerase/UDP-4-keto-L-rhamnose-reductase RHM2	8	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9SYM5	Trifunctional UDP-glucose 4,6-dehydratase/UDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose 3,5-epimerase/UDP-4-keto-L-rhamnose-reductase RHM1	8	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q8VWG3	Protein transparent testa 1	8	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Spirodela intermedia</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9LPF5	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	8	<i>Spirodela intermedia</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i>
O22264	Transcription factor MYB12	8	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Spirodela intermedia</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i>
Q29PZ1	Glutaredoxin-C10	8	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Spirodela intermedia</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>

Q9SD85	Flavonoid 3'-monooxygenase	7	<i>Chromolaena odorata, Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao, Phylla nodiflora</i>
Q9FK25	Flavone 3'-O-methyltransferase 1	7	<i>Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Bixa orellana, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
Q9LK36	Adenosylhomocysteinase 2	7	<i>Mikania micrantha, Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
O22141	UDP-glucuronate 4-epimerase 4	7	<i>Mikania micrantha, Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
Q5DWV9	Chalcone-flavonone isomerase family protein	7	<i>Spirodela intermedia, Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Vassobia dichotoma, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
Q9FX28	Kunitz trypsin inhibitor 3	7	<i>Colocasia esculenta, Mikania micrantha, Handroanthus impetiginosus, Abrus precatorius, Crateva tapia, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
Q9SYM2	B-box zinc finger protein 22	7	<i>Mikania micrantha, Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
Q84MC0	Uncharacterized GPI-anchored protein	7	<i>Mikania micrantha, Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
Q8VZH1	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	7	<i>Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Canna indica, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
Q9LS08	Transcription factor AIG1	7	<i>Mikania micrantha, Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
Q84JS4	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	7	<i>Colocasia esculenta, Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
O22133	Protein BRI1-5 enhanced 1	6	<i>Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
O22203	Cytochrome P450 98A3	6	<i>Mikania micrantha, Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao</i>
Q9FLV0	Protein downy mildew resistance 6	6	<i>Mikania micrantha, Handroanthus impetiginosus, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao</i>
Q9S818	Naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase	6	<i>Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Vssobia dichotoma, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao</i>
Q9CA71	Fucosyltransferase 3	6	<i>Colocasia esculenta, Mikania micrantha, Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Abrus precatorius, Theobroma cacao</i>

Q42059	Endoglucanase 6	6	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
P42813	Ribonuclease 1	6	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Vanilla planifolia</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9FKW3	Chalcone--flavanone isomerase 2	6	<i>Spirodela intermedia</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Vassobia dichotoma</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q3E6Y4	4-coumarate--CoA ligase-like 3	6	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9C9A5	MYB-like 2	6	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i>
Q8W4R7	Serine/Threonine-kinase	6	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
O80730	Uncharacterized protein	6	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9LK32	Uncharacterized protein	6	<i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q8W4P9	Protein transparent testa 9	6	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9SVC8	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	6	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9SVD1	Uncharacterized protein	6	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9SUK8	Ethylene-responsive transcription factor ERF039	6	<i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q940N9	Protein detoxification 39	6	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q96323	Leucoanthocyanidin dioxygenase	5	<i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i>
Q96330	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	5	<i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9SEV0	Anthocyanidin reductase	5	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
O81305	Type III polyketide synthase C	5	<i>Spirodela intermedia</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i>
Q9ZVX4	UDP-glycosyltransferase 90A1	5	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q0WW21	UDP-glycosyltransferase 75C1	5	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>

Q9LFJ9	UDP-glycosyltransferase 78D4	5	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9LFJ8	Flavonol 3-O-glucosyltransferase	5	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9LVW3	Anthocyanidin 3-O-glucoside 2'''-O-xylosyltransferase	5	<i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9SK55	Transcription factor jungbrunnen 1	5	<i>Spirodela intermedia</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i>
Q9SD65	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	5	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9FT45	Fasciclin-like arabinogalactan protein 15	5	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i>
Q9LYT3	Protein detoxification 41	5	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9LZK4	Transcription factor MYB11	5	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Canna indica</i> , <i>Theobroma cacao</i>
O49687	Transcription factor MYC4	5	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i>
F4JTB3	Protein detoxification 35	5	<i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9FJ07	Transcription factor MYB111	5	<i>Colocasia esculenta</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i>
P51102	Dihydroflavonol 4-reductase	4	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q84J37	Laccase-15	4	<i>Mikania micrantha</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i>
F4KAS1	Probable flavonol synthase 4	4	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
O23674	Type III polyketide synthase A	4	<i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i>
Q9S9P6	Flavonol-3-O-rhamnosyltransferase	4	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9LNE6	Flavonol 7-O-rhamnosyltransferase	4	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9LFK0	UDP-glycosyltransferase 78D3	4	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9C891	Dirigent protein 20	4	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i>
Q9SJY4	Uncharacterized protein	4	<i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Abrus precatorius</i>
Q9FIP9	Transcription factor MYC3	4	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Turnera subulata</i>
Q9FFQ5	Flavonol synthase 3	3	<i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i>
Q9FFQ4	Probable flavonol synthase 5	3	<i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Theobroma cacao</i>

Q9LJB4	Malonyl-CoA:anthocyanidin 5-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase	3	<i>Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Theobroma cacao</i>
Q9ZQ95	UDP-glycosyltransferase 73C6	3	<i>Hevea brasiliensis, Abrus precatorius, Theobroma cacao</i>
Q8W491	UDP-glycosyltransferase 73B3	3	<i>Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Theobroma cacao</i>
Q8VZE9	UDP-glycosyltransferase 73B1	3	<i>Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Theobroma cacao</i>
Q9LVF0	UDP-glycosyltransferase 84A2	3	<i>Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Theobroma cacao</i>
Q94C57	UDP-glucosyl transferase 73B2	3	<i>Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Theobroma cacao</i>
Q9ZQG4	UDP-glycosyltransferase 73B5	3	<i>Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Theobroma cacao</i>
Q7Y232	UDP-glycosyltransferase 73B4	3	<i>Hevea brasiliensis, Manihot esculenta, Theobroma cacao</i>
Q9FE25	Transcription factor MYB75	3	<i>Handroanthus impetiginosus, Manihot esculenta, Theobroma cacao</i>
F4K7D5	Probable flavonol synthase 6	2	<i>Theobroma cacao, Turnera subulata</i>
Q8S8P0	Putative serine carboxypeptidase-like 52	1	<i>Theobroma cacao</i>
O80386	COP1-interacting protein 7	1	<i>Theobroma cacao</i>
B2GVM7	Putative inactive flavonol synthase 2	1	<i>Theobroma cacao</i>
P13114	Chalcone synthase	0	
O49341	Uncharacterized protein	0	

*cont: número de especies vegetales amazónicas encontradas.

s.i.: sin información

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

Proteínas ortólogas presentes en las especies vegetales amazónicas

Se utilizó únicamente los resultados que presentaron una cobertura mayor al 60% y una buena puntuación de alineación (alignment scores ≥ 80) en las búsquedas de similitud realizadas en BLAST; lo que significa que probablemente estas proteínas estén conservadas en varias especies de plantas. Los resultados se filtraron a través de una base de datos que abarca las diversas especies de plantas dentro de la selva amazónica (Cardoso et al., 2017). Los autores afirman que su base de datos es fiable porque utilizaron datos verificados de colecciones botánicas de todo el mundo y comprobaron si había errores o duplicados con la ayuda de expertos taxonómicos. Después de aplicar este filtro, se obtuvieron resultados para todas las proteínas, a excepción de dos (O49341 y P13114) (Tabla 1). En particular, la proteína "Dimethylallyl, adenosine tRNA methylthiotransferase" (Q8VY70) mostró la mayor frecuencia, asociándose a 11

especies vegetales únicas. Además, se puede apreciar que la media de especies vegetales amazónicas encontradas fue cinco. Esto indica que existe un grupo de especies con un alto número de proteínas envueltas en la biosíntesis de flavonoides.

El análisis bioinformático arrojó un total de 16 especies vegetales distintas (Tabla 2). Se destacaron las especies *Theobroma cacao* (cacao), *Hevea brasiliensis* (caucho), *Manihot esculenta* (yuca) y *Abrus precatorius*, debido a que presentan el mayor número de proteínas identificadas en el análisis. Estas especies fueron ordenadas en la Tabla 2 según el número de proteínas encontradas, ya que un mayor número de proteínas identificadas sugiere una mayor relevancia y potencial biológico en la biosíntesis de flavonoides.

Tabla 2. Lista de especies vegetales amazónicas y el numero proteínas encontradas mediante el análisis bioinformático.

Nombre científico	Nombre común	Proteínas
<i>Theobroma cacao</i>	Cacao	83
<i>Hevea brasiliensis</i>	Árbol del caucho	77
<i>Manihot esculenta</i>	Mandioca/Yuca	77
<i>Abrus precatorius</i>	Ojo de cangrejo	56
<i>Turnera subulata</i>	Clavel de oro	52
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Guayacán rosado	43
<i>Mikania micrantha</i>	Guaco blanco	30
<i>Canna indica</i>	Caña de cuentas	15
<i>Spirodela intermedia</i>	Lenteja de agua	15
<i>Colocasia esculenta</i>	Papa china/malanga	15
<i>Vanilla planifolia</i>	Vainilla	6
<i>Vassobia dichotoma</i>	s/i*	3
<i>Phyla nodiflora</i>	Hierba del mosquito	2
<i>Bixa orellana</i>	Achiote	1
<i>Crateva tapia</i>	Naranja de payaguá	1
<i>Chromolaena odorata</i>	Albahaquilla	1

*s/i: sin información

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

Enzimas que participan en la biosíntesis de flavonoides en las especies vegetales encontradas

De las 88 proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides en *A. thaliana* se determinó el número EC (Enzyme Commission numbers) de 49 de ellas, como se detalla en la Tabla 3. Esto se debe a que no todas las proteínas identificadas son enzimas, sino que cumplen funciones estructurales o son factores de transcripción. Además, algunas de las proteínas identificadas son predichas, lo que significa que aún no se ha confirmado experimentalmente la reacción que catalizan, ya que se ha inferido su función a partir de análisis computacionales como la predicción de estructura, alineación de secuencias o modelos de homología (Lee et al., 2007).

En las rutas metabólicas de la biosíntesis de flavonoides para cada planta amazónica (Figura 2), se destacaron las enzimas identificadas, con el propósito de reconocer su relevancia y participación en la ruta. Se ha observado una similitud entre las rutas metabólicas para la biosíntesis de flavonoides de las diferentes especies vegetales amazónicas, lo cual coincide con la literatura que respalda la conservación de la vía central de la biosíntesis de flavonoides en las plantas, sin embargo, son las diferentes enzimas que modifican el esqueleto básico de los flavonoides las que conducen a la diversificación en subclases de estos compuestos (Falcone Ferreyra et al., 2012; Wen et al., 2020).

A través del análisis de estas rutas (Figura 2), también se ha identificado la conservación de diversas enzimas en las especies amazónicas, las cuales desempeñan roles fundamentales al convertir sustratos esenciales para la producción de flavonoides. Por ejemplo, se ha evidenciado la participación de la chalcone-flavanone isomerase, la cual juega un papel crucial en la isomerización de intermediarios flavonoides como chalcones y flavanonas (Chen et al., 2023). La flavanona es un intermediario fundamental, ya que sirve como precursor común de todas las clases de flavonoides, incluyendo sus distintivos subgrupos (Liu et al., 2021).

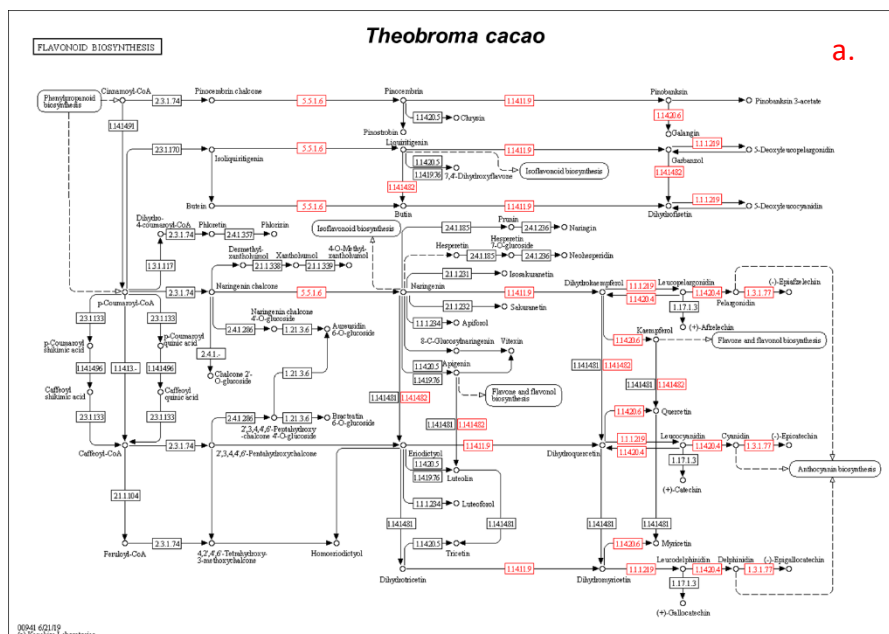
Sin embargo, en el caso de las plantas amazónicas *Bixa orellana*, *Crateva tapia*, *Chromolaena odorata* y *Vanilla planifolia*, las proteínas ortólogas identificadas no figuran en el mapa de referencia de la ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides. Esto puede deberse a que el genoma de estas plantas no ha sido completamente secuenciado o que las proteínas identificadas no están completamente descritas, lo que sugiere su posible participación en un proceso específico de la biosíntesis de flavonoides exclusivo para cada especie.

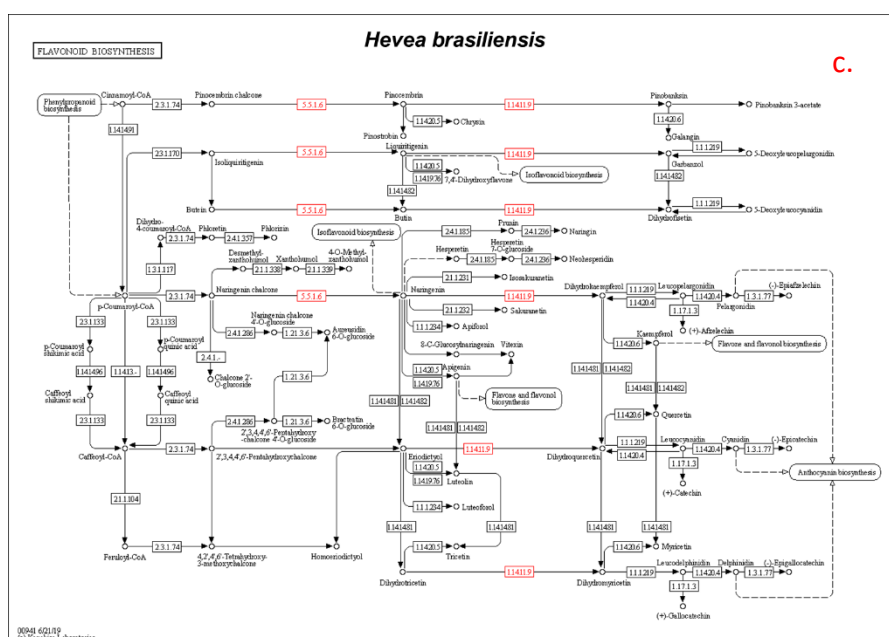
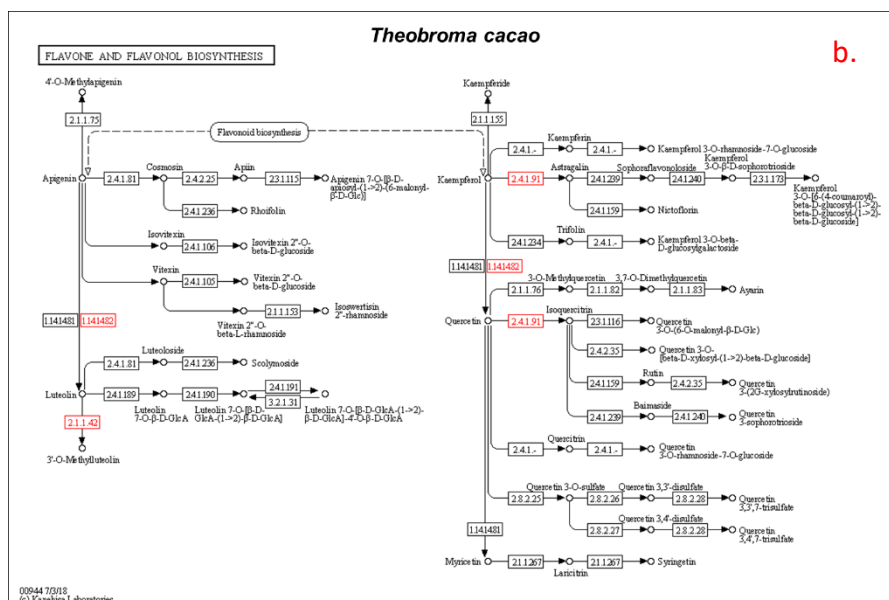
Tabla 3. Código Ec (Enzyme Commission) de las proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides.

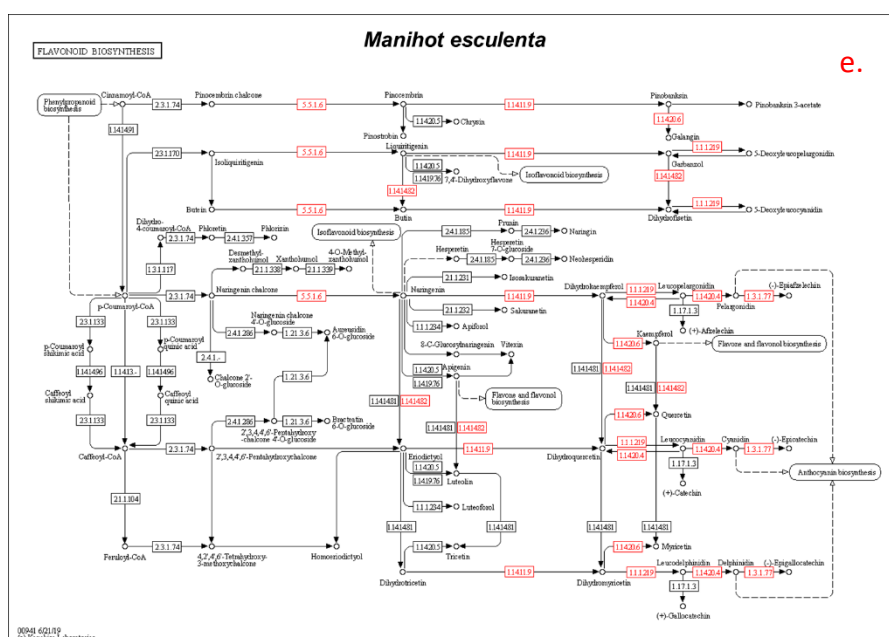
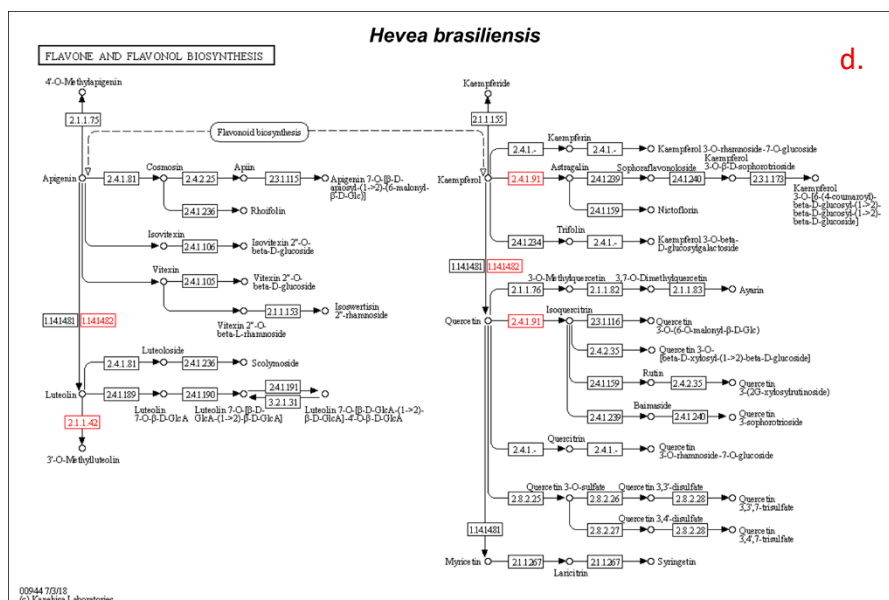
Código EC	Nombre completo Proteína
4.2.1.76	Trifunctional UDP-glucose 4,6-dehydratase/UDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose 3,5-epimerase/UDP-4-keto-L-rhamnose-reductase RHM3
2.3.1.	Type III polyketide synthase B
5.5.1.6	Probable chalcone--flavanone isomerase 3
2.4.1.173	Sterol 3-beta-glucosyltransferase UGT80B1
4.2.1.76	Trifunctional UDP-glucose 4,6-dehydratase/UDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose 3,5-epimerase/UDP-4-keto-L-rhamnose-reductase RHM2
4.2.1.76	Trifunctional UDP-glucose 4,6-dehydratase/UDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose 3,5-epimerase/UDP-4-keto-L-rhamnose-reductase RHM1
1.14.14.18	Heme oxygenase 1, chloroplastic
5.1.3.6	UDP-glucuronate 4-epimerase 4
3.13.2.1	Adenosylhomocysteinase 2
5.5.1.6	Chalcone-flavonone isomerase family protein
1.14.14.82	Flavonoid 3'-monooxygenase
2.1.1.42	Flavone 3'-O-methyltransferase 1
6.2.1.12	4-coumarate--CoA ligase-like 3
3.2.1.4	Endoglucanase 6
2.4.1.	Fucosyltransferase 3
4.6.1.19	Ribonuclease 1
1.14.	Cytochrome P450 98A3
1.1.1.	Protein BRI1-5 ENHANCED 1
1.14.11.9	Naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase
1.14.11.	Protein DOWNY MILDEW RESISTANCE 6
5.5.1.6	Chalcone--flavanone isomerase 2
1.3.1.77	Anthocyanidin reductase
2.4.1.	UDP-glycosyltransferase 90A1
2.3.1.	Type III polyketide synthase C
2.4.1.	UDP-glycosyltransferase 75C1
1.14.20.4	Leucoanthocyanidin dioxygenase
1.14.20.6	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase
2.4.1.	UDP-glycosyltransferase 78D4

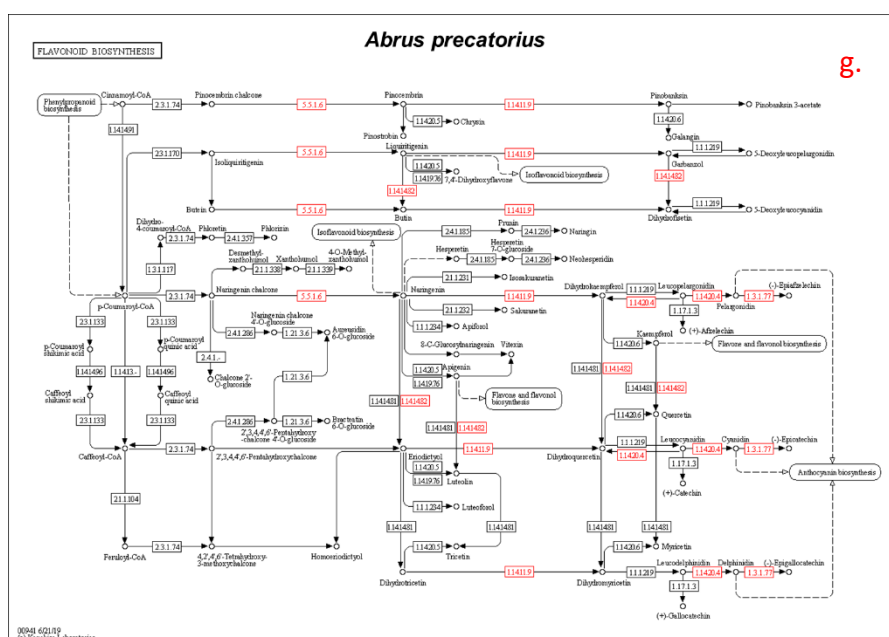
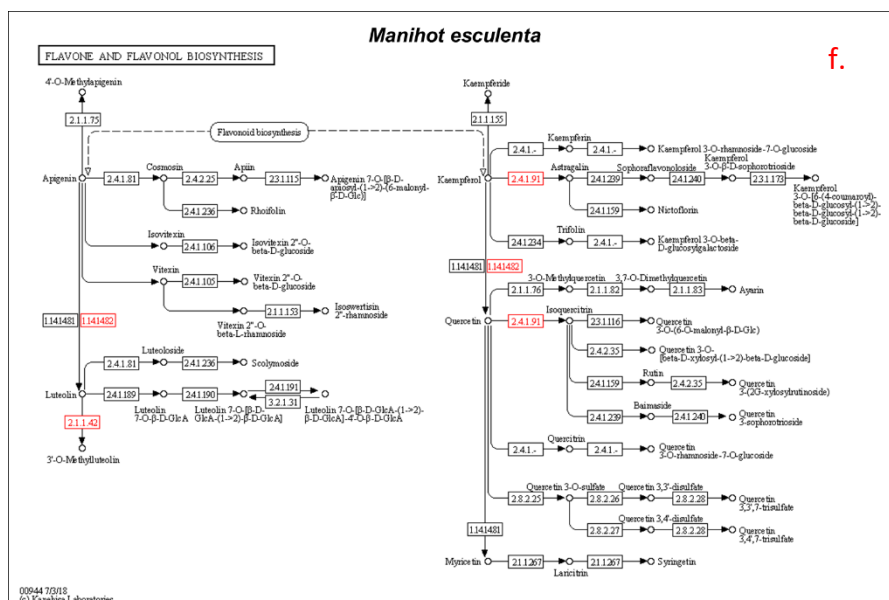
2.4.1.91	Flavonol 3-O-glucosyltransferase
2.4.2.51	Anthocyanidin 3-O-glucoside 2'''-O-xylosyltransferase
2.3.1.	Type III polyketide synthase A
2.4.1.	Flavonol 7-O-rhamnosyltransferase
2.4.1	Flavonol-3-O-rhamnosyltransferase
2.4.1.	UDP-glycosyltransferase 78D3
1.1.1.219	Dihydroflavonol 4-reductase
1.10.3.2	Laccase-15
1.14.20.6	Probable flavonol synthase 4
2.4.1.91	UDP-glycosyltransferase 73B5
2.4.1.91	UDP-glycosyltransferase 73B4
2.4.1.	UDP-glycosyltransferase 73C6
2.4.1.120	UDP-glycosyltransferase 84A2
2.3.1.172	Malonyl-CoA:anthocyanidin 5-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase
2.4.1.	UDP-glycosyltransferase 73B3
2.4.1.237	UDP-glucosyl transferase 73B2
2.4.1.	UDP-glycosyltransferase 73B1
1.14.20.6	Flavonol synthase 3
1.14.20.6	Probable flavonol synthase 5
1.14.20.6	Probable flavonol synthase 6
2.3.1.74	Chalcone synthase

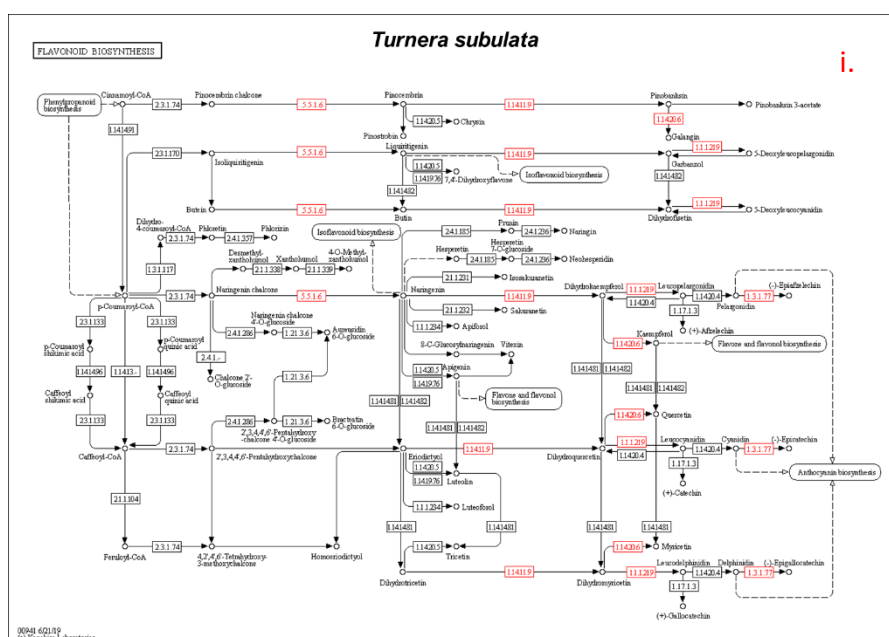
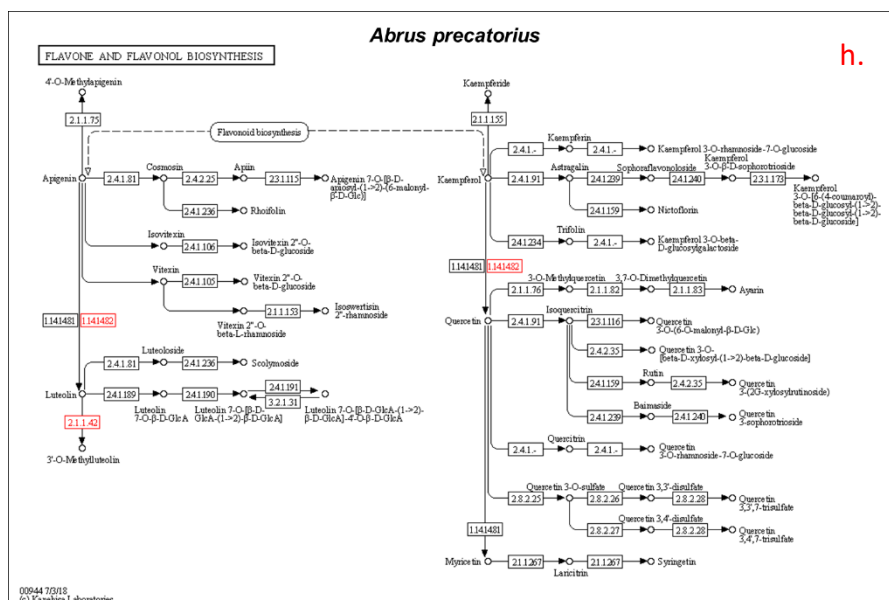
Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

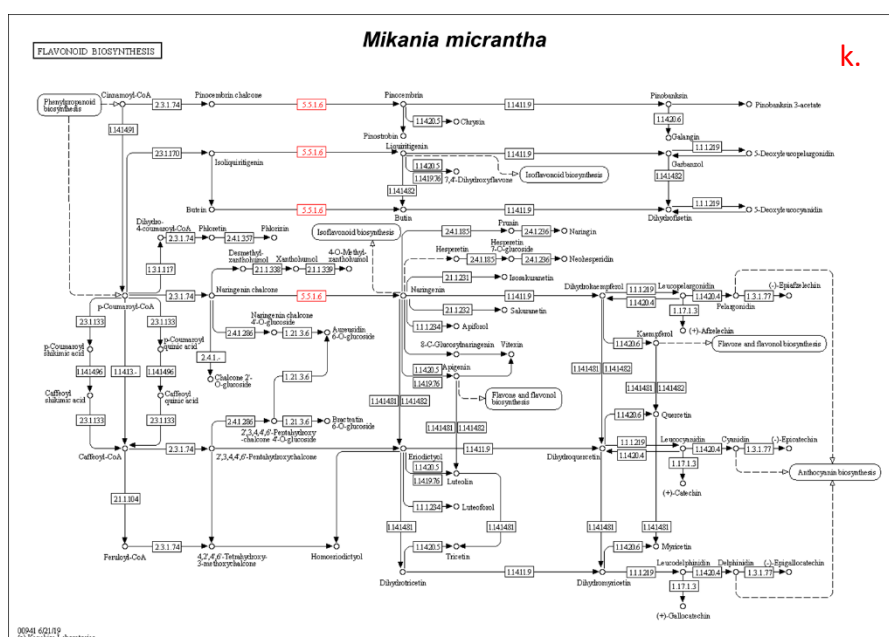
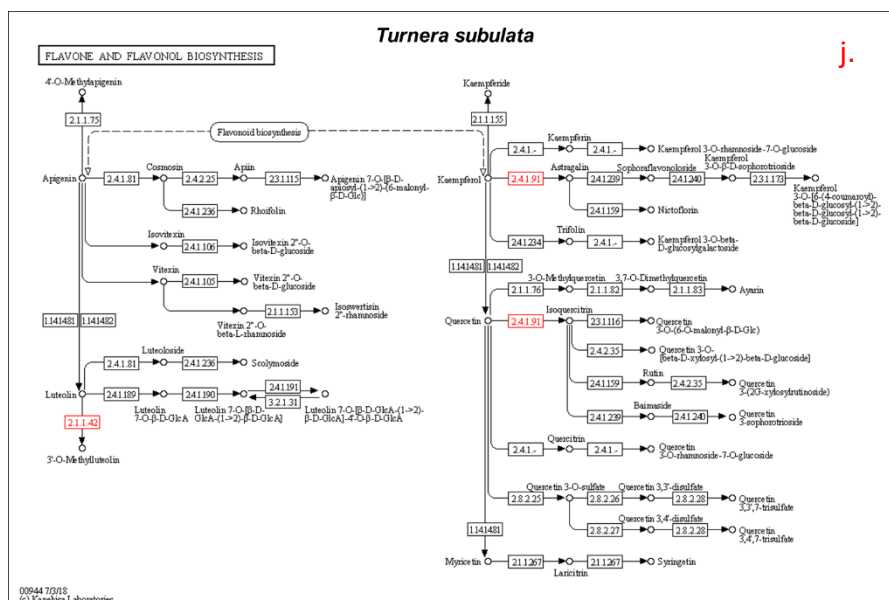


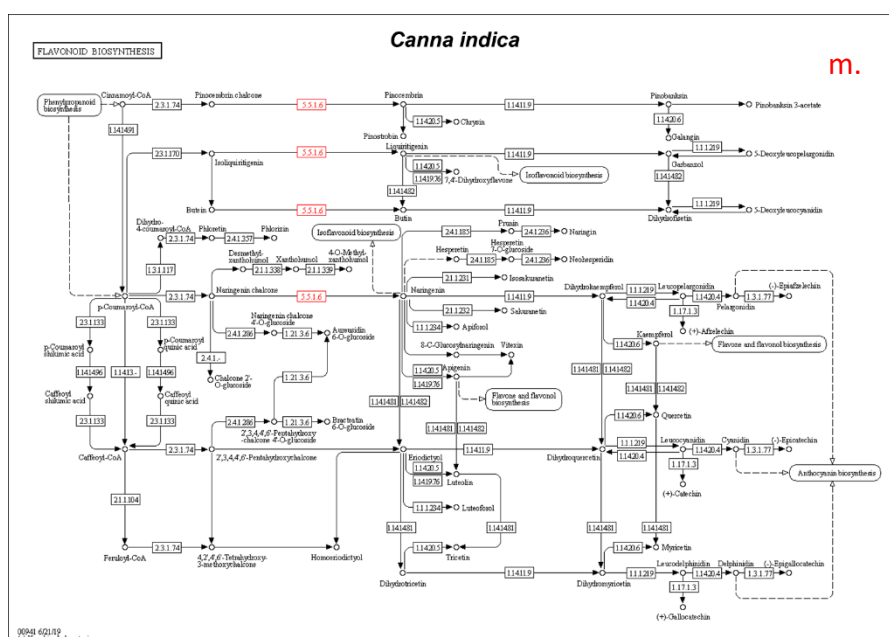
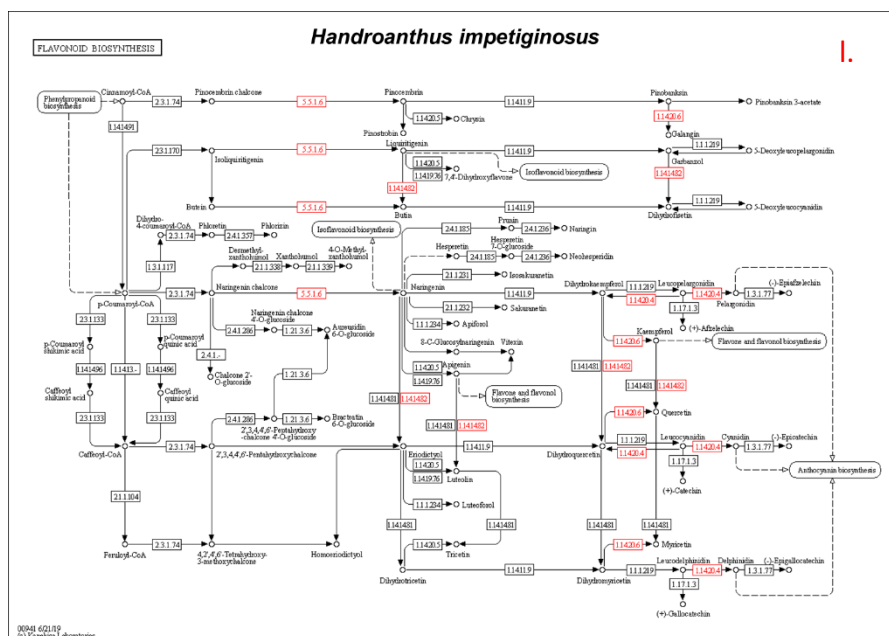




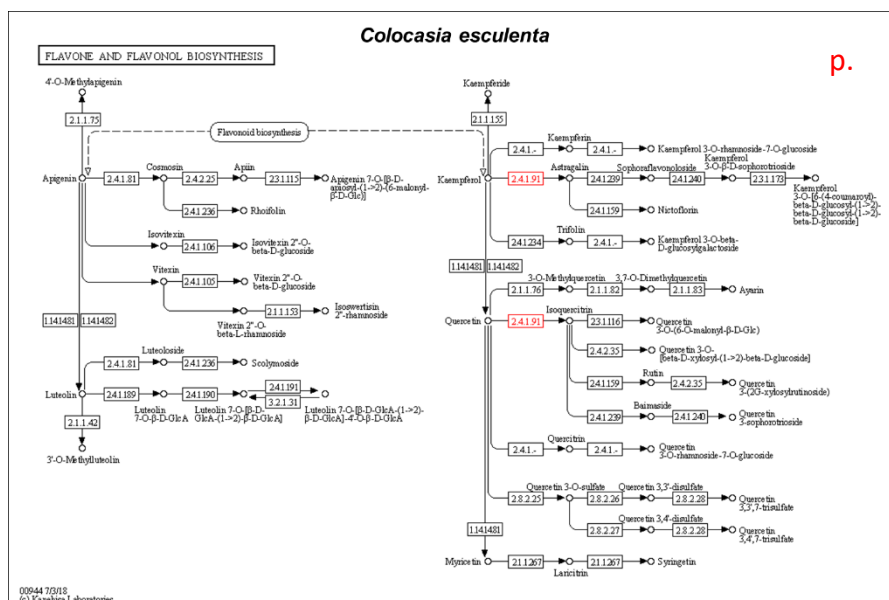




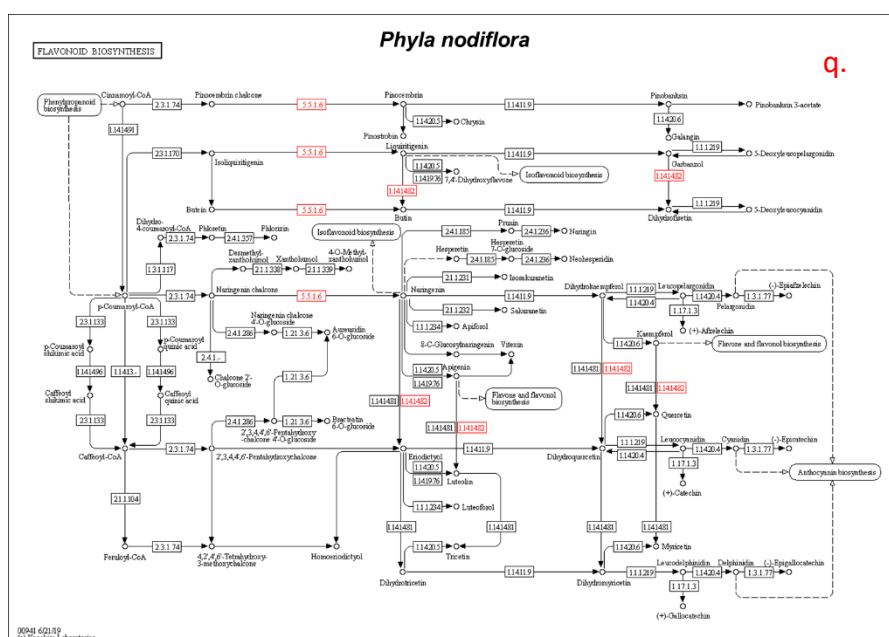








p.



q.

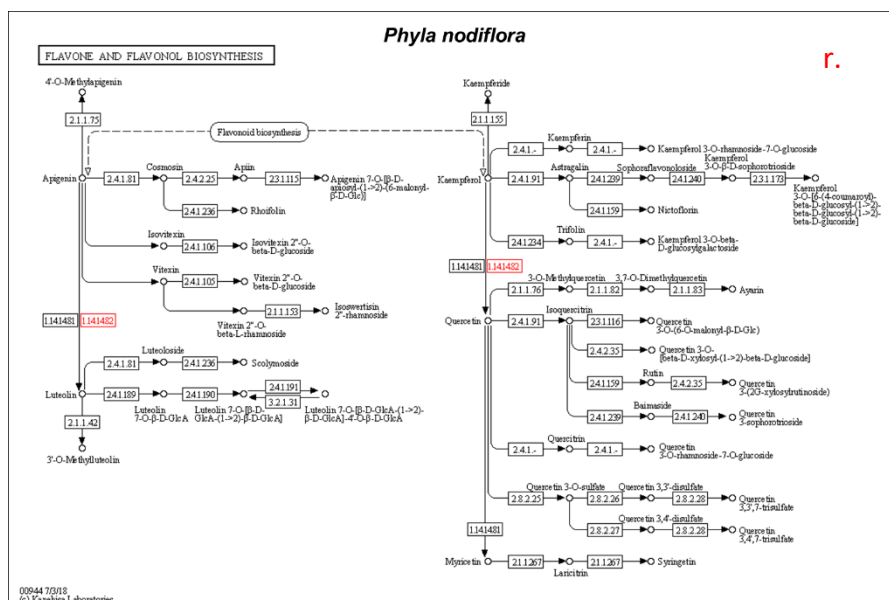


Figura 2. Rutas metabólicas asociadas a las biosíntesis de flavonoides en las especies vegetales.

- a. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Theobroma cacao*
- b. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavona y flavonol en *Theobroma cacao*
- c. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Hevea brasiliensis*
- d. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavona y flavonol en *Hevea brasiliensis*
- e. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Manihot esculenta*
- f. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavona y flavonol en *Manihot esculenta*
- g. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Abrus precatorius*
- h. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavona y flavonol en *Abrus precatorius*
- i. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Turnera subulata*
- j. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavona y flavonol en *Turnera subulata*
- k. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Mikania micrantha*
- l. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Handroanthus impetiginosus*
- m. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Canna indica*
- n. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Spirodela intermedia*
- o. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Vassobia dichotoma*
- p. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavona y flavonol en *Colocasia esculenta*
- q. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides en *Phyla nodiflora*
- r. Ruta metabólica de la biosíntesis de flavona y flavonol en *Phyla nodiflora*

Desarrollo de proteínas estructurales mediante modelado 3D

Tipos de flavonoides en las especies vegetales amazónicas encontradas

Los resultados de la revisión bibliográfica sobre los tipos de flavonoides presentes en las especies vegetales amazónicas identificadas se resumen en la Tabla 4, que incluye las categorías de flavonoides, los compuestos químicos predominantes y las plantas en las que se encontraron, junto con las referencias pertinentes.

Entre las plantas amazónicas estudiadas, los flavanoles y flavonoles emergen como los metabolitos más frecuentemente reportados. Los flavanoles, que engloban catequinas, procianidinas y epicatequinas, fueron identificados en *Theobroma cacao*, *Canna indica*, *Manihot esculenta* y *Handroanthus impetiginosus*. Por otro lado, los flavonoles como quercetina, rutina, kaempferol y laricitrina se encontraron en especies como *Hevea brasiliensis*, *Mikania micrantha*, *Vassobia dichotoma*, *Turnera subulata*, *Phylla nodiflora* y *Abrus precatorius*.

Estos resultados son consistentes con estudios previos que examinan los componentes bioactivos principales de las plantas amazónicas más estudiadas, destacando los flavonoles y flavanoles, específicamente catequinas, epicatequinas, quercetina y kaempferol (Avila-Sosa et al., 2019).

Además, existe evidencia científica que respalda la participación de estos metabolitos secundarios, como los flavanoles y flavonoles, en la síntesis verde de nanopartículas metálicas. Por ejemplo, estudios han demostrado la capacidad de extractos de plantas ricas en flavonoles, como *Clitoria ternatea*, para sintetizar nanopartículas de oro y óxido de cobalto (Sa et al., 2024). De manera similar, se han sintetizado nanopartículas de Ag_2O utilizando extractos de *Opuntia humifusa*, que contiene catequinas (Zareiyan & Khajehsharifi, 2023), subrayando así el potencial de estos metabolitos para síntesis verde nanopartículas.

Tabla 4. Tipos de flavonoides de las especies vegetales amazónicas encontradas

Categoría	Químico principal	Planta amazónica	Referencias
FLAVANOLES	Catequinas Procianidinas Epicatequinas	<i>Theobroma cacao</i>	(Cádiz-Gurrea et al., 2014; de la Luz Cádiz-Gurrea et al., 2019)
		<i>Canna indica</i>	(Kumbhar et al., 2018)
		<i>Manihot esculenta</i>	(Lima et al., 2017)

		<i>Handroanthus impetiginosus</i>	(Shang et al., 2022)
FLAVONOLES	Quercetina Rutina Kaempferol Laricitrina	<i>Hevea brasiliensis</i>	(Oleinik et al., 2022; Zuraida Wan Mohd Zain et al., 2021)
		<i>Mikania micrantha</i>	(Pereira Feitosa et al., 2021)
		<i>Manihot esculenta</i>	(Lima et al., 2017)
		<i>Vassobia dichotoma</i>	(Berardi et al., 2016)
		<i>Turnera subulata</i>	(Saravanan et al., 2018)
		<i>Phyla nodiflora</i>	(Lin et al., 2014)
		<i>Abrus precatorius</i>	(Gul et al., 2013)
FLAVONOIDES	Apigenina Luteolina Vitexina	<i>Spirodela intermedia</i>	(Baek et al., 2021)
		<i>Colocasia esculenta</i>	(Leong et al., 2010)

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

Enzimas clave para la síntesis de los metabolitos seleccionados

Las enzimas seleccionadas para este estudio fueron escogidas por su participación crucial en la síntesis de los metabolitos flavonoles y flavanoles. Estas enzimas son: Flavonol sintasa (FLS), Dihydroflavonol 4-reductasa (DFR), Anthocyanidin reductase (ANR) y Chalcona isomerasa (CHI).

De acuerdo con la ruta metabólica estándar para la síntesis de flavonoides en plantas (Figura 1), se identificaron estas cuatro enzimas clave para la síntesis de flavonoles y flavanoles. La Flavonol sintasa (FLS) es responsable de convertir los dihydroflavonoles en flavonoles, tales como kaempferol, quercetina y miricetina (Chen et al., 2023), la inhibición de la expresión de FLS resulta en una significativa reducción del contenido de flavonoles, lo que subraya su importancia en esta vía metabólica (Anwar et al., 2019). Por otro lado, la Dihydroflavonol 4-reductasa (DFR) es esencial para la síntesis de flavanoles, o flavan-3-oles. En plantas donde se silencia el gen DFR, se observa una

marcada disminución en los niveles de flavanoles, lo que indica su papel crítico en la biosíntesis de estos metabolitos (L. Wang et al., 2016).

La antocianidina reductasa (ANR) cataliza la conversión de antocianidinas (como la cianidina, delphinidina y pelargonidina) en los correspondientes flavan-3-oles (como catequina y epicatequina), este proceso es fundamental para la acumulación de flavanoles en las plantas (L. Wang et al., 2016). Por último, la Chalcona isomerasa (CHI) desempeña un papel determinante en la vía de los flavonoides, catalizando la reacción reversible que convierte las chalconas en flavanonas. La expresión de CHI se correlaciona positivamente con el contenido de flavonoides en las plantas, destacando su función como una de las principales enzimas limitantes de la velocidad en esta ruta biosintética (Liu et al., 2021).

Proteínas de las especies vegetales amazónicas seleccionadas para la predicción de estructuras

Las proteínas de *Arabidopsis thaliana* involucradas en la biosíntesis de flavonoides que coinciden con los nombres de las enzimas identificadas en el apartado anterior, se detallan en la Tabla 5. Con base en los resultados del análisis BLAST, se seleccionaron cuatro proteínas homólogas en las plantas amazónicas seleccionadas para la predicción de su estructura tridimensional, como se detalla en la Tabla 6. Las plantas seleccionadas fueron aquellas que presentaron la mayor cantidad de proteínas ortólogas (Tabla 2), concretamente *Theobroma cacao*, *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* y *Abrus precatorius*.

La Tabla 6 presenta las cuatro proteínas seleccionadas para la predicción de estructuras tridimensionales y las plantas amazónicas de las cuales provienen. Estas enzimas son altamente conservadas entre las especies vegetales debido a su papel crucial en las rutas biosintéticas de los flavonoides. Estudios filogenéticos y de alineación de secuencias de aminoácidos demuestran que la Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa muestra una alta conservación en sus sitios de unión de 2-oxoglutarato y hierro, esenciales para su

actividad catalítica entre diversas especies (Ma et al., 2023). De manera similar, la Dihydroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa y la Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) desempeñan funciones cruciales en la síntesis de flavonoides, particularmente en la formación de flavanoles, lo que sugiere una conservación significativa en su secuencia de aminoácidos y estructura funcional (Hammerbacher et al., 2019). Asimismo, la proteína probable Chalcone--flavanone isomerase 3 es fundamental en la isomerización de chalconas a flavanonas, un paso crucial en la biosíntesis de flavonoides. La conservación de esta enzima entre diferentes especies ha sido ampliamente documentada, indicando su importancia evolutiva y funcional en la ruta metabólica de los flavonoides (Waki et al., 2020).

Tabla 5. Proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides en *A. thaliana* coincidentes con las enzimas seleccionadas

Código UniProt	Nombre completo Proteína	Cont.
Q8VZW3	Probable chalcone--flavanone isomerase 3	9
Q96330	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	5
Q9SEV0	Anthocyanidin reductase	5
P51102	Dihydroflavonol 4-reductase	4

*cont: número de especies vegetales amazónicas encontradas.

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

Tabla 6. Proteínas seleccionadas para la predicción de estructura

Código Uniprot	Nombre completo Proteína	Planta amazónica
A0A2C9WEF6	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	<i>Manihot esculenta</i>
A0A061FCN8	Bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase	<i>Theobroma cacao</i>
A0A8B8KWY7	Anthocyanidin reductase ((2S)-flavan-3-ol-forming)	<i>Abrus precatorius</i>
A0A6A6M0B1	Chalcone-flavanone isomerase family protein	<i>Hevea brasiliensis</i>

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas de interés para la inferencia de su función

Construcción de modelos tridimensional

La estructura tridimensional de las proteínas de interés fue determinada mediante I-TASSER, el cual generó cinco modelos utilizando estructuras "plantilla" obtenidas del Protein Data Bank (PDB). Cada modelo generado estuvo acompañado por un C-score, que representa la confianza en la predicción de la estructura tridimensional. Este C-score se calcula considerando el Z-score de los alineamientos automáticos realizados por el programa LOMETS y la densidad de clusters obtenida de las simulaciones de I-TASSER. Los puntajes de C-score generalmente varían entre -5 y 2; puntajes más altos indican modelos de mayor calidad. Es decir, los modelos con un C-score > -1.5 tienen una alta precisión (Yang & Zhang, 2015).

Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [Manihot esculenta]

En el caso de la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*], se evaluaron cuatro modelos tridimensionales generados por I-TASSER. El modelo 1 (Figura 3) destacó con un alto C-score de 1.54, indicativo de una estructura predicha altamente confiable, lo que sugiere una aproximación precisa a la conformación tridimensional de la proteína. Por el contrario, los modelos 2, 3 y 4 exhibieron C-scores significativamente más bajos, registrando valores de -5, lo que revela una baja confiabilidad en sus estructuras predichas.

En la Tabla 7 se puede observar el top 10 de las plantillas utilizadas por I-TASSER para la construcción del modelo tridimensional; es notable que siete de las diez plantillas principales corresponden a una Leucoantocianidina dioxigenasa, enzimas dependientes de Fe(II)/2-oxoglutarato conocidas por su papel central en la síntesis de flavonoides (Liu et al., 2021).

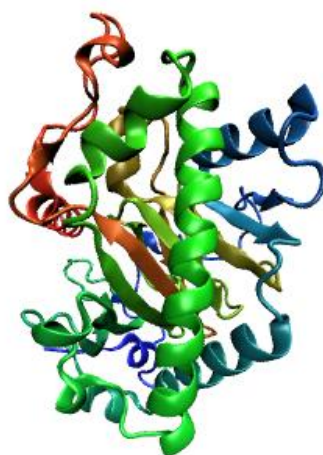


Figura 3. Modelo 3D N°1 de Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*] con el C-score más alto de 1.54

Tabla 7. Top 10 de las plantillas utilizadas para la construcción de los modelos 3D de la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*]

Rango	PDB Hit	IDEN1	IDEN2	COV	Norm. Z-score	Descripción
1	6lsvA	0,38	0,37	0,95	4,39	Probable dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato At5g05600
2	7ekdA	0,29	0,30	0,96	5,13	Giberelina 3-beta-dioxigenasa 2
3	1gp6	0,41	0,43	0,99	2,87	Leucoantocianidina dioxigenasa
4	1gp6	0,41	0,43	0,99	2,11	Leucoantocianidina dioxigenasa
5	1gp6A	0,41	0,43	0,99	5,21	Leucoantocianidina dioxigenasa
6	1gp6	0,41	0,43	0,98	3,19	Leucoantocianidina dioxigenasa
7	6jyvA	0,28	0,26	0,86	5,93	Probable hierro/ascorbato oxidorreductasa
8	1gp6A	0,42	0,43	0,99	5,74	Leucoantocianidina dioxigenasa
9	7ekdA	0,29	0,3	0,96	5,09	Giberelina 3-beta-dioxigenasa 2
10	6lsvA	0,39	0,37	0,96	7,74	Probable dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato At5g05600

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

Iden1: porcentaje de identidad de las plantillas en la región alineada con la secuencia de consulta.

Iden2: porcentaje de identidad de todas las cadenas de plantillas con la secuencia de consulta.

Cov: cobertura de la alineación, calculada como el número de residuos alineados dividido por la longitud de la proteína de consulta.

Norm.Z-score: puntuación Z normalizada de las alineaciones. Una puntuación >1 indica una buena alineación, y viceversa.

Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [Theobroma cacao]

Para la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*], se analizaron cinco modelos tridimensionales generados por I-TASSER. Entre estos, el modelo 1 (Figura 4) destacó por tener el C-score más alto, con un valor de 0.74. En contraste, los modelos 2, 3, 4 y 5 presentaron C-scores de -1.51, -3.32, -3.16 y -4.64, respectivamente. Estos resultados indican que el modelo 1 es la conformación tridimensional más confiable de la proteína, reflejando una mayor precisión y fiabilidad en su predicción estructural.

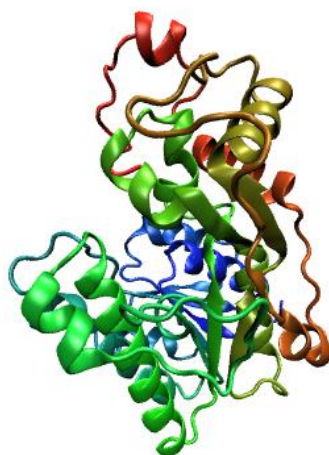


Figura 4. Modelo 3D N°1 de Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*]

La Tabla 8 presenta el top 10 de las plantillas utilizadas por I-TASSER para la construcción del modelo tridimensional de la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*]. En esta tabla se puede ver claramente que la construcción del modelo se basó en proteínas reductasas, específicamente la Dihidroflavonol 4-reductasa, una enzima que interviene en la biosíntesis de flavonoides (Petit et al., 2007).

Tabla 8. Top 10 de las plantillas utilizadas para la construcción de los modelos 3D de la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*]

Rango	PDB Hit	IDEN1	IDEN2	COV	Norm. Z-score	Descripción
1	2c29A	0,82	0,77	0,94	4,90	Dihidroflavonol 4-reductasa
2	8femA	0,68	0,64	0,94	3,93	Dihidroflavonol 4-reductasa
3	2c29	0,82	0,77	0,94	0,81	Dihidroflavonol 4-reductasa
4	5gmo	0,26	0,27	0,90	0,77	Proteína inducida por estrés osmótico.
5	2c29F	0,82	0,77	0,94	3,72	Dihidroflavonol 4-reductasa
6	2c29D	0,82	0,77	0,94	7,09	Dihidroflavonol 4-reductasa
7	4qtzA	0,432	0,39	0,92	3,10	Dihidroflavonol 4-reductasa
8	8femA	0,68	0,64	0,94	3,81	Dihidroflavonol 4-reductasa
9	4qtzA	0,42	0,39	0,92	4,83	Dihidroflavonol 4-reductasa
10	8femA	0,68	0,64	0,94	4,66	Dihidroflavonol 4-reductasa

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

Iden1: porcentaje de identidad de las plantillas en la región alineada con la secuencia de consulta.

Iden2: porcentaje de identidad de todas las cadenas de plantillas con la secuencia de consulta.

Cov: cobertura de la alineación, calculada como el número de residuos alineados dividido por la longitud de la proteína de consulta.

Norm.Z-score: puntuación Z normalizada de las alineaciones. Una puntuación >1 indica una buena alineación, y viceversa.

Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [Abrus precatorius]

Para la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [*Abrus precatorius*], se generaron cinco modelos tridimensionales utilizando I-TASSER. El modelo 1 (Figura 5) obtuvo un C-score de -0.21, lo cual indica una estructura predicha con confiabilidad moderada y sugiere una aproximación cercana a la conformación tridimensional real de la proteína. En contraste, los modelos 2, 3, 4 y 5 presentaron C-scores de -0.56, -2.71, -1.09, y -0.56, respectivamente. Estos valores más bajos reflejan una menor confiabilidad en sus estructuras predichas. Por lo tanto, el modelo 1 se destaca como la conformación tridimensional más precisa y confiable de la proteína, superando en precisión a los demás modelos generados

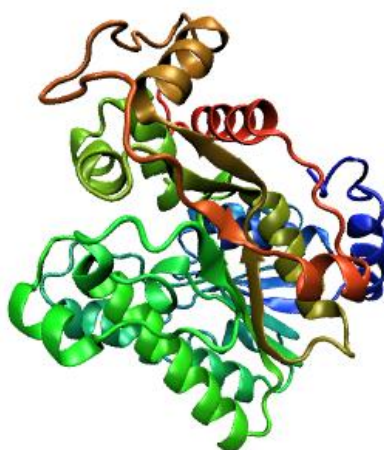


Figura 5. Modelo 3D N°1 de Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [*Abrus precatorius*]

En la Tabla 9 se presenta el top 10 de las plantillas utilizadas por I-TASSER para la construcción del modelo tridimensional de la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) de *Abrus precatorius*. La mayoría de estas plantillas son enzimas reductasas que participan en la biosíntesis de flavonoides, como la dihidroflavonol 4-reductasa y la antocianidina reductasa. Esta selección de plantillas sugiere que la proteína en estudio probablemente comparte una estructura similar con estas enzimas.

Tabla 9. Top 10 de las plantillas utilizadas para la construcción de los modelos 3D de la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [*Abrus precatorius*]

Rango	PDB Hit	IDEN1	IDEN2	COV	Norm. Z-score	Descripción
1	2c29A	0,44	0,41	0,91	4,70	Dihidroflavonol 4-reductasa
2	8fetA	0,45	0,44	0,93	3,70	3-desoxiantocianidina sintasa
3	3lu1	0,17	0,20	0,91	0,81	WbgU isomerasa
4	5gmo	0,24	0,22	0,88	0,75	Proteína inducida por estrés osmótico.
5	2c29F	0,45	0,42	0,91	3,32	Dihidroflavonol 4-reductasa
6	3hfs	0,77	0,70	0,89	0,96	Antocianidina reductasa
7	2c29D	0,45	0,41	0,91	6,10	Dihidroflavonol 4-reductasa
8	4qtzA	0,39	0,37	0,90	2,94	Dihidroflavonol 4-reductasa
9	8fetA	0,45	0,44	0,93	3,92	3-desoxiantocianidina sintasa
10	4qtzA	0,39	0,37	0,90	4,82	Dihidroflavonol 4-reductasa

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

Iden1: porcentaje de identidad de las plantillas en la región alineada con la secuencia de consulta.

Iden2: porcentaje de identidad de todas las cadenas de plantillas con la secuencia de consulta.

Cov: cobertura de la alineación, calculada como el número de residuos alineados dividido por la longitud de la proteína de consulta.

Norm.Z-score: puntuación Z normalizada de las alineaciones. Una puntuación >1 indica una buena alineación, y viceversa.

Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [Hevea brasiliensis]

La estructura tridimensional de la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*] se puede observar en la Figura 6. Entre los cinco modelos generados por I-TASSER, el modelo 1 fue elegido por tener el C-score más alto (-2.30), lo que sugiere una confiabilidad media en la construcción del modelo tridimensional. Aunque esta confiabilidad es moderada, es superior a la de los modelos 2, 3, 4 y 5, que obtuvieron C-scores de -2.56, -3.02, -2.86 y -3.23, respectivamente.

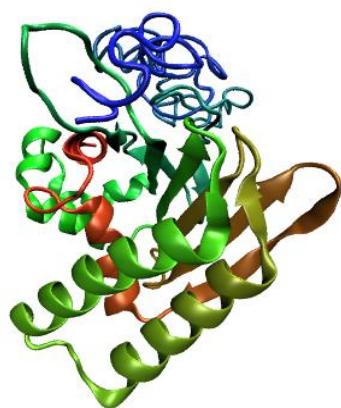


Figura 6. Modelo 3D N°1 de la Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*]

Los resultados presentados en la Tabla 10 sobre las plantillas utilizadas para la construcción de los modelos 3D de la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*] revelan varios aspectos importantes. En primer lugar, el alto porcentaje de identidad en la región alineada (IDEN1) y en todas las cadenas de plantillas con la secuencia de consulta (IDEN2), con valores de 0.80 y 0.61 respectivamente, indica que las plantillas seleccionadas comparten una alta similitud con la proteína de interés. Los valores de la puntuación Z normalizada (Norm. Z-score), que varían entre 2.17 y 5.14, son indicativos de alineaciones robustas y confiables, con puntuaciones superiores a 1 confirmando una buena alineación. La alta similitud y cobertura de las plantillas utilizadas, junto con las puntuaciones Z normalizadas robustas, indican que las estructuras modeladas de esta proteína son altamente confiables (Yang & Zhang, 2015).

Tabla 10. Top 10 de las plantillas utilizadas para la construcción de los modelos 3D de la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*]

Rango	PDB Hit	IDEN1	IDEN2	COV	Norm. Z-score	Descripción
1	8dlcA	0,80	0,61	0,76	3,45	Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa
2	8dlcA	0,80	0,61	0,76	2,78	Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa

3	8dlc	0,80	0,61	0,76	3,68	Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa
4	8dlc	0,79	0,61	0,75	2,71	Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa
5	4dokA	0,69	0,53	0,75	2,98	Similitud con la calcona-flavonona isomerasa
6	8dlc	0,79	0,61	0,75	4,17	Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa
7	4dokA	0,68	0,53	0,76	4,39	Similitud con la calcona-flavonona isomerasa
8	4dokA	0,69	0,53	0,76	2,17	Similitud con la calcona-flavonona isomerasa
9	8dlcA	0,80	0,61	0,76	2,76	Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa
10	4dokA	0,69	0,53	0,76	5,14	Similitud con la calcona-flavonona isomerasa

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

Iden1: porcentaje de identidad de las plantillas en la región alineada con la secuencia de consulta.

Iden2: porcentaje de identidad de todas las cadenas de plantillas con la secuencia de consulta.

Cov: cobertura de la alineación, calculada como el número de residuos alineados dividido por la longitud de la proteína de consulta.

Norm.Z-score: puntuación Z normalizada de las alineaciones. Una puntuación >1 indica una buena alineación, y viceversa.

Proteínas estructuralmente similares a la proteína objetivo

Estructuras similares a Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [Manihot esculenta]

Las cinco proteínas más similares a la Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*], identificadas mediante I-TASSER y comparadas estructuralmente utilizando TM-align, se encuentran listadas en la Tabla 11. La proteína 1gp6A, con un TM-score de 0.977 y un RMSD de 0.73, muestra una fuerte similitud estructural con la Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*]. Esta proteína es una

leucoantocianidina dioxigenasa, una enzima clave en la síntesis de flavonoides (Liu et al., 2021).

La Tabla 11 revela que la mayoría de las proteínas similares a la Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*] son dioxigenasas. La superfamilia de dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2-OGD) es una de las familias de proteínas más grandes en plantas. Cuatro miembros de la superfamilia 2-OGD, es decir, flavanona 3 β -hidroxilasa (F3H), flavona sintasa I (FNS I), flavonol sintasa (FLS) y antocianidina sintasa (ANS)/leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX), están presentes en la vía de los flavonoides, catalizando reacciones de hidroxilación y desaturación (Y. Wang et al., 2021).

La similitud estructural con estas dioxigenasas sugiere que la Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*] desempeña una función similar en la biosíntesis de flavonoides, catalizando reacciones críticas en esta ruta metabólica.

La Figura 7 muestra una representación gráfica del ensamblaje entre la proteína 1gp6A y la Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*]. Se eligió la proteína 1gp6A como plantilla debido a su alto TM-score (0.977). La estructura de la proteína objetivo se visualiza mediante el modelo 3D N°1 generado por I-TASSER, mientras que la estructura análoga seleccionada se presenta como un rastreo en color plateado sobre la estructura objetivo.

Tabla 11. Estructuras de PDB similares a la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*]

Rango	PDB Hit	TM-score	RMSD	IDEN	COV	Descripción molécula
1	1gp6A	0,977	0,73	0,411	0,988	Leucoantocianidina dioxigenasa
2	6lsvA	0,920	1,78	0,376	0,961	Probable dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato At5g05600
3	5o7yA	0,894	2,17	0,294	0,964	Tebaína 6-O-desmetilasa

4	7ekdA	0,875	2,29	0,274	0,949	Giberelina 3-beta-dioxigenasa 2
5	4xaeA	0,862	2,49	0,339	0,943	Feruloil CoA ortohidroxilasa 1

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

TM-score: Puntaje de similitud estructural global entre la proteína de consulta y la plantilla. El rango va de (0-1], donde 1 indica una coincidencia perfecta entre dos estructuras.

RMSD: Similitud estructural entre dos proteínas. Un RMSD menor indica mayor similitud.

IDEN: Porcentaje de identidad de secuencia en la región alineada estructuralmente.

Cov: cobertura del alineamiento por TM-align

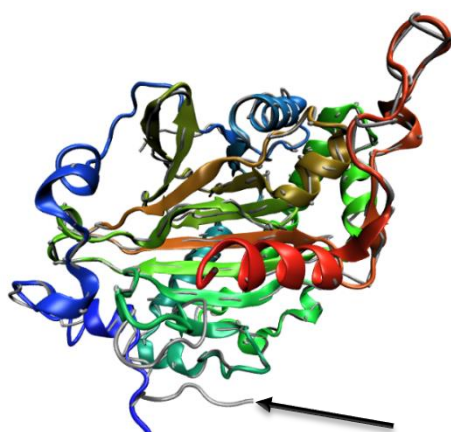


Figura 7. Demostración gráfica del ensamblaje de la proteína 1gp6A con la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*]

Estructuras similares a Dihydroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [Theobroma cacao]

Los resultados obtenidos mediante I-TASSER, utilizando el programa TM-align, para la comparación estructural de la Dihydroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*] se muestran en la Tabla 12.

El TM-score alto de la proteína 2c29F (0.938) y su bajo RMSD (0.580) sugieren una fuerte similitud estructural con la proteína Dihydroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona

4-reductasa [*Theobroma cacao*]. Esta proteína, identificada como dihidroflavonol 4-reductasa, es fundamental en la biosíntesis de flavonoides, específicamente en la conversión de dihidroflavonoles a leucoantocianidinas, que son precursores directos de las antocianinas, flavanoles y proantocianidinas (Ruan et al., 2022). La alta similitud estructural indica que la enzima de *Theobroma cacao* probablemente cumple una función similar.

Además, las otras proteínas identificadas (8femA, 8fetA, 4r1sA y 4qtzA) también muestran altos TM-scores, aunque con variaciones en el RMSD y la identidad de secuencia. Por ejemplo, la 3-desoxiantocianidina sintasa (8fetA) y la cinamoil CoA reductasa (4r1sA) tienen TM-scores de 0.877 y 0.868, respectivamente, lo que indica similitudes estructurales importantes, aunque menores en comparación con 2c29F.

La Figura 8 exhibe una representación gráfica del ensamblaje entre la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*] y la proteína 2c29F. Esta proteína fue seleccionada como plantilla debido a su alto TM-score (0.938). En la figura, se puede observar la estructura de la proteína objetivo representada por el modelo 3D N°1 generado por I-TASSER. Además, se muestra una visualización en color plateado de la estructura análoga seleccionada superpuesta a la estructura objetivo.

Tabla 12. Estructuras de PDB similares a la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*]

Rango	PDB Hit	TM-score	RMSD	IDEN	COV	Descripción molécula
1	2c29F	0,938	0,580	0,816	0,945	Dihidroflavonol 4-Reductasa
2	8femA	0,928	0,960	0,663	0,945	Dihidroflavonol 4-Reductasa
3	8fetA	0,877	1,800	0,439	0,930	3-desoxiantocianidina sintasa
4	4r1sA	0,868	1,910	0,415	0,916	cinamoil CoA reductasa
5	4qtzA	0,865	2,040	0,415	0,922	Dihidroflavonol-4-reductasa

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

TM-score: Puntaje de similitud estructural global entre la proteína de consulta y la plantilla. El rango va de (0-1], donde 1 indica una coincidencia perfecta entre dos estructuras.

RMSD: Similitud estructural entre dos proteínas. Un RMSD menor indica mayor similitud.

IDEN: Porcentaje de identidad de secuencia en la región alineada estructuralmente.

Cov: cobertura del alineamiento por TM-align

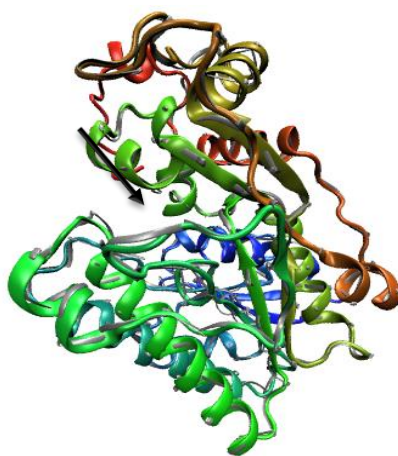


Figura 8. Demostración gráfica del ensamblaje de la proteína 2c29F con la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*]

Estructuras similares a Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol [Abrus precatorius]

Los resultados de la comparación estructural de la Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [*Abrus precatorius*] con proteínas de la PDB revelan varias estructuras similares, como se muestra en la Tabla 13. La proteína 8fetA obtuvo el TM-score más alto (0.897) y un RMSD de 1.54, lo que sugiere una alta concordancia estructural entre la proteína análoga y la objetivo. Con valores un poco más bajos están las proteínas 2c29F y la 8femA con TM-scores de 0.890 y 0.885 respectivamente. Estas proteínas similares incluyen la 3-desoxiantocianidina sintasa y varias dihidroflavonol 4-

reductasas, indicando una proximidad estructural y posiblemente funcional con la Antocianidina reductasa de *Abrus precatorius*.

Estos resultados destacan la posible función compartida entre la Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [*Abrus precatorius*] y las proteínas identificadas, todas las cuales están involucradas en vías metabólicas relacionadas con la biosíntesis de flavonoides al ser precursores de las antocianinas y los flavanoles (Ruan et al., 2022; Xiong et al., 2019).

La demostración gráfica del ensamblaje entre la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [*Abrus precatorius*] y la proteína 8fetA, se muestra en la Figura 9. La proteína 8fetA fue seleccionada como plantilla debido a que tiene el TM-score más alto (0.897). En la figura, se puede observar la estructura de la proteína objetivo representada por el modelo 3D N°1 generado por I-TASSER, mientras que la estructura análoga seleccionada se muestra en color plateado superpuesta a la estructura objetivo.

Tabla 13. Estructuras de PDB similares a la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [*Abrus precatorius*]

Rango	PDB Hit	TM-score	RMSD	IDEN	COV	Descripción molécula
1	8fetA	0,897	1,54	0,458	0,935	3-desoxiantocianidina sintasa
2	2c29F	0,890	1,05	0,445	0,909	Dihidroflavonol 4-Reductasa
3	8femA	0,885	1,35	0,418	0,915	Dihidroflavonol 4-Reductasa
4	4r1sA	0,846	1,81	0,347	0,889	cinamoil CoA reductasa
5	4qtzA	0,846	2,03	0,387	0,901	Dihidroflavonol-4-reductasa

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

TM-score: Puntaje de similitud estructural global entre la proteína de consulta y la plantilla. El rango va de (0-1], donde 1 indica una coincidencia perfecta entre dos estructuras.

RMSD: Similitud estructural entre dos proteínas. Un RMSD menor indica mayor similitud.

IDEN: Porcentaje de identidad de secuencia en la región alineada estructuralmente.

Cov: cobertura del alineamiento por TM-align

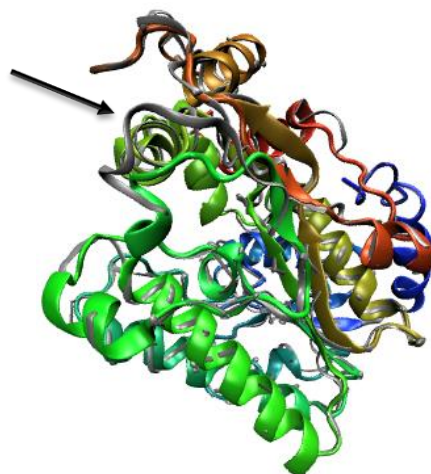


Figura 9. Demostración gráfica del ensamblaje de la proteína 8fetA con la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol) [*Abrus precatorius*]

Estructuras similares a la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [Hevea brasiliensis]

Los resultados de la comparación estructural entre la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*] y varias estructuras de la PDB, se detallan en la Tabla 14. La proteína 8dlcA destacó con el TM-score más alto de 0.751 y un RMSD de 0.60, seguida por la proteína 4dokA con un TM-score de 0.746 y un RMSD de 0.83. Estos resultados indican que estas dos proteínas son las más similares a la Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*]. Todas las proteínas mencionadas en la Tabla 14 muestran una estrecha relación con la enzima calcona-flavonona isomerasa, la cual desempeña un papel crucial en la síntesis de flavonoides, incluyendo la producción de proantocianidinas y flavonoles (Jiang et al., 2015).

La Figura 10 presenta visualmente el ensamblaje entre la proteína 8dlcA y la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*]. En esta representación gráfica se puede apreciar una notable similitud estructural entre la proteína de interés (representada por el Modelo 3D N°1 generado por I-Tasser) y la proteína análoga 8dlcA, la cual está superpuesta en color plateado sobre la estructura objetivo.

Tabla 14. Estructuras de PDB similares a la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*]

Rango	PDB Hit	TM-score	RMSD	IDEN	COV	Descripción molécula
1	8dlcA	0,751	0,60	0,802	0,758	Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa
2	4dokA	0,746	0,83	0,691	0,758	Similitud con la calcona-flavonona isomerasa
3	5wkrA	0,699	2,56	0,502	0,766	Isomerasa de calcona diseñada ancCC
4	4doiA	0,693	2,04	0,296	0,747	Calcona--flavonona isomerasa 1
5	5yx4A	0,688	2,14	0,284	0,747	Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

TM-score: Puntaje de similitud estructural global entre la proteína de consulta y la plantilla. El rango va de (0-1], donde 1 indica una coincidencia perfecta entre dos estructuras.

RMSD: Similitud estructural entre dos proteínas. Un RMSD menor indica mayor similitud.

IDEN: Porcentaje de identidad de secuencia en la región alineada estructuralmente.

Cov: cobertura del alineamiento por TM-align

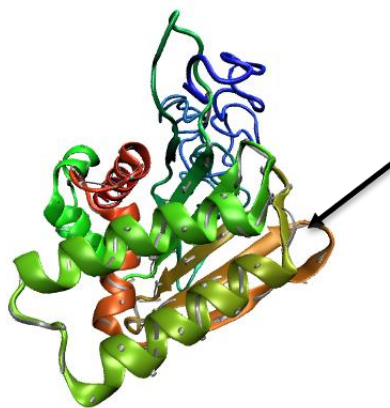


Figura 10. Demostración gráfica del ensamblaje de la proteína 8dlcA con la Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*]

Función prevista de las proteínas

*Función prevista de Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*]*

Los resultados del servidor I-Tasser, utilizando los programas COFACTOR y COACH, revelaron cinco sitios de unión en la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*], como se detalla en la Tabla 15. El ligando con la más alta confianza de predicción (C-score de 0.68) identificado en estos sitios es el Ácido 2-oxoglutámico (AKG), el cual se une en un total de 11 sitios específicos en la proteína. Este resultado sugiere que la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*] probablemente sea una dioxigenasa dependiente del Ácido 2-oxoglutámico.

Por otro lado, en la Tabla 16 se presenta la predicción de los números EC para la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*]. El número EC 1.14.11.19 destaca con el C-score más alto y un TM-score cercano a 1. Este número EC proporciona información relevante sobre la enzima, identificándola como antocianidina sintasa/leucoantocianidina oxigenasa/2-oxoglutarato oxidoreductasa, la cual juega un papel crucial en la vía metabólica de los flavonoides.

Estos resultados ofrecen una comprensión detallada de la función y el mecanismo de acción de la Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*], enfatizando su papel clave en la oxidación del 2-oxoglutarato para catalizar la transformación de leucoantocianidinas a antocianidinas o flavonoles.

Tabla 15. Sitios de unión al ligando de la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*]

Rango	C-score	Tamaño	PDB Hit	Nombre del ligando	Sitios de unión al ligando
1	0,68	51	5c3pA	AKG	202,204,206,221,223,230,277,279,287,289,293
2	0,51	85	1w3xA	W2X	112,116,134,200,204,206,218,221,223,277,279,289,293
3	0,27	17	1gp5A	DQH	132,134,202,223,224,225,293,295,322
4	0,08	15	5c3oA	CA	221,223,277
5	0,03	6	1w2aX	EDO	221,223,293

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

C-score: Puntuación de confianza de la predicción. La puntuación C oscila entre [0-1], donde una puntuación más alta indica una predicción más fiable.

Tamaño: Número total de plantillas.

Tabla 16. Predicción de los números Ec de la proteína Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa [*Manihot esculenta*]

Rango	C-score	PDB Hit	TM-score	RMSD	IDEN	Cov	Número EC
1	0,729	1gp6A	0,977	0,73	0,411	0,998	1.14.11.19
2	0,664	1w9yA	0,700	2,74	0,338	0,773	1.14.17.4
3	0,397	1uofA	0,635	3,55	0,164	0,761	1.14.20.1
4	0,384	1unbA	0,664	3,51	0,164	0,785	1.14.20.1
5	0,383	1bk0A	0,732	3,13	0,240	0,848	1.21.3.1

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

C-score: Puntuación de confianza de la predicción. La puntuación C oscila entre [0-1], donde una puntuación más alta indica una predicción más fiable.

TM-score: Puntaje de similitud estructural global entre la proteína de consulta y la plantilla. El rango va de (0-1], donde 1 indica una coincidencia perfecta entre dos estructuras.

RMSD: Similitud estructural entre dos proteínas. Un RMSD menor indica mayor similitud.

IDEN: Porcentaje de identidad de secuencia en la región alineada estructuralmente.

Cov: cobertura del alineamiento.

Función prevista de Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [Theobroma cacao]

En la Tabla 17, se presentan los sitios de unión al ligando de la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*], destacando la proteína 3rwbD con un C-score excepcionalmente alto de 0.98, indicando una alta confianza en la predicción de los sitios de unión al NAD.

Asimismo, la Tabla 18 presenta las predicciones de números EC, donde la proteína 1y1pA se destaca con el C-score más alto, asignándole el Número EC 1.1.1.2, lo cual indica su función potencial como una reductasa específica. Por otro lado, la proteína 2c29F, aunque no posee el C-score más alto, exhibe el TM-score más cercano a 1 y el RMSD más bajo en comparación con las otras proteínas analizadas. Esto sugiere que la proteína 2c29F es la que presenta una mayor similitud estructural y funcional con la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*].

La proteína 2c29F está asociada con el Número EC 1.1.1.219, caracterizándola como una dihidroflavonol 4-reductasa / dihidrokaempferol 4-reductasa / dihidromiricetina reductasa. Este número EC clasifica a la proteína como una oxidorreductasa que desempeña un papel crucial en la biosíntesis de flavonoides, específicamente en la producción de flavanoles.

Tabla 17. Sitios de unión al ligando de la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*]

Rango	C-score	Tamaño	PDB Hit	Nombre del ligando	Sitios de unión al ligando
1	0,98	468	3rwbD	NAD	12,14,15,16,17,36,37,63,64,65,84,85,86,88,102,126,127,128,163,167,190,191, 192,193,203,204
2	0,06	16	2c29D	DQH	90,128,129,133,134,163,190,191,192, 204,205,208,222,227
3	0,05	13	2iodB	MYC	88,128,130,159,160,163,164, 167,219,222
4	0,02	15	2PZMA	2PZMA01	192,208,211,215,216,217,218,219, 220,221,222,223,224,260
5	0,02	10	1y1pA	AMP	12,14,15,16,37,65,85,86,88,204

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

C-score: Puntuación de confianza de la predicción. La puntuación C oscila entre [0-1], donde una puntuación más alta indica una predicción más fiable.

Tamaño: Número total de plantillas.

Tabla 18. Predicción de los números Ec de la proteína Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa [*Theobroma cacao*]

Rango	C-score	PDB Hit	TM-score	RMSD	IDEN	Cov	Número EC
1	0,488	1y1pA	0,814	2,53	0,256	0,899	1.1.1.2
2	0,466	3m2pA	0,693	3,04	0,161	0,785	5.1.3.7
3	0,437	2c29F	0,938	0,58	0,816	0,945	1.1.1.219
4	0,379	3hfsB	0,769	2,79	0,466	0,844	1.3.1.77
5	0,377	1ujmA	0,813	2,65	0,256	0,901	1.1.1.2

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

C-score: Puntuación de confianza de la predicción. La puntuación C oscila entre [0-1], donde una puntuación más alta indica una predicción más fiable.

TM-score: Puntaje de similitud estructural global entre la proteína de consulta y la plantilla. El rango va de (0-1], donde 1 indica una coincidencia perfecta entre dos estructuras.

RMSD: Similitud estructural entre dos proteínas. Un RMSD menor indica mayor similitud.

IDEN: Porcentaje de identidad de secuencia en la región alineada estructuralmente.

Cov: cobertura del alineamiento.

Función prevista de Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol [Abrus precatorius]

La Tabla 19 presenta los principales sitios de unión al ligando para la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol [Abrus precatorius] determinados mediante I-TASSER. El sitio de unión más confiable, con un C-score de 0,95, incluye varios residuos clave y se une al NAD, un cofactor esencial en muchas reacciones redox. Esta predicción sugiere que la Antocianidina reductasa de *Abrus precatorius* podría utilizar NAD en su mecanismo catalítico, similar a otras enzimas de la ruta de los flavonoides que requieren NADH o NADPH para la reducción de antocianidinas a flavan-3-oles (Petit et al., 2007).

También, la Tabla 20 muestra los números EC predichos para la Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol [Abrus precatorius], basados en similitudes estructurales con otras proteínas en el PDB. La similitud más alta se observó con la proteína 1y1pA, con el C-score más alto respecto a las otras proteínas, un TM-score de 0,824 y un RMSD de 2,58, asociada al número EC 1.1.1.2, que corresponde a una reductasa dependiente de NAD(P)+.

Los otros números EC, como 1.1.1.219 y 1.3.1.77, también indican actividades relacionadas con la reducción de sustratos en la vía de los flavonoides. La enzima con número EC 1.3.1.77, llamada Antocianidina reductasa, cataliza la doble reducción de antocianidinas, produciendo monómeros (2R,3R)-flavan-3-ol (Xie et al., 2003).

Tabla 19. Sitios de unión al ligando de la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol [Abrus precatorius])

Rango	C-score	Tamaño	PDB Hit	Nombre del ligando	Sitios de unión al ligando
1	0,95	405	3icpA	NAD	31,33,34,35,36,55,56,81,82,83,102, 103, 104,106, 120,144,145,146,183, 187, 210,211,212,213,224

2	0,04	27	2CNBA	2CNBA00	108,146,147,183,210,212,228,231,236 237, 238,239,240,241,242,243,244, 245,246,247
3	0,03	13	1wvgB	APR	31,33,34,35,36,55,56,81,82,83,102, 103,104,106,120,144,145,183,187
4	0,02	9	2c29D	DQH	108,146,147,151,152,183,210, 211,212,224,225,228,246,254
5	0,01	7	2iodB	MYC	106,146,148,180,183,184,187,241

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

C-score: Puntuación de confianza de la predicción. La puntuación C oscila entre [0-1], donde una puntuación más alta indica una predicción más fiable.

Tamaño: Número total de plantillas.

Tabla 20. los números Ec de la proteína Antocianidina reductasa (formadora de (2S)-flavan-3-ol [*Abrus precatorius*])

Rango	C-score	PDB Hit	TM-score	RMSD	IDEN	Cov	Número EC
1	0,438	1y1pA	0,824	2,58	0,269	0,912	1.1.1.2
2	0,403	3m2pA	0,684	2,86	0,136	0,765	5.1.3.7
3	0,401	2c20A	0,740	3,55	0,159	0,858	5.1.3.2
4	0,366	2c29F	0,890	1,05	0,445	0,909	1.1.1.219
5	0,333	3hfsB	0,768	2,76	0,737	0,841	1.3.1.77

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

C-score: Puntuación de confianza de la predicción. La puntuación C oscila entre [0-1], donde una puntuación más alta indica una predicción más fiable.

TM-score: Puntaje de similitud estructural global entre la proteína de consulta y la plantilla. El rango va de (0-1], donde 1 indica una coincidencia perfecta entre dos estructuras.

RMSD: Similitud estructural entre dos proteínas. Un RMSD menor indica mayor similitud.

IDEN: Porcentaje de identidad de secuencia en la región alineada estructuralmente.

Cov: cobertura del alineamiento.

Función prevista de la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [Hevea brasiliensis]

Los resultados del servidor I-Tasser, utilizando los programas COFACTOR y COACH, revelaron cuatro sitios de unión en la proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*], como se detalla en la Tabla 21. El sitio de unión con mayor puntuación de confianza (C-score de 0,52) se asocia con el ligando DFL (4-Hidroxiflavanona).

Por otro lado, la Tabla 22 muestra los números EC predichos para esta proteína, basados en comparaciones estructurales con otras proteínas conocidas. La similitud más alta se encontró con la proteína 1jx1A, con un TM-score de 0,672 y un RMSD de 2,29, correspondiente al número EC 5.5.1.6, que define una isomerasa.

La enzima 5.5.1.6, llamada calcona isomerasa / calcona-flavanona isomerasa / flavanona liasa, cataliza la conversión de chalconas en las flavanonas, un paso esencial para la formación de una variedad de compuestos flavonoides como los flavonoles y flavanoles (Moustafa, 1967).

Tabla 21. Sitios de unión al ligando de la Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*]

Rango	C-score	Tamaño	PDB Hit	Nombre del ligando	Sitios de unión al ligando
1	0,52	17	1jepA	DFL	95,106,107,109,159,164,167,171,247,248
2	0,06	3	4dooB	DAO	95,107,168,171,193,197,199,202,208,210,247,248,256
3	0,06	2	1sijA	MG	184,188
4	0,02	1	3fahA	GOL	169,173,193

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

C-score: Puntuación de confianza de la predicción. La puntuación C oscila entre [0-1], donde una puntuación más alta indica una predicción más fiable.

Tamaño: Número total de plantillas.

Tabla 22. Predicción de los números Ec de la Proteína de la familia de la calcona-flavonona isomerasa [*Hevea brasiliensis*]

Rango	C-score	PDB Hit	TM-score	RMSD	IDEN	Cov	Número EC
1	0,193	1jx1A	0,672	2,29	0,298	0,740	5.5.1.6
2	0,100	1gpxA	0,399	5,26	0,048	0,593	3.1.3.7
3	0,099	2e1qA	0,379	6,71	0,051	0,685	1.17.3.2 1.17.1.4
4	0,098	1vlbA	0,404	6,04	0,053	0,678	1.2.99.7
5	0,084	1k9yA	0,399	5,17	0,048	0,590	3.1.3.7

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024

C-score: Puntuación de confianza de la predicción. La puntuación C oscila entre [0-1], donde una puntuación más alta indica una predicción más fiable.

TM-score: Puntaje de similitud estructural global entre la proteína de consulta y la plantilla. El rango va de (0-1], donde 1 indica una coincidencia perfecta entre dos estructuras.

RMSD: Similitud estructural entre dos proteínas. Un RMSD menor indica mayor similitud.

IDEN: Porcentaje de identidad de secuencia en la región alineada estructuralmente.

Cov: cobertura del alineamiento.

Rol de los flavonoles y flavanoles en la síntesis de nanopartículas

Los flavonoles y flavanoles, en particular, han mostrado una alta capacidad para la formación de nanopartículas metálicas, debido a sus múltiples grupos hidroxilo, que facilitan la donación de electrones y la estabilización de las partículas formadas (Marslin et al., 2018). Esta propiedad es esencial para producir nanopartículas uniformes y estables, lo que es fundamental para aplicaciones en biorremediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados (Abdo et al., 2023).

Numerosos estudios han demostrado el potencial de los flavonoides en la síntesis verde de nanopartículas. Por ejemplo, Akhbari y colaboradores (Akhbari et al., 2019) describieron cómo los extractos de hojas de *Mentha piperita*, que contienen altos niveles de flavonoles como quercetina y rutina, se utilizaron con éxito para sintetizar

nanopartículas de hierro cerovalente, evidenciando su capacidad como agentes reductores naturales. Además, otro estudio demostró que, de 26 flavonoides evaluados para la reducción de iones férricos, los flavonoles y flavanoles destacaron logrando una reducción sustancial de estos iones (Macáková et al., 2012).

Además de su papel en la síntesis verde de nanopartículas, los flavonoides poseen propiedades antioxidantes que mejoran la estabilidad y funcionalidad de las nanopartículas resultantes, como se detalla en el estudio de Marslin y colaboradores (Marslin et al., 2018). Estas propiedades antioxidantes permiten que las nanopartículas sintetizadas tengan aplicaciones potenciales en la biorremediación, facilitando la adsorción y reducción de metales pesados como plomo, cadmio y mercurio en medios acuáticos y suelos contaminados (Santos-Espinoza et al., 2020).

La predicción de las estructuras tridimensionales de las proteínas Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa de *Manihot esculenta*, Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa de *Theobroma cacao*, Antocianidina reductasa de *Abrus precatorius*, y la proteína de la familia de la calcona-flavanona isomerasa de *Hevea brasiliensis*, ha permitido inferir la función biológica de cada una de estas proteínas, evidenciando así su potencial participación en la síntesis de flavonoides, específicamente los flavonoles y flavanoles. Además, estas estructuras predichas facilitaron la identificación de sitios activos y posibles ligandos, lo cual es importante para considerar estas proteínas como candidatas ideales en experimentos *in vitro* orientados a la producción controlada de flavonoides.

De igual manera, la identificación de estas proteínas en plantas amazónicas sugiere que estas especies son capaces de sintetizar flavonoles o flavanoles y, por lo tanto, tienen potencial para la síntesis verde de nanopartículas. Por ejemplo, la enzima Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa de *Manihot esculenta*, a través de la predicción de función con los programas COFACTOR y COACH, se ha demostrado que puede sintetizar flavonoles como la quercetina, el kaempferol y la rutina. Estos flavonoides son conocidos

por su capacidad para sintetizar nanopartículas metálicas, como las de oro, plata y hierro.

El análisis bioinformático llevado a cabo en este estudio fue fundamental para acelerar el descubrimiento de agentes biológicos efectivos, optimizando tiempos y recursos en la fase experimental. Herramientas como BLAST, KEGG e I-TASSER, empleadas para identificar proteínas homólogas, mapear rutas metabólicas y predecir la estructura y función de estas proteínas, proporcionaron una comprensión detallada de las funciones de proteínas y enzimas clave (Edwards & Cottage, 2003; Watson et al., 2005). Esto es crucial para la implementación de proteínas recombinantes y garantiza una selección óptima de especies vegetales con el mayor potencial para la síntesis verde de nZVI (Sysak et al., 2023). Este conocimiento no solo facilita un enfoque más ecológico y sostenible, reduciendo la dependencia de reactivos químicos tóxicos, sino que también abre nuevas vías para la innovación en la nanotecnología verde.

En la Figura 11 se aprecia una demostración gráfica del proceso de síntesis de nanopartículas de plata a partir de un extracto de planta rico en flavonoles, sintetizados a partir de la proteína flavonol sintasa.

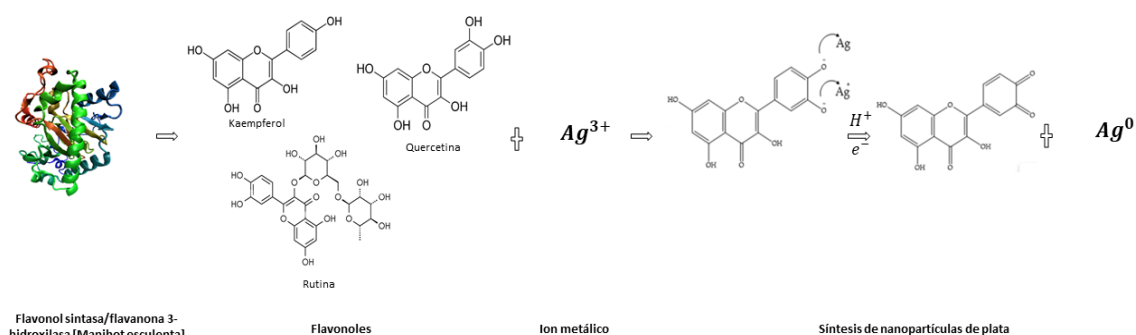


Figura 11. Representación gráfica de la síntesis de nanopartículas de plata a partir de extractos de plantas.

Realizado por: Culcay, Mishelle, 2024. Referencia: (Zuhrotun et al., 2023).

CONCLUSIONES

El creciente interés en la síntesis sostenible de nanopartículas refleja un cambio de paradigma hacia tecnologías ambientalmente sostenibles. La bioprospección de plantas amazónicas para la síntesis de nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI), emerge como una estrategia prometedora. La diversidad vegetal en la Amazonia ofrece un amplio repositorio de compuestos bioactivos, como flavonoides, que desempeñan roles fundamentales en la estabilización y reducción de nanopartículas.

La aplicación de herramientas bioinformáticas permitió identificar 88 proteínas relacionadas con la biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis thaliana*. De estas, el análisis BLAST reveló 16 especies amazónicas previamente no exploradas para la síntesis verde de nZVI, siendo cacao (*Theobroma cacao*), caucho (*Hevea brasiliensis*), yuca (*Manihot esculenta*) y *Abrus precatorius* las especies más representativas al presentar el mayor número de proteínas identificadas. Estas especies sintetizan principalmente flavonoles y flavanoles.

De las 88 proteínas de *Arabidopsis thaliana* analizadas, se identificaron 49 enzimas implicadas en las rutas metabólicas de biosíntesis de flavonoides en 12 plantas amazónicas, proporcionando una visión detallada de sus capacidades biosintéticas. El uso de la base de datos KEGG facilitó una comprensión más profunda de las rutas metabólicas involucradas, revelando similitudes notables entre las rutas de las especies amazónicas estudiadas. Las enzimas clave identificadas en la producción de flavonoles y flavanoles incluyen: la Flavonol sintasa/flavanona 3-hidroxilasa de *Manihot esculenta*, la Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa de *Theobroma cacao*, la Antocianidina reductasa de *Abrus precatorius*, y la proteína de la familia de la calcona-flavanona isomerasa de *Hevea brasiliensis*.

La predicción de la estructura tridimensional de estas proteínas mediante la herramienta I-TASSER permitió identificar modelos 3D altamente confiables,

demostrando una notable similitud estructural con enzimas conocidas por su participación en la síntesis de flavonoides. Además, las herramientas COFACTOR y COACH validaron su función biológica en esta vía metabólica específica. Mediante la predicción de números EC para cada proteína, se identificaron que las enzimas con mayor puntaje de confianza están involucradas directamente en la síntesis de flavonoides.

La revisión exhaustiva de la literatura científica corroboró que los flavonoles y flavanoles son cruciales en la síntesis verde de nanopartículas de hierro cerovalente, destacándose por su eficacia en la reducción de iones férricos. Las herramientas bioinformáticas, como BLAST, KEGG e I-TASSER, fueron fundamentales para identificar proteínas homólogas, mapear rutas metabólicas y predecir la estructura y función de proteínas clave relacionadas con la biosíntesis de flavonoides. Este análisis detallado permitió seleccionar entre las especies vegetales analizadas, destacando *Theobroma cacao* como la más adecuada para iniciar los experimentos de síntesis de nZVI. Esta especie muestra una alta homología estructural con enzimas como la Dihidroflavonol 4-reductasa bifuncional/flavanona 4-reductasa, cruciales en la biosíntesis de flavonoides. Además, *Theobroma cacao* tiene una tradición de uso en biotecnología, lo que proporciona un acceso valioso a información genética y experimental adicional. Los flavonoides presentes en esta planta, como catequinas y procianidinas, han demostrado ser eficaces en la reducción de iones férricos, un paso crucial para la síntesis verde de nZVI. Por lo tanto, se prevé que esta especie proporcionará resultados positivos en la síntesis de nanopartículas de hierro cerovalente.

Por lo tanto, los objetivos del estudio se cumplieron exitosamente, identificando especies amazónicas con alta homología genómica y estructural con las proteínas de biosíntesis de flavonoides de *Arabidopsis thaliana*. Este estudio establece las bases para futuras investigaciones sobre la capacidad de estas especies para sintetizar nZVI, contribuyendo así al entendimiento de la biodiversidad amazónica y su potencial biotecnológico, abriendo nuevas vías para la aplicación de estos conocimientos en la remediación de contaminantes ambientales.

No obstante, la metodología propuesta enfrenta limitaciones debido a la falta de secuencias genéticas disponibles para numerosas especies vegetales amazónicas. Muchas de estas plantas aún no han sido sometidas a identificación molecular (barcoding) y, en muchos casos, carecen de un genoma secuenciado. Específicamente, algunas especies encontradas en este estudio, como *Vassobia dichotoma*, *Phyllanthus nodiflora*, *Bixa orellana*, *Crateva tapia* y *Chromolaena odorata*, aún no cuentan con un genoma de referencia. Aunque existen desafíos, la investigación destaca la importancia de la sostenibilidad y la utilización de recursos naturales para el desarrollo de tecnologías responsables con el medio ambiente.

REFERENCIAS

- Abdo, M. M., Abdel-Hamid, M. I., El-Sherbiny, I. M., El-Sherbeny, G., & Abdel-Aal, E. I. (2023). Green synthesis of AgNPs, alginate microbeads and *Chlorella minutissima* laden alginate microbeads for tertiary treatment of municipal wastewater. *Bioresource Technology Reports*, 21, 101300. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101300>
- Akhbari, M., Hajiaghaee, R., Ghafarzadegan, R., Hamed, S., & Yaghoobi, M. (2019). Process optimisation for green synthesis of zero-valent iron nanoparticles using *Mentha piperita*. *IET Nanobiotechnology*, 13(2), 160–169. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5040>
- Aksu Demirezen, D., Yildiz, Y. Ş., Yilmaz, Ş., & Demirezen Yilmaz, D. (2019). Green synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles using *Ficus carica* (common fig) dried fruit extract. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(2), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.07.024>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anwar, M., Yu, W., Yao, H., Zhou, P., Allan, A. C., & Zeng, L. (2019). NtMYB3, an R2R3-MYB from *Narcissus*, Regulates Flavonoid Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5456. <https://doi.org/10.3390/ijms20215456>
- Avila-Sosa, R., Montero-Rodríguez, A. F., Aguilar-Alonso, P., Vera-López, O., Lazcano-Hernández, M., Morales-Medina, J. C., & Navarro-Cruz, A. R. (2019). Antioxidant Properties of Amazonian Fruits: A Mini Review of In Vivo and In Vitro Studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/8204129>
- Baek, G., Saeed, M., & Choi, H.-K. (2021). Duckweeds: their utilization, metabolites and cultivation. *Applied Biological Chemistry*, 64(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13765-021-00644-z>
- Berardi, A. E., Hildreth, S. B., Helm, R. F., Winkel, B. S. J., & Smith, S. D. (2016). Evolutionary correlations in flavonoid production across flowers and leaves in the Iochrominae (Solanaceae). *Phytochemistry*, 130, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.05.007>

- Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., & Huala, E. (2015). The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis*, 53(8), 474–485. <https://doi.org/10.1002/dvg.22877>
- Bethesda (MD). (2008). *BLAST® Command Line Applications User Manual [Internet]*. National Center for Biotechnology Information (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279690/>
- Bhattacharyya, D., Xu, J., Smuleac, V., Lewis, S., Ormsbee, L., & Bachas, L. (2010). Nanotechnology for TC and PCB Dechlorination from Water: Nanoparticle Synthesis and Reactivity. *World Environmental and Water Resources Congress*, 411–416.
- Borja, Borja, J., Heredia-Moyano, S., & Sáez-Paguay, M. (2020). Los nanomateriales y sus aplicaciones en la remediación ambiental. *Polo Del Conocimiento*, 5(47), 338–370.
- Cádiz-Gurrea, M. L., Lozano-Sanchez, J., Contreras-Gámez, M., Legeai-Mallet, L., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2014). Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of *Theobroma cacao* extract. *Journal of Functional Foods*, 10, 485–498. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.016>
- Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C. J., Shu, S., Marshall, B., & Lewis, S. (2009). AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics*, 25(2), 288–289. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn615>
- Cardoso, D., Särkinen, T., Alexander, S., Amorim, A. M., Bittrich, V., Celis, M., Daly, D. C., Fiaschi, P., Funk, V. A., Giacomini, L. L., Goldenberg, R., Heiden, G., Iganci, J., Kelloff, C. L., Knapp, S., Cavalcante de Lima, H., Machado, A. F. P., dos Santos, R. M., Mello-Silva, R., ... Forzza, R. C. (2017). Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), 10695–10700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706756114>
- Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H., & Chen, X. (2023). A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. *Molecules*, 28(13), 4982. <https://doi.org/10.3390/molecules28134982>
- de la Luz Cádiz-Gurrea, M., Fernández de las Nieves, I., Aguilera Saez, L. M., Fernández-Arroyo, S., Legeai-Mallet, L., Bouaziz, M., & Segura-Carretero, A. (2019). Bioactive Compounds from *Theobroma cacao*: Effect of Isolation and Safety Evaluation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 40–46. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0694-x>

- Edwards, Y. J. K., & Cottage, A. (2003). Bioinformatics Methods to Predict Protein Structure and Function: A Practical Approach. *Molecular Biotechnology*, 23(2), 139–166. <https://doi.org/10.1385/MB:23:2:139>
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
- Fazlzadeh, M., Rahmani, K., Zarei, A., Abdoallahzadeh, H., Nasiri, F., & Khosravi, R. (2017). A novel green synthesis of zero valent iron nanoparticles (NZVI) using three plant extracts and their efficient application for removal of Cr(VI) from aqueous solutions. *Advanced Powder Technology*, 28(1), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2016.09.003>
- Galdames, A., Mendoza, A., Orueta, M., de Soto García, I. S., Sánchez, M., Virto, I., & Vilas, J. L. (2017). Development of new remediation technologies for contaminated soils based on the application of zero-valent iron nanoparticles and bioremediation with compost. *Resource-Efficient Technologies*, 3(2), 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.03.008>
- Gul, M. Z., Ahmad, F., Kondapi, A. K., Qureshi, I. A., & Ghazi, I. A. (2013). Antioxidant and antiproliferative activities of *Abrus precatorius* leaf extracts - an in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 53. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-53>
- Hammerbacher, A., Kandasamy, D., Ullah, C., Schmidt, A., Wright, L. P., & Gershenzon, J. (2019). Flavanone-3-Hydroxylase Plays an Important Role in the Biosynthesis of Spruce Phenolic Defenses Against Bark Beetles and Their Fungal Associates. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00208>
- Hussain, M., Raja, N. I., Iqbal, M., & Aslam, S. (2019). Applications of Plant Flavonoids in the Green Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticles and Impacts on Human Health. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 43(3), 1381–1392. <https://doi.org/10.1007/s40995-017-0431-6>
- Jiang, W., Yin, Q., Wu, R., Zheng, G., Liu, J., Dixon, R. A., & Pang, Y. (2015). Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 7165–7179. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv413>
- Kahraman, B. F., Altin, A., & Ozdogan, N. (2022). Remediation of Pb-diesel fuel co-contaminated soil using nano/bio process: subsequent use of nanoscale zero-valent iron and

- bioremediation approaches. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(27), 41110–41124. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18857-0>
- Kanehisa, M., & Sato, Y. (2020). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*, 29(1), 28–35. <https://doi.org/10.1002/pro.3711>
- Kathuria, D., & Chourasiya, S. S. (2022). Bioprospecting of Bioresources. In *Bioresource Technology* (pp. 57–92). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119789444.ch4>
- Koornneef, M., & Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), 909–921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x>
- 'Kumar, V. (2019). *Biosynthesis of nanoparticles: a review*. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 19(10), 6524–6545.
- Kumbhar, S. T., Patil, S. P., & Une, H. D. (2018). Phytochemical analysis of Canna indica L. roots and rhizomes extract. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 16, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.09.002>
- Lee, D., Redfern, O., & Orengo, C. (2007). Predicting protein function from sequence and structure. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(12), 995–1005. <https://doi.org/10.1038/nrm2281>
- Leong, A. C.-N., Kinjo, Y., Tako, M., Iwasaki, H., Oku, H., & Tamaki, H. (2010). Flavonoid glycosides in the shoot system of Okinawa Taumu (*Colocasia esculenta* S.). *Food Chemistry*, 119(2), 630–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.004>
- Lima, Z. M., da Trindade, L. S., Santana, G. C., Padilha, F. F., da Costa Mendonça, M., da Costa, L. P., López, J. A., & Macedo, M. L. H. (2017). Effect of Tamarindus indica L. and *Manihot esculenta* Extracts on Antibiotic-resistant Bacteria. *Pharmacognosy Research*, 9(2), 195–199. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.204648>
- Lin, F.-J., Yen, F.-L., Chen, P.-C., Wang, M.-C., Lin, C.-N., Lee, C.-W., & Ko, H.-H. (2014). HPLC-Fingerprints and Antioxidant Constituents of *Phylla nodiflora*. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/528653>
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12824. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>
- Ma, G., Zhang, L., Yamamoto, R., Kojima, N., Yahata, M., & Kato, M. (2023). Molecular characterization of a flavanone 3-hydroxylase gene from citrus fruit reveals its crucial roles in anthocyanin accumulation. *BMC Plant Biology*, 23(1), 233. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04173-3>

- Macáková, K., Mladěnka, P., Filipský, T., Říha, M., Jahodář, L., Trejtnar, F., Bovicelli, P., Proietti Silvestri, I., Hrdina, R., & Saso, L. (2012). Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chemistry*, 135(4), 2584–2592. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.107>
- Marslin, G., Siram, K., Maqbool, Q., Selvakesavan, R. K., Kruszka, D., Kachlicki, P., & Franklin, G. (2018). Secondary Metabolites in the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles. *Materials*, 11(6), 940. <https://doi.org/10.3390/ma11060940>
- Mora, A., Jumbo-Flores, D., González-Merizalde, M., Bermeo-Flores, S. A., Alvarez-Figueroa, P., Mahlknecht, J., & Hernández-Antonio, A. (2019). Heavy Metal Enrichment Factors in Fluvial Sediments of an Amazonian Basin Impacted by Gold Mining. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102(2), 210–217. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02545-w>
- Moustafa, E. (1967). Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. *Phytochemistry*, 6(5), 625–632. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86001-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86001-X)
- Neimark, B. D. (2017). Bioprospecting and Biopiracy. In *International Encyclopedia of Geography* (pp. 1–6). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118786352.wbieg0587>
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (n.d.). *Toxic Potential of Materials at the Nanolevel*. <http://science.sciencemag.org/>
- Oleinik, G., Dario, P. P., de Moraes Gasperin, K., Benvegnú, D. M., Lima, F. O., Soares, L. C., & Gallina, A. L. (2022). In vitro antioxidant extracts evaluation from the residue of *the Hevea brasiliensis* seed. *Scientific Reports*, 12(1), 480. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04017-w>
- Pereira Feitosa, L. G., Monge, M., Lopes, N. P., & Rodrigues de Oliveira, D. C. (2021). Distribution of flavonoids and other phenolics in Mikania species (Compositae) of Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 97, 104273. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104273>
- Petit, P., Granier, T., d'Estaintot, B. L., Manigand, C., Bathany, K., Schmitter, J.-M., Lauvergeat, V., Hamdi, S., & Gallois, B. (2007). Crystal Structure of Grape Dihydroflavonol 4-Reductase, a Key Enzyme in Flavonoid Biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, 368(5), 1345–1357. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.088>
- Puthukkara P, A. R., Jose T, S., & S, D. Ial. (2021). Plant mediated synthesis of zero valent iron nanoparticles and its application in water treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104569. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104569>

- Ruan, H., Shi, X., Gao, L., Rashid, A., Li, Y., Lei, T., Dai, X., Xia, T., & Wang, Y. (2022). Functional analysis of the dihydroflavonol 4-reductase family of *Camellia sinensis* : exploiting key amino acids to reconstruct reduction activity. *Horticulture Research*, 9. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac098>
- Sa, N., Alkhayer, K., & Behera, A. (2024). Efficient removal of environmental pollutants by green synthesized metal nanoparticles of *Clitoria ternatea*. *Heliyon*, 10(9), e29865. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29865>
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., & Fernie, A. R. (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001>
- Santos-Espinoza, A., Gutiérrez-Miceli, F., Ruíz-Valdiviezo, V., & Montes-Molina, J. (2020). El papel de los compuestos polifenólicos en la síntesis verde de nanopartículas metálicas. *BioTecnología*, 24(2), 46–57. <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2020/08/7-Santos-Espinoza-et-al-2020.pdf>
- Saravanan, M., Senthilkumar, P., Kalimuthu, K., Chinnadurai, V., Vasantharaj, S., & Pugazhendhi, A. (2018). Phytochemical and pharmacological profiling of *Turnera subulata* Sm., a vital medicinal herb. *Industrial Crops and Products*, 124, 822–833. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.065>
- Sasaki, N., & Nakayama, T. (2015). Achievements and Perspectives in Biochemistry Concerning Anthocyanin Modification for Blue Flower Coloration. *Plant and Cell Physiology*, 56(1), 28–40. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu097>
- Shang, X., Liu, G., Wu, Z., & Zhang, P. (2022). Combined Transcriptomic and Metabolomic Analysis Reveals the Mechanism of Flavonoid Biosynthesis in *Handroanthus chrysanthus* (Jacq.) S.O.Grose. *Forests*, 13(8), 1285. <https://doi.org/10.3390/f13081285>
- Sharma, D., Kanchi, S., & Bisetty, K. (2019). Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3576–3600. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.002>
- Solís, C. (2008). Identificación in silico de un grupo de secuencias ortólogas conservadoras (COS) de *Ipomoea batatas*. *Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM*, 15(1), 79–84. <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
- Soto-Benavente, M., Rodríguez-Achata, L., Olivera, M., Arostegui, V., Colina, C., & Garate, J. (2020). Health risks due to the presence of heavy metals in agricultural products cultivated

- in areas abandoned by gold mining in the Peruvian Amazon. *Scientia Agropecuaria*, 11(1), 49–59. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.01.06>
- Stefaniuk, M., Oleszczuk, P., & Ok, Y. S. (2016). Review on nano zerovalent iron (nZVI): From synthesis to environmental applications. *Chemical Engineering Journal*, 287, 618–632. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.11.046>
- Sysak, S., Czarczynska-Goslinska, B., Szyk, P., Koczorowski, T., Mlynarczyk, D. T., Szczolko, W., Lesyk, R., & Goslinski, T. (2023). Metal Nanoparticle-Flavonoid Connections: Synthesis, Physicochemical and Biological Properties, as Well as Potential Applications in Medicine. *Nanomaterials*, 13(9), 1531. <https://doi.org/10.3390/nano13091531>
- Tan, Y. C., Kumar, A. U., Wong, Y. P., & Ling, A. P. K. (2022). Bioinformatics approaches and applications in plant biotechnology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00394-5>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Vazquez-Duhalt, R. (2015). Nanotecnología en procesos ambientales y remediación de la contaminación. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 8(14), 70–80. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2015.14.52514>
- Velásquez Ramírez, M. G., Barrantes, J. A. G., Thomas, E., Gamarra Miranda, L. A., Pillaca, M., Tello Peramas, L. D., & Bazán Tapia, L. R. (2020). Heavy metals in alluvial gold mine spoils in the peruvian amazon. *CATENA*, 189, 104454. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104454>
- Velusamy, P., Kumar, G. V., Jeyanthi, V., Das, J., & Pachiappan, R. (2016). Bio-Inspired Green Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Antibacterial Application. *Toxicological Research*, 32(2), 95–102. <https://doi.org/10.5487/TR.2016.32.2.095>
- Verdecía, D. M., Herrera-Herrera, R. del Carmen., Torres, E., Sánchez, A. R., Hernández-Montiel, L. G., Herrera, R. S., Ramírez, J. L., Bodas, R., Giráldez, F. J., Guillaume, J., Uvidia, H., & López, S. (2021). Primary and secondary metabolites of six species of trees, shrubs and herbaceous legumes. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 55, 77–93.

- Waki, T., Mameda, R., Nakano, T., Yamada, S., Terashita, M., Ito, K., Tenma, N., Li, Y., Fujino, N., Uno, K., Yamashita, S., Aoki, Y., Denessiouk, K., Kawai, Y., Sugawara, S., Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Morita, Y., Hoshino, A., ... Nakayama, T. (2020). A conserved strategy of chalcone isomerase-like protein to rectify promiscuous chalcone synthase specificity. *Nature Communications*, 11(1), 870. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14558-9>
- Wang, L., Zhu, Y., Wang, P., Fan, Q., Wu, Y., Peng, Q.-Z., Xia, G.-X., & Wu, J.-H. (2016). Functional Characterization of a Dihydroflavanol 4-Reductase from the Fiber of Upland Cotton (*Gossypium hirsutum*). *Molecules*, 21(2), 32. <https://doi.org/10.3390/molecules21020032>
- Wang, Y., Shi, Y., Li, K., Yang, D., Liu, N., Zhang, L., Zhao, L., Zhang, X., Liu, Y., Gao, L., Xia, T., & Wang, P. (2021). Roles of the 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase Superfamily in the Flavonoid Pathway: A Review of the Functional Diversity of F3H, FNS I, FLS, and LDOX/ANS. *Molecules*, 26(21), 6745. <https://doi.org/10.3390/molecules26216745>
- Watson, J. D., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (2005). Predicting protein function from sequence and structural data. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.04.003>
- Wen, W., Alseekh, S., & Fernie, A. R. (2020). Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom. *Current Opinion in Plant Biology*, 55, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.04.004>
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2), 485–493. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.485>
- Xie, D.-Y., Sharma, S. B., Paiva, N. L., Ferreira, D., & Dixon, R. A. (2003). Role of Anthocyanidin Reductase, Encoded by *BANYULS* in Plant Flavonoid Biosynthesis. *Science*, 299(5605), 396–399. <https://doi.org/10.1126/science.1078540>
- Xiong, Y., Zhang, P., Warner, R. D., & Fang, Z. (2019). 3-Deoxyanthocyanidin Colorant: Nature, Health, Synthesis, and Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1533–1549. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12476>
- Yang, J., Roy, A., & Zhang, Y. (2012). BioLiP: a semi-manually curated database for biologically relevant ligand–protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D1096–D1103. <https://doi.org/10.1093/nar/gks966>
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>

- Zareiyan, F., & Khajehsharifi, H. (2023). Study of *Opuntia humifusa* : phytochemical analysis of aqueous fruit extract and green synthesis of Ag₂O nanoparticles. *Natural Product Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2272031>
- Zhang, Y., & Yang, H. (2017). Biosíntesis de nanopartículas por microorganismos y plantas. *Fronteras En Química*, 5, 78.
- Zuhrotun, A., Oktaviani, D. J., & Hasanah, A. N. (2023). Biosynthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Phytochemical Compounds. *Molecules*, 28(7), 3240. <https://doi.org/10.3390/molecules28073240>
- Zuraida Wan Mohd Zain, W., Nadia binti Ramli, N., Jusoh, S., & binti Hamid, A. (2021). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content from leaves and seed extracts of *Hevea brasiliensis* clone. In *Journal of Academia* (Vol. 9).

ANEXOS

Anexo 1. Script en Python para descargar todas las secuencias de aminoácidos en formato FASTA

```
import requests

def fetch_uniprot_sequence(protein_id):
    url = f"https://www.uniprot.org/uniprot/{protein_id}.fasta"
    response = requests.get(url)
    if response.ok:
        # Returns the sequence in FASTA format
        return response.text
    else:
        # If there is a problem with the request, print the status code
        print(f"Error retrieving sequence for {protein_id}. Status code: {response.status_code}")
        return None

# File name containing UniProt IDs
file_path = "/content/drive/MyDrive/data/proteins_IDs_uniprot.txt"

# Read UniProt IDs from the file
with open(file_path, "r") as file:
    protein_ids = [line.strip() for line in file]

# Download amino acid sequences and write to a FASTA file
fasta_filename = "/content/drive/MyDrive/data/multiple_sequences_protein.fasta"
with open(fasta_filename, "w") as fasta_file:
    for protein_id in protein_ids:
        sequence = fetch_uniprot_sequence(protein_id)
        if sequence:
            # Write the sequence to the FASTA file
            fasta_file.write(sequence)

# Display a message indicating that the file has been created
print(f"Sequences have been saved to {fasta_filename}")
```

Anexo 2. Script en bash para individualizar las secuencias de un archivo fasta

```
#!/bin/bash

input_file="multiple_sequences_protein.fasta"
output_dir="output_fasta_files"
mkdir -p "$output_dir"

# Read the input file line by line
while IFS= read -r line; do
    # Check if the line starts with ">"
    if [[ $line == ">*" ]]; then
        # Extract sequence ID from the line using awk and tr
```

```

sequence_id=$(echo "$line" | awk -F '|' '{print $2}' | tr -d ' ')
# Create a new file for the sequence
output_file="$output_dir/$sequence_id.fasta"
echo $line > "$output_file"
else
# Append sequence line to the current file
echo $line >> "$output_file"
fi
done < "$input_file"
echo "Splitting complete. Individual files are stored in '$output_dir' directory."

```

Anexo 3. Script en bash para realizar blastp

```

#!/bin/bash
input_dir="output_fasta_files"
output_dir="blast_results"
mkdir -p "$output_dir"
# Iterate through all fasta files in the input directory
for fasta_file in "$input_dir"/*.fasta; do
# Extract the sequence ID from the file name
sequence_id=$(basename "$fasta_file" .fasta)
# Perform BLAST search for the current sequence
blastp -remote -db nr -query "$fasta_file" -out "$output_dir/$sequence_id"_result.txt
echo "BLAST for $sequence_id complete."
done
echo "All BLAST searches completed. Results are stored in '$output_dir' directory."

```

Anexo 4. Extracción de las especies vegetales de los resultados de blastp

```

#!/bin/bash
input_dir="blast_results"
output_dir="extracted_organisms"
mkdir -p "$output_dir"
# Iterate through all result files in the input directory
for result_file in "$input_dir"/*_result.txt; do
# Extract the sequence ID from the file name
sequence_id=$(basename "$result_file" _result.txt)
# Extract characters between [ and ] from each line and save to a new file
awk -F'[][]' '{print $2}' "$result_file" > "$output_dir/$sequence_id"_result_organisms.txt
echo "Extraction for $sequence_id complete."
done

```

```
echo "All extractions completed. Results are stored in '$output_dir' directory."
```

Anexo 5. Búsqueda en la base de datos local (especies vegetales amazónicas)

```
#!/bin/bash
result_dir="extracted_organisms"
database_file="database_all.txt"
# Create a directory to store search results
search_results_dir="search_results_all"
mkdir -p "$search_results_dir"
# Iterate through all result organism files in the input directory
for result_organism_file in "$result_dir"/*_result_organisms.txt; do
    # Extract the sequence ID from the file name
    sequence_id=$(basename "$result_organism_file" _result_organisms.txt)
    # Perform a search for each line in the result organism file in the database
    grep -F -f "$result_organism_file" "$database_file" > "$search_results_dir/$sequence_id".txt
    echo "Search for $sequence_id complete."
done
echo "All searches completed. Results are stored in '$search_results_dir' directory."
```

Anexo 6. Términos de búsqueda bibliográfica para la identificación de los tipos de flavonoides en las especies vegetales amazónicas encontradas

"Theobroma cacao" AND *"flavonoids"*

"Theobroma cacao" AND *"phytochemistry"*

"Theobroma cacao" AND (*"phytochemical analysis"* OR *"phytochemistry"*) AND *"flavonoids"*

"Canna indica" AND *"flavonoids"*

"Canna indica" AND *"phytochemistry"*

"Canna indica" AND (*"phytochemical analysis"* OR *"phytochemistry"*) AND *"flavonoids"*

"Manihot esculenta" AND *"flavonoids"*

"Manihot esculenta" AND *"phytochemistry"*

"Manihot esculenta" AND (*"phytochemical analysis"* OR *"phytochemistry"*) AND *"flavonoids"*

"Handroanthus impetiginosus" AND *"flavonoids"*

"Handroanthus impetiginosus" AND *"phytochemistry"*

"Handroanthus impetiginosus" AND (*"phytochemical analysis"* OR *"phytochemistry"*) AND *"flavonoids"*

"Hevea brasiliensis" AND *"flavonoids"*

"Hevea brasiliensis" AND *"phytochemistry"*

"*Hevea brasiliensis*" AND ("phytochemical analysis" OR "phytochemistry") AND "flavonoids"

"*Mikania micrantha*" AND "flavonoids"

"*Mikania micrantha*" AND "phytochemistry"

"*Mikania micrantha*" AND ("phytochemical analysis" OR "phytochemistry") AND "flavonoids"

"*Vassobia dichotoma*" AND "flavonoids"

"*Vassobia dichotoma*" AND "phytochemistry"

"*Vassobia dichotoma*" AND ("phytochemical analysis" OR "phytochemistry") AND "flavonoids"

"*Turnera subulata*" AND "flavonoids"

"*Turnera subulata*" AND "phytochemistry"

"*Turnera subulata*" AND ("phytochemical analysis" OR "phytochemistry") AND "flavonoids"

"*Phyla nodiflora*" AND "flavonoids"

"*Phyla nodiflora*" AND "phytochemistry"

"*Phyla nodiflora*" AND ("phytochemical analysis" OR "phytochemistry") AND "flavonoids"

"*Abrus precatorius*" AND "flavonoids"

"*Abrus precatorius*" AND "phytochemistry"

"*Abrus precatorius*" AND ("phytochemical analysis" OR "phytochemistry") AND "flavonoids"

"*Spirodela intermedia*" AND "flavonoids"

"*Spirodela intermedia*" AND "phytochemistry"

"*Spirodela intermedia*" AND ("phytochemical analysis" OR "phytochemistry") AND "flavonoids"

"*Colocasia esculenta*" AND "flavonoids"

"*Colocasia esculenta*" AND "phytochemistry"

"*Colocasia esculenta*" AND ("phytochemical analysis" OR "phytochemistry") AND "flavonoids"