



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Análisis proteómico *in silico* en la ruta de flavonoides del cacao ecuatoriano (*Theobroma Cacao*).

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Patricio Javier Chamorro Sevilla

Tutor: Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

Ambato – Ecuador

Julio - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 23 de Junio de 2025.



Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

1803160272

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Patricio Javier Chamorro Sevilla, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Patricio Javier Chamorro Sevilla

1850023902

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Patricio Javier Chamorro Sevilla

1850023902

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471



Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

1803601853

Ambato, 08 de Julio de 2025

DEDICATORIA

“Ningún camino hacia el conocimiento se recorre solo; cada paso está acompañado por aquellos que creyeron en ti antes que tú mismo.”

Dedico este trabajo, ante todo, a Dios y la Virgencita, quien ha sido mi guía, mi fuerza y mi refugio. Su presencia me sostuvo en los momentos de mayor incertidumbre, iluminó mi mente cuando las ideas no fluían y me dio serenidad en medio del cansancio.

A mis padres, que son la base firme sobre la que he construido mis sueños. Gracias por su amor sin medida, por los sacrificios que nunca reclamaron y por enseñarme que la perseverancia, la humildad y el trabajo honesto son el verdadero camino al éxito, este logro es suyo.

A mi hermana, por entender mis silencios y celebrar mis logros como si fueran propios. Su presencia ha sido una fuente de motivación y cariño incondicional.

A mis seres queridos que ya no están en este plano, pero que viven en mi recuerdo y corazón. Su ausencia se convirtió en motivación, y este trabajo también les pertenece. Se que desde el cielo este logro les hará muy felices.

AGRADECIMIENTO

Agradezco, en primer lugar, a Dios y a la Virgencita, por darme la vida y ser mi refugio en los momentos difíciles, por darme la fuerza para siempre continuar y por recordarme que los sueños, cuando se trabajan con el corazón, se hacen realidad.

A Margoth, mi madre que con su inmenso amor hizo que cada paso en este camino universitario se haga fácil, por sus oraciones, por su fe inquebrantable en mí aún cuando yo dudaba. Por sus abrazos que sanan y por estar siempre, sin pedir nada a cambio. Eres mi fuerza silenciosa, mi impulso diario y mi ejemplo de entrega y corazón. Este logro lleva su nombre escrito con letras doradas.

A Patricio, mi padre que me enseñó que la constancia y el esfuerzo son el camino hacia cualquier meta. Por ser ese pilar firme que nunca se quebró, incluso cuando las circunstancias eran difíciles. Por cada consejo, por cada silencio sabio y por ese amor que se expresa más con hechos que con palabras. Este logro también es suyo.

A mi hermana, por ser mi consejera y sostén emocional en este camino lleno de retos, tu presencia ha sido un impulso silencioso pero fundamental.

A mi tutor, por su orientación, exigencia y paciencia. Gracias por compartir su conocimiento y por creer en mi capacidad. Su orientación clara y exigente fue fundamental para dar forma a esta investigación, impulsándome siempre a dar lo mejor de mí con criterio, rigor y compromiso.

A Fabián por ser más que familia, por ser un hermano. A Daniela que estuvo presente en todo este camino a pesar de todo, a mis amigos más cercanos los que estuvieron presentes cuando más los necesité, con palabras, abrazos o silencios.

Y finalmente, a todas las personas que, de alguna forma, fueron parte de este proceso: gracias por caminar a mi lado en esta etapa que hoy culmina con gratitud y orgullo.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN EJECUTIVO	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Introducción a los flavonoides y su importancia en las plantas	1
1.1.1.1 Definición y clasificación de flavonoides.....	1
1.1.1.2 Biosíntesis de flavonoides.....	2
1.1.1.3 Función de flavonoides.....	3
1.1.1.4 Rutas de flavonoides.....	3
1.1.1.5 Clasificación y función de las enzimas	4
1.1.1.6 Mecanismos regulatorios de las enzimas	5
1.1.1.7 Bioinformática y análisis in silico en biotecnología	5
1.1.1.8 Theobroma cacao: Contexto biológico y genómico	6
1.1.1.9 Aplicaciones biotecnológicas y potencial en la mejora del cacao	6
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....	7
2.1 Materiales	7
2.2 Métodos.....	8
2.2.1 Clasificación de las secuencias genómicas que identifican y caracterizan los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de flavonoides	8

2.2.2 Aplicación del análisis proteómico para estudiar las proteínas implicadas y su interacción	8
2.2.3 Integración de datos para construir modelos predictivos que simulen la interacción molecular y permitan mejorar los mecanismos de regulación en la producción de flavonoides	9
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
3.1 Análisis y discusión de los resultados.....	10
3.1.1 Clasificación de las secuencias genómicas presentes en la ruta de biosíntesis de flavonoides	10
3.1.1.1 Enzima Chalcona sintasa	10
3.1.1.2 Trans-cinnamate 4-monooxygenasa.....	12
3.1.1.3 Chalcona isomerasa.....	15
3.1.2 Aplicación del análisis proteómico para estudiar las proteínas implicadas y su interacción	18
3.1.2.1 Redes de interacción proteína-proteína de Chalcona sintasa.....	18
3.1.2.2 Modelo tridimensional de Chalcona sintasa	20
3.1.2.4 Redes de interacción proteína-proteína de Trans-cinnamate 4-monooxygenasa.....	20
3.1.2.5 Modelo tridimensional predicho de Trans-cinnamate 4-monooxygenasa...	22
3.1.2.7 Redes de interacción proteína-proteína de Chalcona isomerasa	23
3.1.2.8 Modelo tridimensional predicho de Chalcona isomerasa	25
3.1.3 Integración de datos para construir modelos predictivos que simulen la interacción molecular y permitan mejorar los mecanismos de regulación en la producción de flavonoides	26
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES	44
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	46
ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Herramientas bioinformáticas.	7
Tabla 2. Equipos.....	7
Tabla 3. Características de la enzima Chalcona sintasa.	10
Tabla 4. Características de la enzima Trans-cinnamate-4-monooxygenasa.	13
Tabla 5. Características de la enzima Chalcona isomerasa.	15
Tabla 6. Interacciones funcionales de Chalcona sintasa.	18
Tabla 7. Interacciones funcionales de Trans-cinnamate 4-monooxygenasa.	21
Tabla 8. Interacciones funcionales de Chalcona isomerasa.	24
Tabla 9. Genes presentes en la activación de la biosíntesis de los flavonoides.	27
Tabla 10. Funcionalidad enzimática de genes clave involucrados en la biosíntesis de fenilpropanoides y flavonoides en <i>Theobroma cacao</i>	27
Tabla 11. Genes de las rutas alternativas.	29
Tabla 12. Rutas alternativas para la biosíntesis de los flavonoides.	30
Tabla 13. Relación de proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides y fenilpropanoides según STRING, KEGG y UniProt.	31
Tabla 14. Resultados del <i>docking molecular</i> entre la enzima Flavonol sintasa y el ligando.....	37
Tabla 15. Modelos viables entre la enzima Flavonol sintasa y el ligando.	38
Tabla 16. Resultados del <i>docking molecular</i> entre la enzima Flavanona 3-hidroxilasa y el ligando.....	40
Tabla 17. Modelo viable entre la enzima Flavanona 3-hidroxilasa y el ligando.	41
Tabla 18. Rutas alternativas y producto final.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y tipos de flavonoides.....	2
Figura 2. Rutas biosintéticas de compuestos fenólicos.....	4
Figura 3. Secuencia de 393 aminoácidos de Chalcona sintasa.	10
Figura 4. Nombres de las enzimas con un porcentaje alto de homología con Chalcona sintasa.....	11
Figura 5. Predicción de hélices transmembrana de Chalcona sintasa.....	12
Figura 6. Secuencia de 519 aminoácidos de Trans-cinnamate-4-monooxigenasa....	13
Figura 7. Nombres de las enzimas con un porcentaje alto de homología con Trans-cinnamate-4-monooxigenasa.....	13
Figura 8. Predicción de hélices transmembrana de Trans-cinnamate-4-monooxigenasa.....	14
Figura 9. Secuencia de 231 aminoácidos de Chalcona isomerasa.	15
Figura 10. Resumen gráfico de la homología de la secuencia de aminoácidos de Chalcona isomerasa.....	16
Figura 11. Nombres de las enzimas con un porcentaje alto de homología con Chalcona isomerasa.....	16
Figura 12. Predicción de hélices transmembrana de Chalcona isomerasa.....	17
Figura 13. Red de interacción con puntuación más alta.	18
Figura 14. Estructura tridimensional de Chalcona sintasa.....	20
Figura 15. Red de interacción con puntuación más alta de trans-cinnamate 4-monooxigenasa.....	21
Figura 16. Estructura tridimensional de Trans-cinnamate 4-monooxygenasa.....	23
Figura 17. Red de interacción con puntuación más alta de Chalcona isomerasa.....	24
Figura 18. Estructura tridimensional de Chalcona isomerasa.	25
Figura 19. Red de Interacción proteica alternativa.	26
Figura 20. Análisis de enriquecimiento en vías STRING.....	32
Figura 21. Análisis de Enriquecimiento en Vías Metabólicas KEGG.....	32
Figura 22. Análisis de Enriquecimiento en Vías Metabólicas UniProt.	33
Figura 23. Predicción estructural de proteínas del cacao por rango.	34
Figura 24. Cobertura e identidad de la secuencia de proteínas del cacao.	34
Figura 25. Predicción del IDDT por posición en proteínas del cacao.	35
Figura 26. Unión sustrato enzima de F3H.	36

Figura 27. Representación esquemática del docking.....	36
Figura 28. Resultado del docking molecular de FLS y parámetros presentes.	39
Figura 29. Resultado del docking molecular F3H y parámetros presentes.....	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados del docking molecular, obtenidos de AutoDockTools.	52
--	----

RESUMEN EJECUTIVO

La presente investigación tuvo como objetivo analizar in silico la ruta de flavonoides del cacao ecuatoriano (*Theobroma cacao*), mediante herramientas bioinformáticas que permitieron caracterizar secuencias genómicas, evaluar interacciones proteína-proteína y modelar estructuras moleculares. Se identificaron y clasificaron genes clave como *chalcona sintasa* (CHS), *chalcona isomerasa* (CHI) y *trans-cinnamate 4-monooxygenasa* (C4H), esenciales en la biosíntesis de flavonoides. A través de alineamientos BLAST y bases de datos como KEGG y UniProt, se determinó una alta homología con otras especies vegetales, validando su función biológica. El análisis proteómico empleando STRING y TMHMM reveló redes de interacción funcionales y físicas entre proteínas que actúan de forma coordinada en metabolones, incrementando la eficiencia biosintética. Las estructuras tridimensionales obtenidas con AlphaFold y SWISS-MODEL mostraron alta precisión y estabilidad, permitiendo simular interacciones moleculares con ligandos como ATP mediante docking, validando su afinidad y funcionalidad. Además, se identificaron rutas metabólicas alternativas con enzimas como *flavanone 3-hydroxylase* y *flavonol synthase*, que permiten la biosíntesis de flavonoles incluso en condiciones adversas. Estas rutas proponen una diversificación química con beneficios antioxidantes, defensivos y sensoriales. Los resultados obtenidos permiten establecer modelos predictivos aplicables a la mejora genética y metabólica del cacao, aportando al desarrollo de cultivos funcionales con mayor resistencia y calidad.

El enfoque in-silico demuestra ser una herramienta poderosa para comprender y optimizar rutas metabólicas de interés biotecnológico, consolidando estrategias sostenibles para el aprovechamiento del cacao ecuatoriano en industrias alimentarias, farmacéuticas y agrícolas.

Palabras clave: Flavonoides, *Theobroma cacao*, proteómica in silico, biosíntesis, enzimas.

ABSTRACT

This research aimed to analyze *in silico* the flavonoid biosynthesis pathway of Ecuadorian cacao (*Theobroma cacao*), using bioinformatic tools to characterize genomic sequences, evaluate protein–protein interactions, and model molecular structures. Key genes such as *chalcone synthase* (CHS), *chalcone isomerase* (CHI), and *trans-cinnamate 4-monooxygenase* (C4H) were identified and classified, playing essential roles in the flavonoid biosynthetic pathway. Through BLAST alignments and databases like KEGG and UniProt, a high degree of homology with other plant species was confirmed, validating their biological function. Proteomic analysis via STRING and TMHMM revealed functional and physical interaction networks among proteins operating in coordinated metabolons, enhancing biosynthetic efficiency. Three-dimensional structures generated by AlphaFold and SWISS-MODEL showed high accuracy and stability, enabling molecular docking simulations with ligands such as ATP, validating their affinity and biological activity. Moreover, alternative metabolic routes involving enzymes like *flavanone 3-hydroxylase* and *flavonol synthase* were identified. These enable flavonol biosynthesis under stress conditions and contribute to the chemical diversification of bioactive compounds with antioxidant, defensive, and sensory properties. The results support the development of predictive models applicable to the genetic and metabolic improvement of cacao, promoting the production of functional crops with enhanced resistance and quality. The *in-silico* approach proves to be a powerful tool for understanding and optimizing metabolic pathways of biotechnological interest, consolidating sustainable strategies for enhancing Ecuadorian cacao in food, pharmaceutical, and agricultural industries.

Keywords: Flavonoids, *Theobroma cacao*, *in silico* proteomics, biosynthesis, enzymes.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Introducción a los flavonoides y su importancia en las plantas

1.1.1.1 Definición y clasificación de flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de los polifenoles, caracterizados por su estructura básica de dos anillos bencénicos (A y B) conectados por un heterociclo oxigenado (C). Se clasifican en varios subgrupos, incluyendo flavonoles, flavonas, antocianinas, flavanonas, isoflavonas y chalconas, de acuerdo con el patrón de hidroxilación, metoxilación y glucosilación (Farmacéutica Mexicana et al., 2012). Esta clasificación está ligada a las funciones biológicas, tanto en plantas como en distintos organismos de consumidores. En cacao, los flavonoides se distribuyen ampliamente en granos y tejidos, representando un componente esencial para su calidad sensorial y bioactividad (Montse & Prado, 2021).

Los flavonoides poseen una diversidad de propiedades bioactivas que contribuyen directamente a la salud humana y vegetal. Entre ellas, destacan sus actividades antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, y neuroprotectora, atribuidas a su capacidad de neutralizar radicales libres y modular procesos enzimáticos (Gallego et al., 2021). En cacao, se asocian con beneficios cardiovasculares, hepáticos y neurológicos, gracias a compuestos como las procyanidinas y catequinas. Además, estas propiedades potencian su uso en aplicaciones farmacéuticas y alimentarias funcionales, promoviendo la innovación biotecnológica para el desarrollo de cultivos y productos con alto valor agregado por Lujano et al., 2019.

1.1.1.2 Biosíntesis de flavonoides

El metabolismo secundario de las plantas es responsable de la generación de una amplia variedad de compuestos con funciones y estructuras diversas, entre los cuales se destacan los flavonoides, un tipo de compuestos fenólicos que derivan del fenol. La síntesis de estos flavonoides está estrechamente relacionada con la ruta de las pentosas fosfato, donde la Eritrosa 4-fosfato, producto de esta vía, reacciona con el ácido fosfoenolpirúvico para originar el ácido shikímico (Dias et al., 2015). Este compuesto conduce a la síntesis de aminoácidos aromáticos, especialmente la fenilalanina, que mediante su desaminación forma ácido cinámico. A partir de este ácido se generan, reacciones de hidroxilación y sustitución generan precursores clave de los flavonoides, como el ácido ferúlico y el ácido cafeico.

Los flavonoides forman parte del metabolismo secundario de las plantas y se caracterizan por poseer una estructura polifenólica con grupos hidroxilo. El término "flavonoide" abarca una amplia gama de compuestos de origen natural, todos ellos con un esqueleto básico. Estos compuestos, con destacada actividad biológica, cumplen diversas funciones esenciales dentro de las plantas, entre ellas se incluyen el transporte a través de los tejidos y la localización en las células fotosintetizadoras. Asimismo, participan de manera directa en procesos relacionados con la protección y la señalización celular (Weston & Mathesius, 2020).

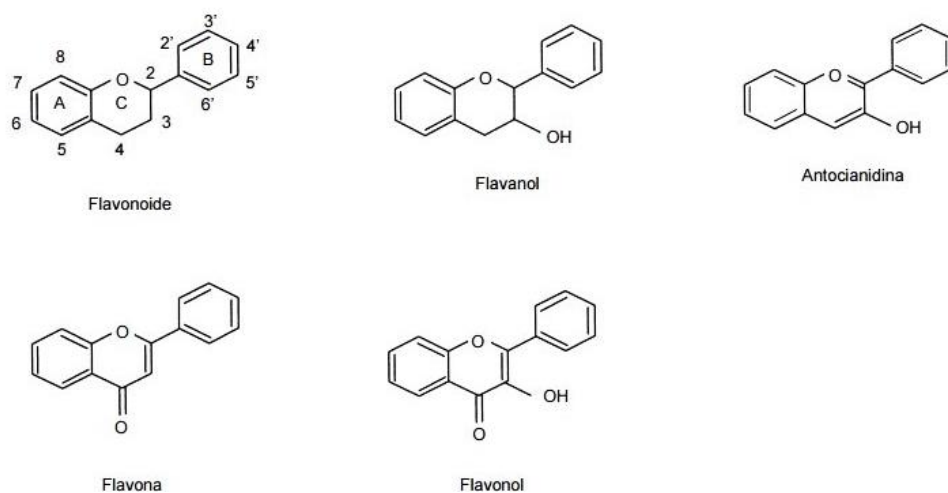


Figura 1. Estructura y tipos de flavonoides.

1.1.1.3 Función de flavonoides

Los efectos de los compuestos bioactivos están determinados por su estructura química. Según Kumar et al (2013), incluyendo la clase a la que pertenecen, su nivel de hidroxilación y polimerización, así como la presencia de grupos funcionales y conjugaciones. Estos factores influyen directamente en las propiedades biológicas de las moléculas, lo que determina su potencial farmacológico y funcionalidad dentro del organismo humano (Y. Wang et al., 2023).

La presencia de grupos hidroxilo en los compuestos bioactivos les confiere la capacidad de actuar como antioxidantes, mediante la quelación de metales y la neutralización de radicales libres. Su incorporación a la dieta humana está asociada a beneficios para el sistema cardiovascular, reducción del riesgo de enfermedades neurodegenerativas, fortalecimiento de la memoria, hepatoprotección, efectos antiinflamatorios, antivirales, anticancerígenos y más, según la revista *Neurotherapeutics* (Singh et al., 2019) .

En las plantas, estos compuestos cumplen un papel esencial como defensa antioxidativa frente a distintos tipos de estrés abiótico y biótico. Contribuyen a la pigmentación de flores y frutos, siendo cruciales en la polinización y protección contra infecciones, radiación UV y calor. Además, regulan el crecimiento vegetal y fortalecen la capacidad de adaptación frente a factores adversos (Chen et al., 2023).

1.1.1.4 Rutas de flavonoides

El origen de los flavonoides al igual que los demás compuestos fenólicos, para este proceso se tiene dos rutas, la del ácido malónico y la del ácido shikímico, siendo la segunda la responsable de la biosíntesis de estos compuestos en plantas.

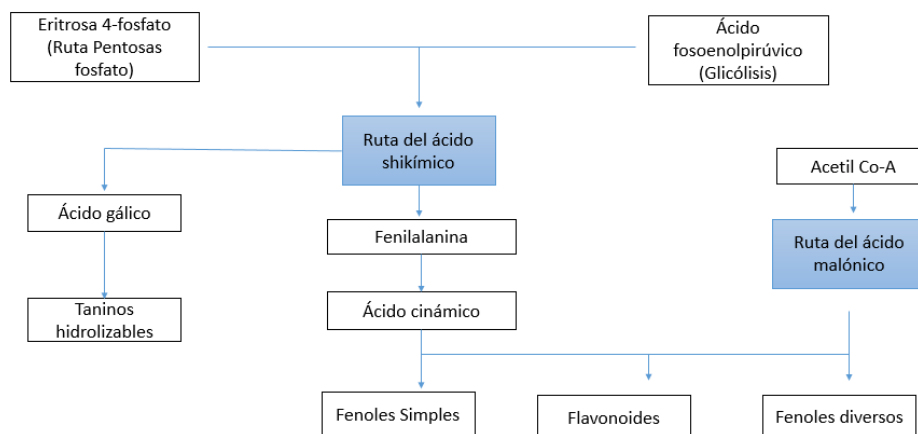


Figura 2. Rutas biosintéticas de compuestos fenólicos.

Las enzimas son biomoléculas presentes en estos procesos las mismas que tiene un origen proteico, constituidas por cadenas polipeptídicas que catalizan reacciones químicas, estas trabajan en condiciones óptimas de temperatura, presión, pH, de manera individual o formando complejos proteína – proteína dentro de la ruta metabólica, a estos se los denomina metabolones.

1.1.1.5 Clasificación y función de las enzimas

Las enzimas son biomoléculas catalizadoras que aceleran reacciones químicas específicas en sistemas biológicos. Se clasifican según el tipo de reacción que catalizan: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (Martínez Cuesta et al., 2015). Esta clasificación facilita su estudio funcional y aplicación biotecnológica. En la biosíntesis de flavonoides, cada clase enzimática desempeña un papel crucial, desde la oxidación inicial de precursores hasta la formación de estructuras polifenólicas, contribuyendo a la diversidad estructural y funcional de estos compuestos (Ramírez & Ayala, 2014).

En la ruta biosintética de flavonoides, las oxidorreductasas catalizan reacciones de oxidación-reducción que convierten compuestos iniciales en reactivos. Las transferasas y liasas promueven la transferencia y formación de enlaces para generar nuevos esqueletos moleculares. Esta actividad enzimática determina la diversidad y

cantidad de flavonoides presentes en el cacao. Comprender su clasificación y función permite identificar objetivos específicos para mejorar la producción de compuestos bioactivos mediante herramientas bioinformáticas (Liu et al., 2021).

1.1.1.6 Mecanismos regulatorios de las enzimas

La regulación enzimática de la biosíntesis de flavonoides ejecuta un proceso complejo que principalmente involucra niveles de control. En el nivel transcripcional, la expresión génica se modula mediante factores ambientales como luz, temperatura y estrés. A nivel postraduccional, las modificaciones químicas como fosforilación y acetilación afectan la actividad enzimática. Además, la formación de metabolitos permite la interacción coordinada de enzimas para incrementar la eficiencia biosintética (Chen et al., 2023). Herramientas bioinformáticas como KEGG y STRING ayudan a predecir interacciones proteína-proteína, facilitando el estudio de estos mecanismos y su potencial manipulación para optimizar la producción de flavonoides.

1.1.1.7 Bioinformática y análisis in silico en biotecnología

Las herramientas bioinformáticas como KEGG, NCBI y STRING facilitan el análisis de secuencias genómicas, predicción de interacciones proteicas y modelado de rutas metabólicas. Estas plataformas permiten comprender la biosíntesis de flavonoides y diseñar estrategias para optimizar su producción en cacao mediante análisis in silico basados (González et al., 2016).

La predicción de estructuras tridimensionales de proteínas y modelos moleculares es fundamental para comprender la función y la interacción de las enzimas en la biosíntesis de flavonoides. Herramientas como AlphaFold permiten generar modelos estructurales con alta precisión, mientras que programas como AutoDock simulan el docking proteína-ligando para estudiar afinidades y posibles sitios activos. Estas tecnologías facilitan la identificación de dianas para optimizar la producción de compuestos bioactivos en cacao (Pettersen et al., 2021).

1.1.1.8 Theobroma cacao: Contexto biológico y genómico

Theobroma cacao es una planta perenne originaria de las regiones tropicales de América Central y del Sur, adaptada a climas húmedos y cálidos. Se caracteriza por sus hojas brillantes, flores pequeñas y mazorcas alargadas que contienen las semillas, base fundamental para la producción de chocolate (Farmacéutica Mexicana et al., 2012). Su genoma ha sido secuenciado, revelando una compleja organización genética con variabilidad que influye en la calidad y resistencia del cultivo. El cacao es una fuente rica en flavonoides, compuestos que contribuyen significativamente a sus propiedades sensoriales y funcionales. Los flavonoides, especialmente procyanidinas y catequinas, están asociados con beneficios antioxidantes, antiinflamatorios y cardioprotectores, lo que posiciona al cacao como un alimento funcional con gran potencial biotecnológico (Vásquez, 2024). Entender su contexto biológico y genómico es esencial para optimizar la producción de estos compuestos bioactivos mediante técnicas moleculares y bioinformáticas.

1.1.1.9 Aplicaciones biotecnológicas y potencial en la mejora del cacao

Las aplicaciones biotecnológicas en *Theobroma cacao* buscan optimizar la producción de flavonoides mediante la manipulación genética, selección asistida y el uso de herramientas bioinformáticas para mejorar la expresión y regulación de las enzimas implicadas en su biosíntesis (Gallego et al., 2021). La integración de análisis in silico y modelado molecular permite identificar dianas específicas para aumentar la producción de compuestos bioactivos, elevando la calidad y funcionalidad del cacao. Estas mejoras impactan positivamente en la industria agrícola al desarrollar cultivos más resistentes y productivos, y en la industria alimentaria al ofrecer productos con mayores beneficios para la salud (Dias et al., 2015). Así, la biotecnología no solo incrementa el valor agregado del cacao, sino que también impulsa la sostenibilidad y competitividad del sector.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

El presente trabajo de titulación se realizó con un enfoque experimental “in silico” se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En la **Tabla 1** se detallan los recursos bioinformáticos utilizados en el desarrollo de la investigación y en la **Tabla 2** se especifican los equipos utilizados en la investigación.

Tabla 1.

Herramientas bioinformáticas.

Recursos	Dirección web
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
UniProt	https://www.uniprot.org/
Cytoscape	https://cytoscape.org/
STRING	https://apps.cytoscape.org/apps/stringapp
KEGG Mapper	https://www.genome.jp/kegg/mapper/
TMHMM 2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
AlphaFold	https://alphafold.ebi.ac.uk/
AutoDock Tools	https://autodock.scripps.edu/download-autodock4/
Chimera	https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
Protein Data Bank	https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/
SWISS- MODEL	https://swissmodel.expasy.org/

Tabla 2.

Equipos.

Recursos	Cantidad
Computadora	1
Servicio de internet con Router	1

2.2 Métodos

2.2.1 Clasificación de las secuencias genómicas que identifican y caracterizan los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de flavonoides

Se recopiló información en bases de datos científicas como: NCBI, KEGG y Cacao Genome Database que proporcionaron información sobre el cacao y la ruta de los flavonoides, esto se usó para la identificación de enzimas clave en la biosíntesis, se seleccionó proteínas de interés relacionadas con la ruta biosintética de flavonoides, las secuencias obtenidas fueron en formato FASTA.

Para el alineamiento y anotación se usó BLAST, confirmando la identidad de las secuencias, posteriormente se empleó un alineamiento múltiple. Además, se verificaron los valores de identidad de las alineaciones.

2.2.2 Aplicación del análisis proteómico para estudiar las proteínas implicadas y su interacción

Se utilizó STRING y Cytoscape con secuencias obtenidas desde UniProt y Protein Data Bank (PDB), analizando interacciones funcionales de las enzimas identificadas con las proteínas presentes en el metabolismo de flavonoides del cacao, se evaluó las conexiones directas (interacciones físicas) e indirectas (interacciones funcionales basadas en coexpresión y evidencia experimental).

Para este análisis se empleó TMHMM, una herramienta especializada en la identificación de dominios transmembrana in silico, esto permitió determinar si las enzimas clave en la biosíntesis de flavonoides tienen regiones transmembrana, o posibles anclajes en función de la membrana celular. Además, se analizó el papel específico de cada enzima usando la base de datos KEGG Pathway. A partir de esa información se evaluó si las enzimas de interés están directamente involucradas en la ruta metabólica de interés y su posible localización dentro de la célula.

2.2.3 Integración de datos para construir modelos predictivos que simulen la interacción molecular y permitan mejorar los mecanismos de regulación en la producción de flavonoides

Para la predicción in silico, de las estructuras tridimensionales de enzimas involucradas en la biosíntesis de flavonoides del cacao, se emplea AlphaFold, se seleccionará todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de flavonoides obtenidas en la base de datos KEEG Pathway, se verificará la calidad de las secuencias. Se ingreso las secuencias en Alphafold y se determinó el número de modelos generados, el uso de plantillas estructurales y si proteínas homologas. Además, se evaluó la confiabilidad de los modelos mediante el puntaje de pLDDT (predicted Local Distance Difference Test).

Se descargó las estructuras de proteínas clave en la ruta de biosíntesis obtenidas con AlphaFold y se probó la afinidad de estas estructuras empleando AutoDock Tools o Chimera, los ligandos se obtuvieron de la base de datos bioinformática PubChem y se realizó un docking para verificar las estructuras y ligandos. Esto permitió predecir puntos de control enzimáticos con mejor afinidad.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.1.1 Clasificación de las secuencias genómicas presentes en la ruta de biosíntesis de flavonoides

3.1.1.1 Enzima Chalcona sintasa

En base a los datos de KEGG se detalla la biosíntesis de flavonoides, se incluye las secuencias de aminoácidos de enzimas que están dentro de este proceso, al examinar la información de la primera enzima que participa en este proceso Chalcona sintasa (CHS), encontramos características que fueron identificadas con otras enzimas de la misma categoría.

GenomeNet

>tcc:18592508 K00660 chalcone synthase [EC:2.3.1.74] | (RefSeq) chalcone synthase (A)
MASEKNLETQQAEQVTLAIGTANPPHCFYQADYPDFYFRVTKSEHKIELKDKFKRICE
RSSIKKRYMHLTEDIIKENPNLIIYKAPSFARQDILVTEVPKLGQEAALKAKEWGQPI
SKITHLIFCTSSGINMPSADNQLARLIGLEPSVQKFMIIYQQGCFAGTALRLSKDLAKNN
AGARVLIVCSELMVECFQPPSETHLDILVGSALFSDGAAAAIVGANPDATINERPSFQIV
SAHQTIIPDSADIIVAKIREMGMEYYLSRDLPKCIANNIEQCLIEALIPFGIGDWKTLFY
IVHPGGPAVLRGVEEKLGLGREKLKASWHVLSYGNMWSPSVLFILDEMCKMSILEGKAS
SGDGLWGVLFGFGPGLTVETVVLRSFALNSCR

BLAST

Figura 3. Secuencia de 393 aminoácidos de Chalcona sintasa.

Nota: Obtenido de KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis – *Theobroma cacao*.

Tabla 3.

Características de la enzima Chalcona sintasa.

Ítem	Descripción
Código en KEGG	18592508

Ítem	Descripción
Organismo	<i>Theobroma cacao</i>
Clase	Transferasa
Reacción	3 malonil-CoA + 4-coumaroil-CoA → 4 CoA + naringenina chalcona + 3 CO ₂
Substrato	Malonil-CoA, 4-coumaroil-CoA
Producto	CoA + Naringenina chalcona + CO ₂
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides, ritmo circadiano de las plantas.

Nota: Información de KEGG PATHWAY.

Posteriormente se alineó la secuencia de aminoácidos de la Chalcona sintasa contra las secuencias disponibles en la base de datos para lo que se utilizó BLAST protein-protein. En la figura 4 se visualiza el grado de homología que presenta la secuencia Chalcona sintasa, se muestran las secuencias de los organismos homólogos, los cuales se ordenan de acuerdo con parámetros tales como el max score, query cover, E value y porcentaje de identidad.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
☒	PREDICTED: chalcone synthase [Theobroma cacao]	Theobroma cac...	815	815	100%	0.0	100.00%	393	XP_017980892.1
☒	Chalcone and stilbene synthase family protein [Theobroma cacao]	Theobroma cac...	810	810	100%	0.0	99.49%	393	EQY16578.1
☒	Chalcone/stilbene synthase [Theobroma cacao]	Theobroma cac...	804	804	100%	0.0	97.99%	398	WRX30252.1
☒	hypothetical protein POUND7_017533 [Theobroma cacao]	Theobroma cac...	804	804	100%	0.0	98.22%	393	KAK6277210.1
☒	hypothetical protein QUC31_001107 [Theobroma cacao]	Theobroma cac...	796	796	100%	0.0	97.46%	393	KAK6257648.1

Figura 4. Nombres de las enzimas con un porcentaje alto de homología con Chalcona sintasa.

Nota: Resultados obtenidos de NCBI.

La Chalcona sintasa participa en el proceso de la biosíntesis de flavonoides, lo que se verifica experimentalmente a través de técnicas de ADN recombinante, se ha demostrado que tiene relación directa con el color de las hojas de las plantas de cacao (Recinos et al., 2024).

La enzima presenta una alta probabilidad de localización extracelular a lo largo de casi toda la secuencia (línea anaranjada), se detecta también una región transmembrana al final de la proteína (pico lila), esto permite comprender que presenta un anclaje de membrana en el extremo C-terminal.

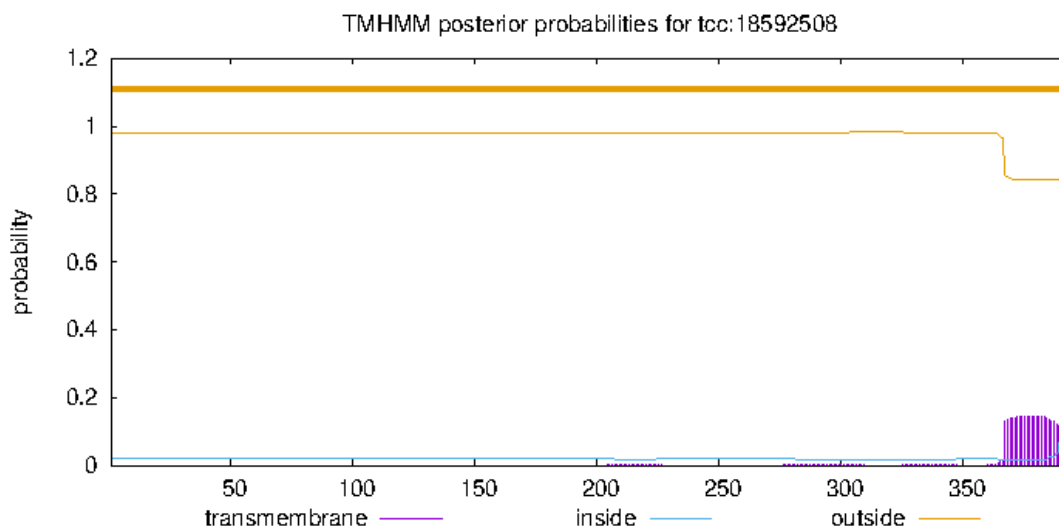


Figura 5. Predicción de hélices transmembrana de Chalcona sintasa.

Nota: Se introdujo el FASTA de Chalcona sintasa, con la opción de generar grafica.

3.1.1.2 Trans-cinnamate 4-monooxygenasa

La enzima Trans-cinnamate-4-monooxygenasa (C4H), desempeña un papel importante en la producción de flavonoides en el cacao, ya que contribuye a la formación de compuestos antioxidantes y fenólicos (Tang et al., 2019). Estos compuestos tienen un impacto significativo tanto en la calidad nutricional como en las características sensoriales del cacao, influenciando en el sabor, color y propiedades saludables.

GenomeNet

```
>tcc:18587499 K00487 trans-cinnamate 4-monooxygenase [EC:1.14.14.91] | (RefSeq) trans-cinnamate 4-monooxygenase (A)
MTLFLSLQPQTNTQMDLLLEKALVSLFITVILAILISKLRKFRFRLPPGPIPVVFGNW
LQVGDDLNRNLTDLAKKFGDIFLLRMGQRNLVVSSPELAKEVLHTQGVEFGSRTRNVV
FDIFTGGQDMVFVYGEHWRKMRRIMTVPFFTNKVVQYRHGWEDEVARVVEDVRKNPE
AATNGIVLRRRLQLMYYNNMYRIMFDRRFESEDDPLFVKLKALNGERSRLAQSFYNYGD
FIPILRPFLRGYKLCKEVEKEMRLQLFKDYFLEERKNLASTTISDNNALKCAIDHILDAQ
QKGEINEDNVLYIVENINVAIETTLWSIEWGIAELVNHPEIQQKLREIDTVLGPVGPV
TEPDTHKLPYLQAVIKETLRLMAIPLLVPHMNLHDAKGGYDIPAESKVLVNAWLANN
PAKWKNPFEFRPERFFEEAKVEANGNDFRYLPFGVGRRSCPGIILALPILGITLGRLVQ
NFELLPPPGQAKLDTSEKGGQFSLHILKHSTIVAKPRVF
```

BLAST

Figura 6. Secuencia de 519 aminoácidos de Trans-cinnamate-4-monooxygenasa.

Nota: Obtenido de KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis – *Theobroma cacao*.

Tabla 4.

Características de la enzima Trans-cinnamate-4-monooxygenasa.

Ítem	Descripción
Código en KEGG	18587499
Organismo	<i>Theobroma cacao</i>
Clase	Oxidoreductasa
Reacción	trans-cinnamate + NADPH + H ⁺ + O ₂ → 4-hidroxicinnámico + NADP ⁺ + H ₂ O
Substrato	Ácido trans-cinámico (trans-cinnamate)
Producto	Ácido p-cumárico (4-hidroxicinnámico)
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios que deriva de la fenilalanina, biosíntesis de flavonoides.

Nota: Información de KEGG PATHWAY.

Tras realizarse la alineación de la secuencia de aminoácidos de la Trans-cinnamate-4-monooxygenasa con las secuencias disponibles en la base de datos BLAST protein-protein, se obtuvieron los resultados, los cuales fueron ordenados según parámetros como el max score, query cover, E value y el porcentaje de identidad, destacándose la secuencia XP_007011385.2 con una identidad y cobertura del 100%. Además, en cacao, esta ruta produce catequina, epicatequina y procianidinas que constituyen los principales polifenoles de los granos de cacao.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	PREDICTED: trans-cinnamate 4-monooxygenase [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	1065	1065	100%	0.0	100.00%	519	XP_007011385.2
✓	Cinnamate 4-hydroxylase [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	1036	1036	97%	0.0	100.00%	505	EQY20175.1
✓	hypothetical protein SCA6_001121 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	1034	1034	97%	0.0	99.80%	505	KAK6228781.1
✓	hypothetical protein SCA6_009831 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	915	915	97%	0.0	90.50%	505	KAK6234494.1

Figura 7. Nombres de las enzimas con un porcentaje alto de homología con Trans-cinnamate-4-monooxygenasa.

Nota: Resultados obtenidos de NCBI.

La trans-cinnamate 4-monooxigenasa (C4H) es esencial en la biosíntesis de flavonoides en cacao, ya que convierte el ácido trans-cinámico en ácido p-cumárico. Este paso es crucial para la formación de compuestos antioxidantes que mejoran la calidad sensorial y nutricional del cacao (Culcay, 2024). En el metabolismo general de *T. cacao*, C4H es fundamental para generar intermediarios metabólicos hacia rutas que soportan estructura y resistencia de la planta.

En la figura 8 se muestra la probabilidad de localización de C4H, se observa una alta probabilidad (≈ 1.0) de que el segmento inicial corresponda a una región transmembrana, lo cual se indica con picos en color lila. Posteriormente, se identifica una alta probabilidad de localización extracelular (línea anaranjada) a lo largo de la mayor parte de la proteína, indicando una orientación hacia el exterior de la membrana. Se observa también una región intracelular (línea celeste) que presenta baja probabilidad, sin embargo, tiene una restricción en ciertos tramos intermedios de la secuencia. Trans-cinnamate-4-monooxigenasa posee un dominio transmembrana en el extremo N-terminal, lo cual es indicativo de una posible función relacionada con el transporte o señalización a través de membranas biológicas. Grafica de TMHMM Server.

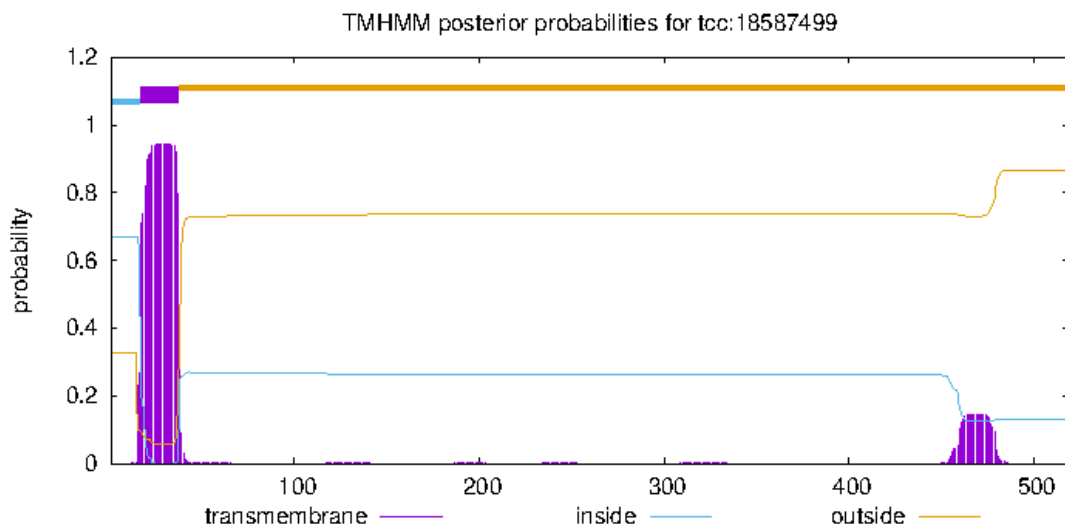


Figura 8. Predicción de hélices transmembrana de Trans-cinnamate-4-monooxigenasa.

Nota: Los tipos de entrada en TMHMM aceptados son FASTA, secuencia simple o identificadores de secuencia.

3.1.1.3 Chalcona isomerasa

La chalcona isomerasa (CHI) es una enzima que está presente en la biosíntesis de flavonoides. Cataliza la conversión intramolecular de chalconas en flavanonas, un proceso esencial para la formación de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes (Wani et al., 2017). Esta reacción ocurre en plantas, como el cacao, y contribuye significativamente a la producción de metabolitos secundarios implicados en la resistencia de la planta contra patógenos.

GenomeNet

```
>tcc:18586269 K01859 chalcone isomerase [EC:5.5.1.6] | (RefSeq) chalcone--flavonone isomerase (A)
MSTSPCVAGIQVENVTFPNPKPGSTKTLFLGGAGERGLEIQGKFKFTAIGVYLEEIA
VESLAVKWKGKSAEVLTSVEFFRDIVTGAFKFIKRVTTILPLTGQQYSEKVSENCVAIW
KSLGLYTDAAEAKAEKFLVFKDENFPPGSSILFALSAHGSLTISFSKDDSSVPEVGTAVI
ENKLLANAVLESIVGKDGVSVPARKSMASRLSALFDDTVEKAAQNGKPECQ
```

[BLAST](#)

Figura 9. Secuencia de 231 aminoácidos de Chalcona isomerasa.

Nota: Obtenido de KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis – *Theobroma cacao*.

Tabla 5.

Características de la enzima Chalcona isomerasa.

Ítem	Descripción
Código en KEGG	18586269
Organismo	<i>Theobroma cacao</i>
Clase	Isomerasa
Reacción	Chalcona→(2S)-Flavanona
Substrato	Chalcona
Producto	Flavona
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios del cacao, biosíntesis de flavonoides.

Nota: Información de KEGG PATHWAY.

Luego de realizar el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la chalcona isomerasa utilizando BLAST protein-protein, se obtuvieron los siguientes resultados: las secuencias identificadas son más similares a una proteína tipo chalcona–flavonona isomerasa en *Theobroma cacao*. Se obtuvieron 14 alineamientos significativos, destacándose la secuencia XP_017984276.1 con una identidad y cobertura del 100%, lo que sugiere que es una proteína altamente conservada en esta especie, figura 11. Otras secuencias como WRX11998.1 y KAK6228083.1 presentaron porcentajes superiores al 91% de identidad y valores E de 0.0, los demás alineamientos representados con colores verde y fucsia indican la presencia de proteínas que probablemente comparten dominios funcionales específicos, pero no su totalidad, lo que significaría que podrían tener funciones similares o complementarias en la biosíntesis de flavonoides.

Distribution of the top 14 Blast Hits on 14 subject sequences

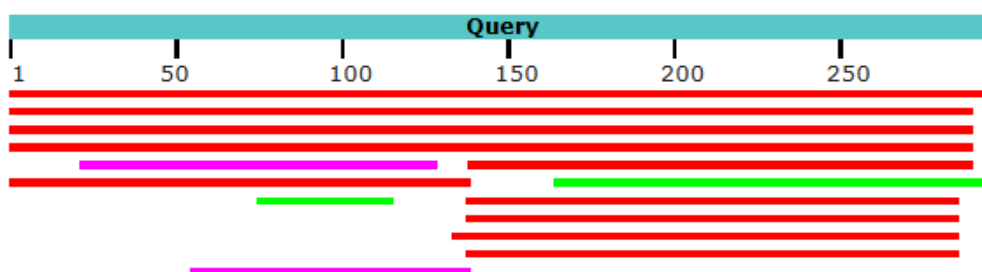


Figura 10. Resumen gráfico de la homología de la secuencia de aminoácidos de Chalcona isomerasa.

Nota: Gráfico creado por BLAST.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
✓	PREDICTED: chalcone--flavonone isomerase [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	590	590	100%	0.0	100.00%	295	XP_017984276.1
✓	Chalcone isomerase - like 4 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	527	527	98%	0.0	93.40%	279	WRX11998.1
✓	hypothetical protein SCA6_000423 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	511	511	98%	0.0	91.32%	272	KAK6228083.1
✓	hypothetical protein POUND7_007968 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	509	509	98%	0.0	90.97%	272	KAK6270870.1
✓	hypothetical protein QUC31_008520_partial [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	301	301	51%	4e-104	98.68%	162	KAK6234114.1
✓	hypothetical protein QUC31_008521 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	265	265	47%	5e-90	97.83%	147	KAK6234115.1
✓	hypothetical protein SCA6_000422 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	254	254	50%	3e-84	86.49%	231	KAK6228082.1
✓	PREDICTED: chalcone--flavonone isomerase [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	251	251	50%	2e-83	85.81%	231	XP_017985206.1
✓	Chalcone-flavonone isomerase family protein [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	253	253	52%	8e-83	84.87%	305	EOY18399.1
✓	Chalcone isomerase - like 2 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	248	248	50%	4e-82	85.14%	231	WRX11994.1
✓	Uncharacterized protein TCM_043000 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	159	159	28%	3e-49	95.24%	93	EOY18404.1
✓	hypothetical protein QUC31_013698 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	88.2	88.2	36%	3e-21	55.45%	117	KAK6251978.1
✓	Chalcone isomerase - like 3 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	73.6	73.6	44%	6e-15	32.39%	210	WRX11995.1
✓	Cytochrome P450 - like 10 [Theobroma cacao]	Theobroma cacao	60.5	60.5	14%	1e-09	78.05%	591	WRX16060.1

Figura 11. Nombres de las enzimas con un porcentaje alto de homología con Chalcona

isomerasa.

Nota: Resultados obtenidos de NCBI.

La reacción que es catalizada por la Chalcona isomerasa es la (2S)-naringenina, una flavanona que posee una estructura cíclica que constituye un intermediario clave en la biosíntesis de flavonoides. Además, esta posee propiedades antioxidantes, que sirven como precursor en la formación de flavonoles, antocianinas y otros compuestos fenólicos (Lackie, 2013). Su presencia en plantas como el cacao contribuye a funciones defensivas y a la calidad sensorial del fruto.

En la figura 12 se ilustran las probabilidades de localización de residuos en la secuencia de la chalcona isomerasa. La línea anaranjada indica una alta probabilidad de localización extracelular a lo largo de la mayor parte de la proteína, mientras que la línea celeste señala una probabilidad extremadamente baja de localización intracelular. No se identificaron regiones transmembrana significativas (representadas por la línea lila), y solo se observó una pequeña zona marcada en rojo, lo que sugiere que esta proteína probablemente no sea transmembranal, sino que tenga una localización extracelular predominante.

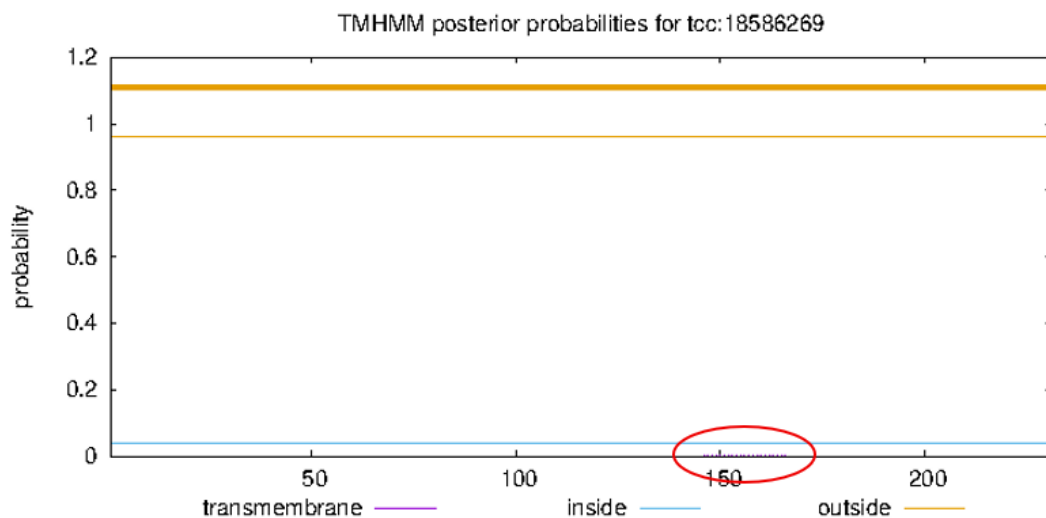


Figura 12. Predicción de hélices transmembrana de Chalcona isomerasa.

Nota: Se introdujo el FASTA en el servidor de TMHMM.

3.1.2 Aplicación del análisis proteómico para estudiar las proteínas implicadas y su interacción

3.1.2.1 Redes de interacción proteína-proteína de Chalcona sintasa

De acuerdo con los resultados obtenidos en la base de datos STRING, la secuencia de aminoácidos de la chalcona sintasa presenta interacciones dinámicas con diversas enzimas. Estas interacciones sugieren la formación de conexiones funcionales, ya que las enzimas involucradas catalizan reacciones dentro de la misma ruta metabólica. Desde STRING se generaron las redes de interacción, que se explican a continuación en la tabla 6.

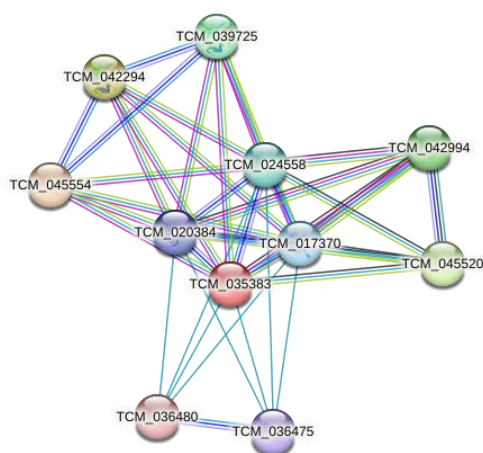


Figura 13. Red de interacción con puntuación más alta.

Nota: Realizado en STRING.

Tabla 6.

Interacciones funcionales de Chalcona sintasa.

ID Gen	Función	Puntaje de confianza
LOC18602780 chalcone synthase 1 [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)]	La chalcona sintasa 1 (CHS1), es una enzima clave en la biosíntesis de flavonoides cataliza la	92%

ID Gen	Función	Puntaje de confianza
A0A061EL17, TCM_020384	formación de chalconas, compuestos intermedios en la vía de los fenilpropanoides que dan lugar a flavonoides como flavonoles, antocianinas y taninos condensados(Dao et al., 2011).	
LOC18601149 chalcone synthase [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)] A0A061EEB0, TCM_017370	La chalcona sintasa (CHS), cataliza la formación de chalconas a partir de p-coumaroil-CoA y malonil-CoA, marcando el primer paso comprometido en la vía de los fenilpropanoides(Dao et al., 2011).	92%
LOC18591096 trans-cinnamate 4-monooxygenase [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)] A0A061GZ04, TCM_042294	La trans-cinnamate 4-monooxygenasa (C4H), es una enzima que cataliza la conversión del ácido trans-cinámico en ácido p-cumárico, un paso esencial en la vía de los fenilpropanoides. El ácido p-cumárico es un precursor fundamental para la síntesis de flavonoides (Khatri et al., 2023a).	87%
LOC18589488 cytochrome P450 CYP73A100 [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)] A0A061GS17, TCM_039725	El citocromo P450 CYP73A100, una enzima involucrada en la biosíntesis de flavonoides. Esta enzima es una forma de cinnamate 4-hidroxilasa (C4H) que cataliza la conversión de ácido trans-cinámico en ácido p-cumárico, un paso crucial para la producción de flavonoides en las plantas(Khatri et al., 2023b).	74.6%

3.1.2.2 Modelo tridimensional de Chalcona sintasa

Para la obtención del modelo tridimensional, se utilizó el servicio SWISS-MODEL, el cual generó un modelo basado en la secuencia de aminoácidos de la chalcona sintasa. Este modelo fue construido mediante la comparación y homología con estructuras cuya configuración tridimensional ya ha sido determinada experimentalmente. El peso molecular de la chalcona sintasa es de 43.54 kDa. Este valor es directamente proporcional al tamaño de la proteína, es decir, a mayor peso molecular, mayor será su tamaño. Además, el punto isoelectrico es el pH en el cual las cargas positivas y negativas de la enzima se equilibran, lo que implica que no migrará en un campo eléctrico. En este caso, la chalcona sintasa será eléctricamente neutra a un pH de 5.97, según lo indicado por el portal SWISS-MODEL.

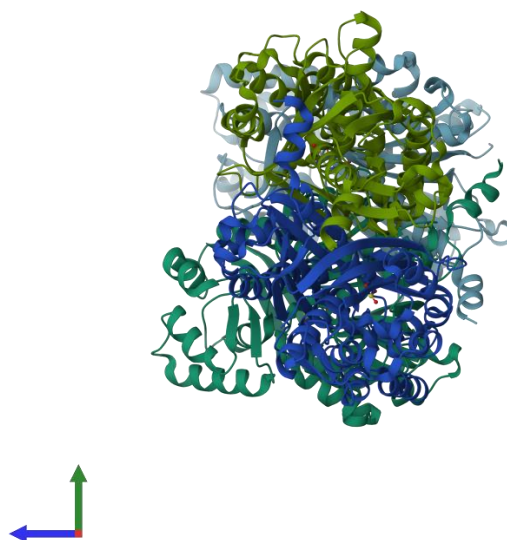


Figura 14. Estructura tridimensional de Chalcona sintasa.

Nota: Es un servidor de modelado de homología de estructura de proteínas totalmente automatizado, accesible a través del servidor web Expasy.

3.1.2.4 Redes de interacción proteína-proteína de Trans-cinnamate 4-monooxygenasa

La trans-cinnamate 4-monooxygenasa (C4H) establece interacciones con diversas proteínas clave en la biosíntesis de flavonoides, tales como PAL, PAL G4, CCR1, CHS y CHS1, dentro de la ruta metabólica de los fenilpropanoides. Estas interacciones

son fundamentales para la conversión del ácido trans-cinámico en ácido p-cumárico, un precursor crucial de los flavonoides, además de desempeñar un papel importante en la regulación de su expresión génica (Zagoskina et al., 2023).

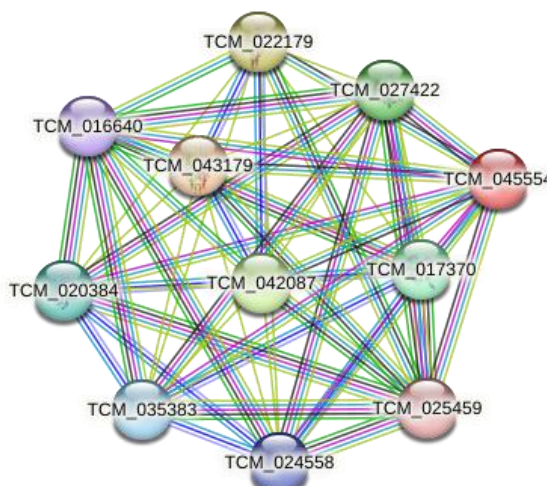


Figura 15. Red de interacción con puntuación más alta de trans-cinnamate 4-monooxigenasa.

Nota: Realizado en STRING.

Tabla 7.

Interacciones funcionales de Trans-cinnamate 4-monooxigenasa.

ID Gen	Función	Puntaje de confianza
LOC18602780 chalcone synthase 1 [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)] A0A061EL17, TCM_020384	La chalcona sintasa 1 (CHS1), es una enzima clave en la biosíntesis de flavonoides cataliza la formación de chalconas, compuestos intermedios en la vía de los fenilpropanoides que dan lugar a flavonoides como flavonoles, antocianinas y taninos condensados (Dao et al., 2011).	92%
LOC18601149 chalcone synthase [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)]	La chalcona sintasa (CHS), cataliza la formación de chalconas a partir de p-coumaroil-CoA y malonil-CoA,	86.1%

ID Gen	Función	Puntaje de confianza
A0A061EEB0, TCM_017370	marcando el primer paso comprometido en la vía de los fenilpropanoides (Dao et al., 2011).	
LOC18595421 cinnamoyl-CoA reductase 1 [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)] A0A061G9C7, TCM_027422	La cinnamoyl-CoA reductasa 1 (CCR1), una enzima clave en la biosíntesis de lignina, un polímero fenólico que proporciona rigidez y resistencia a las plantas. Es fundamental para la formación de lignina en tejidos vasculares de las plantas de cacao.	86.1%
LOC18586419 phenylalanine ammonia-lyase G4 [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)] A0A061FP97, TCM_043179	La fenilalanina amoniaco liasa G4 (PAL G4), es una enzima clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos, que influyen en la calidad sensorial y nutricional del grano. Su expresión se regula en respuesta a estímulos bióticos y abióticos (Guevara et al., 2010).	85%
LOC18597973 phenylalanine ammonia-lyase [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)] A0A061ESP2, TCM_022179	La fenilalanina amoniaco liasa (PAL), es esencial para la producción de flavonoides en cacao y da lugar a ligninas y taninos condensados.	84%

3.1.2.5 Modelo tridimensional predicho de Trans-cinnamate 4-monooxygenasa

Según el portal SWISS-MODEL, el modelo tridimensional predicho de la trans-cinnamate 4-monooxygenasa presenta una región helicoidal en azul claro en el extremo N-terminal, que se extiende hacia la parte central de la proteína. Esta enzima, con un

punto isoelectrico de 8.96 y un peso molecular de 59,681.38 kDa, desempeña un papel crucial en la biosíntesis de compuestos fenólicos. Su función consiste en catalizar la hidroxilación del trans-cinnamato en la posición 4, una modificación química esencial para la producción de flavonoides y otros metabolitos secundarios que son clave para la defensa y la estructura de las plantas.

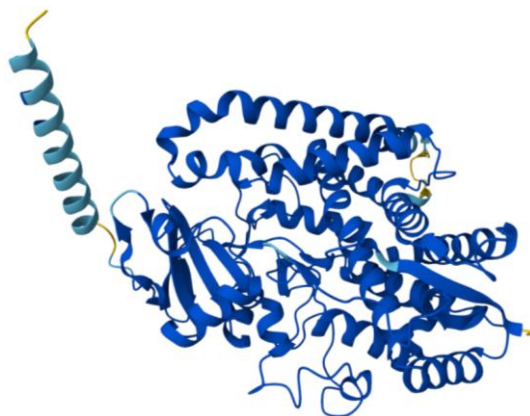


Figura 16. Estructura tridimensional de Trans-cinnamato 4-monooxigenasa.

Nota: Se introdujo el FASTA para obtener la estructura tridimensional en SWISS-MODEL.

3.1.2.7 Redes de interacción proteína-proteína de Chalcona isomerasa

La chalcona isomerasa (CHI) es una enzima esencial en la biosíntesis de flavonoides, ya que cataliza la conversión de la chalcona naringenina en (2S)-naringenina. Aunque no posee actividad catalítica propia, regula la actividad de la chalcona sintasa (CHS) mediante interacciones directas, promoviendo la producción de naringenina chalcona y reduciendo la formación de productos secundarios. Esta regulación es crucial para asegurar la correcta formación de flavonoides en la ruta metabólica (Waki et al., 2020).

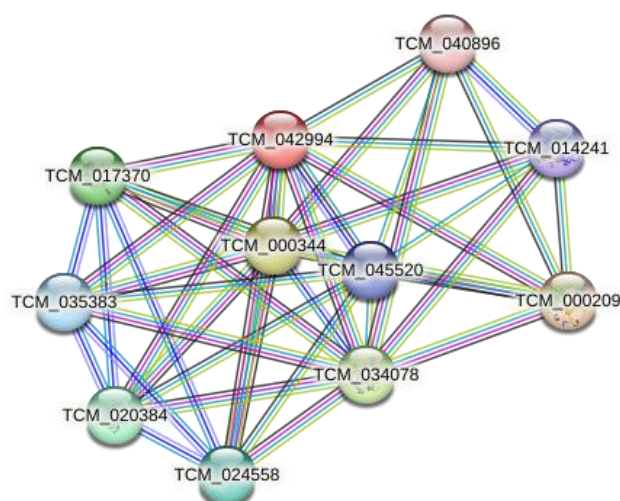


Figura 17. Red de interacción con puntuación más alta de Chalcona isomerasa.

Nota: Realizado en STRING.

Tabla 8.

Interacciones funcionales de Chalcona isomerasa.

ID Gen	Función	Puntaje de confianza
LOC18601149 chalcone synthase [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)] A0A061EEB0, TCM_017370	La chalcona sintasa (CHS), cataliza la formación de chalconas a partir de p-coumaroil-CoA y malonil-CoA, marcando el primer paso comprometido en la vía de los fenilpropanoides (Dao et al., 2011).	85.8%
LOC18602780 chalcone synthase 1 [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)] A0A061EL17, TCM_020384	La chalcona sintasa 1 (CHS1), es una enzima clave en la biosíntesis de flavonoides cataliza la formación de chalconas, compuestos intermedios en la vía de los fenilpropanoides que dan lugar a flavonoides como flavonoles, antocianinas y taninos condensados (Dao et al., 2011).	92%

ID Gen	Función	Puntaje de confianza
LOC18591418 bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase [<i>Theobroma cacao</i> (cacao)] A0A061FCN8, TCM_034078	Su actividad es esencial para la formación de antocianinas y proantocianidinas, compuestos responsables de la coloración y defensa en plantas (Lewis et al., 2023).	81%

3.1.2.8 Modelo tridimensional predicho de Chalcona isomerasa

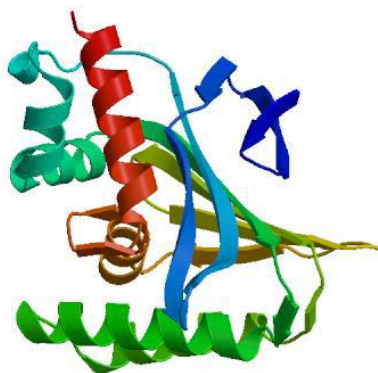


Figura 18. Estructura tridimensional de Chalcona isomerasa.

Nota. Se introdujo el FASTA para obtener la estructura tridimensional en SWISS-MODEL.

(Lackie, (2013 el modelo tridimensional de la chalcona isomerasa revela una estructura proteica compleja, compuesta por hélices alfa y hojas beta, que es esencial para su función en la biosíntesis de flavonoides. Con un punto isoeléctrico de 5.27 y un peso molecular de 24.77 kDa, esta enzima cataliza la conversión de chalconas en flavanonas, desempeñando un papel clave en la formación de metabolitos secundarios.

3.1.3 Integración de datos para construir modelos predictivos que simulen la interacción molecular y permitan mejorar los mecanismos de regulación en la producción de flavonoides

Según la investigación de Kang et al., (2014) la ruta de los flavonoides se desarrolla principalmente en el citosol y el retículo endoplásmico de las células vegetales. En el citosol, se producen los precursores, como el p-cumaril-CoA, que, tras interaccionar con las principales enzimas de la ruta de los flavonoides mencionadas en el punto 3.1.1, se transforman en chalconas y flavanonas. Además, los flavonoides se almacenan en las vacuolas y los plastidios, donde desempeñan funciones cruciales, como la protección frente al estrés y los patógenos, y contribuyen a la coloración de las plantas.

Se analizó mediante STRING las posibles rutas metabólicas de dos enzimas, las cuales mostraron una relación directa con otras seis presentes en la biosíntesis de los flavonoides. En este análisis, cada nodo representa un gen o una proteína, mientras que las líneas entre ellos indican diferentes tipos de interacciones funcionales o físicas, que incluyen tanto interacciones experimentales como predicciones. Los colores y grosores de las conexiones reflejan la fuerza y el tipo de relación, destacando agrupamientos o módulos funcionales. Estos módulos sugieren que ciertos grupos de genes operan de manera coordinada en procesos metabólicos específicos, como la biosíntesis de flavonoides y fenilpropanoides en *Theobroma cacao*. Esta red es crucial para identificar genes centrales que podrían desempeñar un papel regulador clave en las rutas bioquímicas de interés (Pandey et al., 2020).

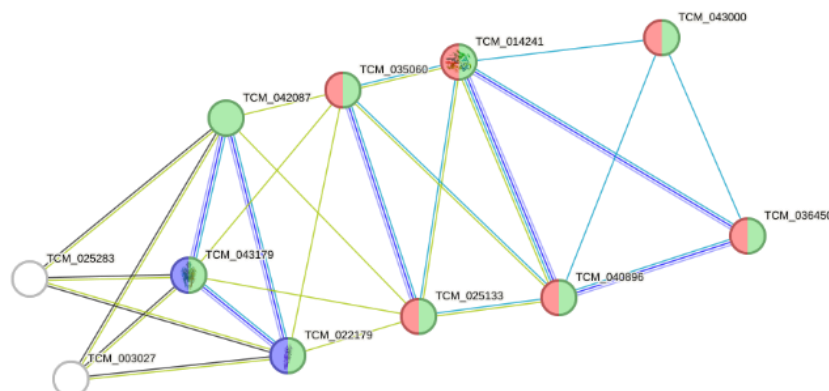


Figura 19. Red de Interacción proteica alternativa.

Nota: Se buscaron dos enzimas clave para la ruta de los flavonoides y se presentó una red de interacción entre proteínas, identificando las conexiones funcionales y físicas entre ellas, además de los códigos TCM correspondientes.

Se identificaron las proteínas que interactúan dentro de la nueva ruta metabólica propuesta. A continuación, se detallan los genes que codifican estas proteínas:

Tabla 9.

Genes presentes en la activación de la biosíntesis de los flavonoides.

Genes	ID Gen <i>Theobroma cacao</i> (cacao)
A0A061GY54 (TCM_042087)	LOC18590901 Fenilalanina amonio-liasa
A0A061FP97 (TCM_043179)	LOC18586419 Fenilalanina amonio-liasa G4
A0A061ESP2 (TCM_022179)	LOC18597973 Fenilalanina amonio-liasa
A0A061GTY6 (TCM_040896)	LOC18589969 Flavonoide 3',5'-hidroxilasa 1
A0A061G4T4 (TCM_014241)	LOC18604820 Flavonoide 3'-monooxigenasa
A0A061FS05 (TCM_036450)	LOC18593008 Licodiona sintasa

Tabla 10.

Funcionalidad enzimática de genes clave involucrados en la biosíntesis de fenilpropanoides y flavonoides en *Theobroma cacao*.

Nombre de la Enzima	Función Catalítica	Ruta Metabólica	Relevancia Biológica en Cacao
Fenilalanina amoniaco-liasa	Cataliza la conversión de L-	Vía de los fenilpropanoides	Enzima clave en la biosíntesis de

Nombre de la Enzima	Función Catalítica	Ruta Metabólica	Relevancia Biológica en Cacao
(PAL) LOC18590901	fenilalanina en ácido trans-cinámico y amoníaco.		compuestos fenólicos como lignina y flavonoides, fundamentales para la defensa de la planta y la calidad del cacao.
Fenilalanina amoniaco-liasa G4 (PAL G4) LOC18586419	Isoenzima que realiza la misma reacción que PAL, con posibles diferencias en regulación y expresión.	Vía de los fenilpropanoides	Puede tener un papel específico en ciertas etapas del desarrollo o en respuesta a estímulos ambientales, contribuyendo a la diversidad de compuestos fenólicos en el cacao.
Fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) LOC18597973	Similar a las anteriores, cataliza la conversión de L-fenilalanina en ácido trans-cinámico y amoníaco.	Vía de los fenilpropanoides	Contribuye a la producción de metabolitos secundarios que afectan el sabor, aroma y propiedades antioxidantes del cacao.
Flavonoide 3',5'-hidroxilasa 1 (F3'5'H) LOC18589969	Hidroxila flavonoides en las posiciones 3' y 5' del anillo B, produciendo compuestos como la delphinidina.	Biosíntesis de flavonoides	Participa en la formación de antocianinas responsables de la coloración púrpura y azul en tejidos del cacao, influenciando la apariencia y

Nombre de la Enzima	Función Catalítica	Ruta Metabólica	Relevancia Biológica en Cacao
			propiedades antioxidantes.
Flavonoide 3'-monooxigenasa (F3'H) LOC18604820	Hidroxila flavonoides en la posición 3' del anillo B, generando compuestos como la quercetina.	Biosíntesis de flavonoides	Contribuye a la diversidad de flavonoides en el cacao, afectando el perfil antioxidante y potencialmente el sabor del producto final.
Licodiona sintasa LOC18593008	Cataliza la conversión de liquiritigenina en licodiona mediante una reacción dependiente de NADPH y O ₂ .	Biosíntesis de flavonoides	Aunque menos estudiada en cacao, podría estar involucrada en la formación de flavonoides específicos que afectan las propiedades organolépticas y funcionales del cacao.

Al realizar los análisis, alineamientos, redes de interacción y evaluar la afinidad de las enzimas, se identificaron alternativas que podrían sustituir la ruta convencional (Mate, 2019). Con estos antecedentes, se proponen rutas alternativas que se activan para generar flavonoides. A continuación, se describen estas rutas alternativas:

Tabla 11.

Genes de las rutas alternativas.

Genes	ID Gen
A0A061EYM1 (TCM_025133)	LOC18599277 flavonol synthase <i>Theobroma cacao</i> (cacao)

A0A061FH54 (TCM_035060)	LOC18592290 flavanone 3-hydroxylase <i>Theobroma cacao</i> (cacao)
-----------------------------------	---

Tabla 12.

Rutas alternativas para la biosíntesis de los flavonoides.

Gen / Enzima	Función Tradicional	Propuesta de Vía Alternativa	Justificación / Función Complementaria
LOC18592290 (Flavanona 3-hidroxilasa)	Hidroxila flavanonas para convertirlas en dihidroflavonoles (paso clave en biosíntesis clásica de flavonoides).	Hidroxilación de flavanonas ya glucosiladas o modificadas, permitiendo la síntesis de derivados flavonoides más diversos.	Permite ampliar la variedad química de flavonoides, mejorando adaptación a estrés y defensa.
LOC18599277 (Flavonol sintasa)	Convierte dihidroflavonoles en flavonoles como kaempferol, finalizando la ruta clásica.	Actúa también directamente sobre flavanonas o en rutas bypass, facilitando síntesis de flavonoles, aunque la ruta clásica esté parcialmente bloqueada.	Mantiene producción de flavonoles bajo condiciones adversas, asegurando funciones antioxidantes y pigmentación.
Productos finales	Flavonoles clásicos	Formación de flavonoles con modificaciones adicionales como metilación y	Diversificación química para ajuste fino de funciones antioxidantes, defensa y color

Gen / Enzima	Función Tradicional	Propuesta de Vía Alternativa	Justificación / Función Complementaria
		acilación	

Para verificar que las rutas planteadas forman parte de la biosíntesis de flavonoides, se realizó un análisis de enriquecimiento del clúster de la red local. Este análisis reveló una fuerte asociación con rutas metabólicas relacionadas con la biosíntesis de flavonoides y fenilpropanoides, mostrando un alto número de genes involucrados en estos procesos. Las proteínas que tienen relación según STRING, KEEG y Uniprot son las siguientes:

Tabla 13.

Relación de proteínas involucradas en la biosíntesis de flavonoides y fenilpropanoides según STRING, KEEG y UniProt.

STRING	KEEG	UNIPROT
TCM_035060	TCM_035060	
TCM_025133	TCM_025133	
TCM_014241	TCM_014241	
TCM_040896	TCM_040896	
TCM_043000	TCM_043000	
TCM_03645	TCM_03645	
TCM_042087		
TCM_043179		TCM_043179
TCM_022179		TCM_022179

En la figura 19 se observa la relación existente entre cada una de estas proteínas, las mismas que se encuentran listadas en la tabla 13, este análisis confirma que las proteínas identificadas forman parte de la biosíntesis de flavonoides.

A partir de estos datos se ha obtenido los gráficos de enriquecimiento, en estos, el color de las barras indica el valor del FDR (False Discovery Rate), en el que, los colores más

claros representan una mayor significancia estadística. Por otra parte, el tamaño de los círculos sobre las barras refleja el número de genes involucrados en cada vía, siendo más representativos los de mayor tamaño, estos genes se encuentran identificados en las tablas 9, 10, 11, 12 respectivamente. A partir de estos resultados, observamos que existe un visible enriquecimiento en las rutas relacionadas con la biosíntesis de flavonoides y compuestos fenólicos. Consecuentemente, podemos comprender de mejor forma la funcionalidad y el papel biológico de estas proteínas, alineado con el estudio integral de las rutas metabólicas y funciones en *Theobroma cacao*.

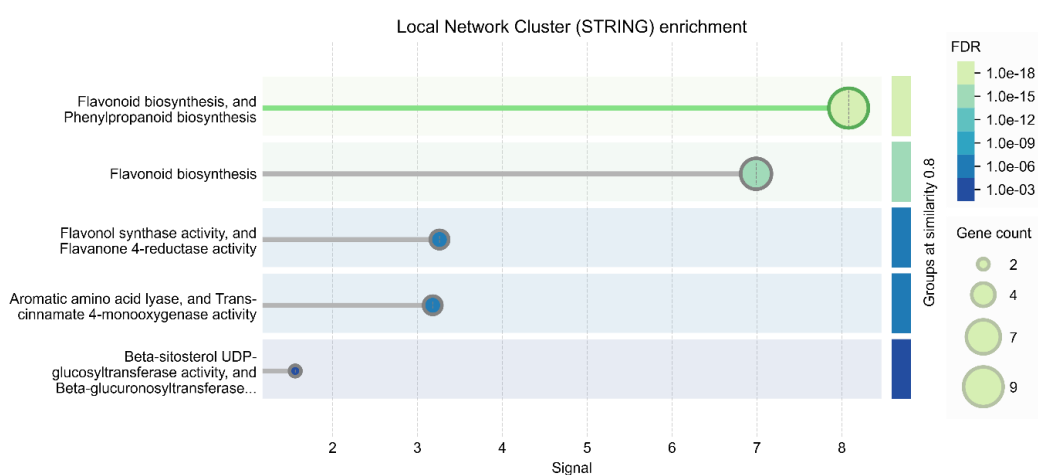


Figura 20. Análisis de enriquecimiento en vías STRING.

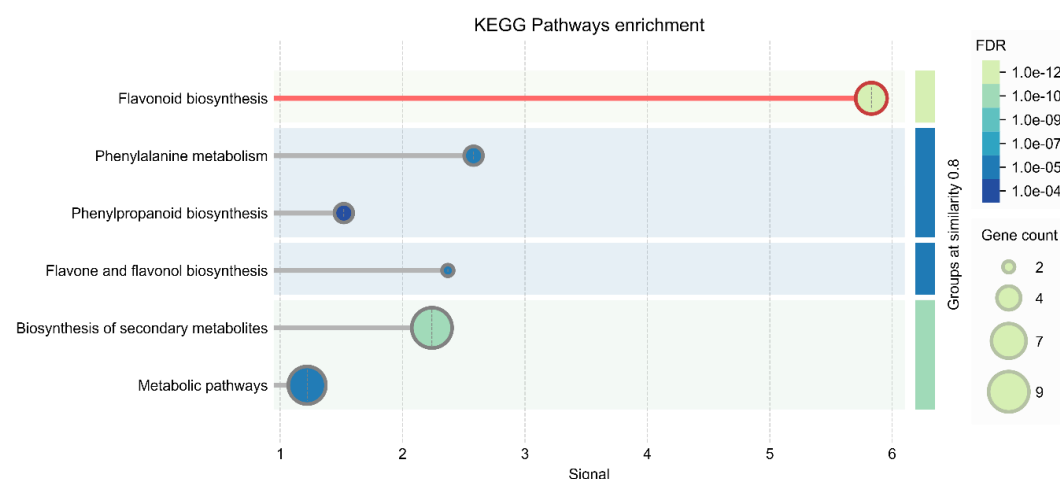


Figura 21. Análisis de Enriquecimiento en Vías Metabólicas KEGG.

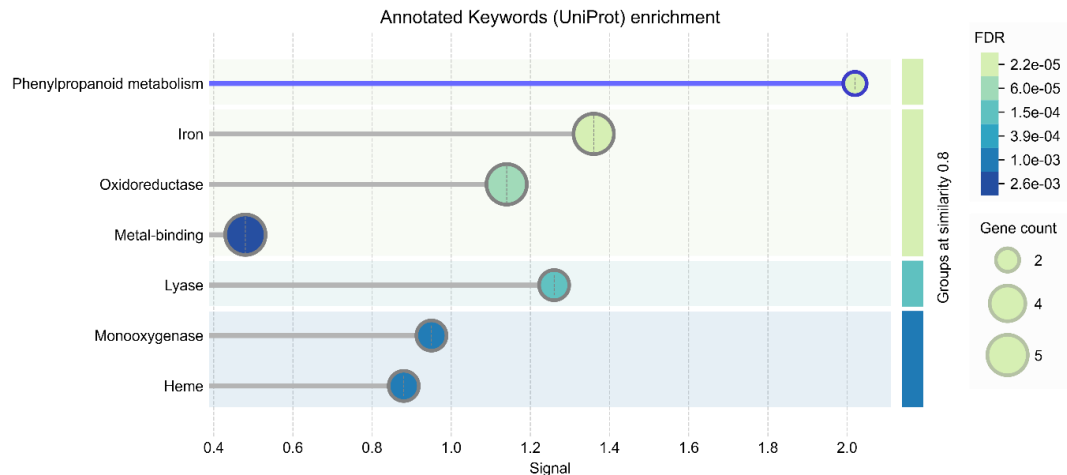


Figura 22. Análisis de Enriquecimiento en Vías Metabólicas UniProt.

Nota: Estas figuras fueron generada por STRING.

Se ha utilizado AlphaFold para realiza un análisis proteico de la biosíntesis de flavonoides en cacao, se identificaron las regiones clave involucradas en esta ruta metabólica. Los resultados obtenidos permiten evaluar la estabilidad y efectividad de las proteínas involucradas en esta biosíntesis. Se introdujo la secuencia de aminoácidos de las enzimas de interés en la herramienta, manteniendo los parámetros por defecto, lo que facilitó la identificación precisa de las estructuras y funciones de las proteínas analizadas (Abramson et al., 2024).

En la figura 23 observamos los diferentes rangos (ranks) de predicción de las enzimas de interés junto a la calidad de las estructuras generadas por AlphaFold. Cada rango presenta un patrón de predicción, donde las proteínas con un IDDT (interfaz de modelo) más alto en las primeras posiciones indican una mayor certeza en la estructura propuesta. Las predicciones más altas podrían corresponder a proteínas con un mayor impacto en la calidad de los flavonoides y antioxidantes presentes en el cacao, destacando su relevancia en los procesos metabólicos clave (Pak et al., 2023). El color azul indica una mayor precisión en los resultados, reflejando una alta confiabilidad en las predicciones de las estructuras de las proteínas. Por otro lado, la presencia de color rojo indicaría que los datos no tienen validez, sugiriendo una menor certeza en la estructura propuesta o en la predicción de la función de las proteínas.

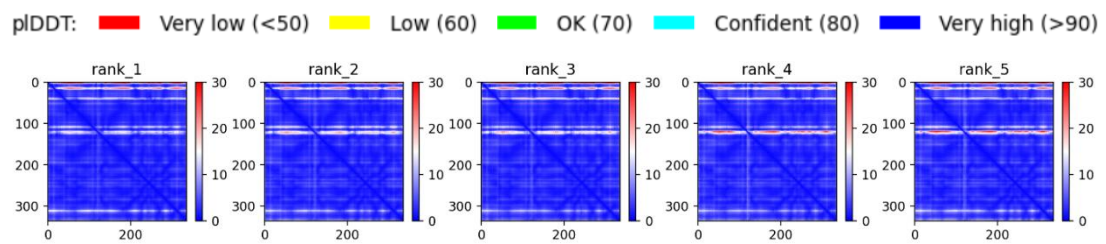


Figura 23. Predicción estructural de proteínas del cacao por rango.

Nota: Imagen generada en AlphaFold.

En la figura 24 se observa la cobertura de las secuencias en diferentes posiciones de la proteína, visualizamos la identidad de la secuencia predicha en relación con las secuencias introducida. La alineación de las secuencias de proteínas del cacao revela que ciertas posiciones son altamente conservadas, donde la identidad de la secuencia es alta como se puede observar en las posiciones 50-100 y 200-250. Según Jumper et al., (2021), sugiere que las funciones en estas áreas son esenciales para la estabilidad y las propiedades bioactivas del cacao, las cuales están relacionadas con la producción de flavonoides. La tendencia cercana a cero representaría un indicador de que las secuencias introducidas no pertenecen a la ruta de los flavonoides, lo cual claramente no se presenta en este estudio.

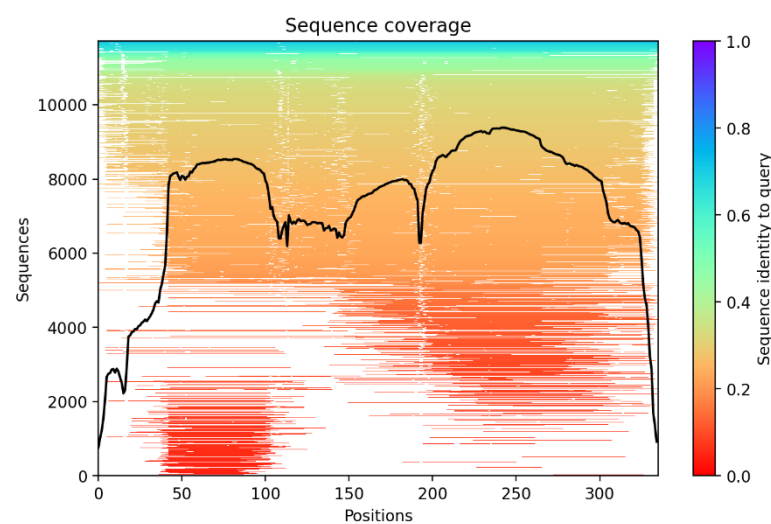


Figura 24. Cobertura e identidad de la secuencia de proteínas del cacao.

La predicción del IDDT por posición en la figura 25, muestra cada posición de la secuencia proteica. Como se puede observar, existe una dispersión entre los valores

100 a 150, lo que significa que en esta zona existen condiciones favorables para la síntesis de diversos flavonoides y compuestos fenolíticos, por otra parte, en las posiciones donde el predictor es constante como entre 150 y 300, se considera que las condiciones de síntesis son constantes (Jumper et al., 2021).

Estas posiciones se consideran objetivos, desde el enfoque de mejora funcional para la producción y síntesis de flavonoides, además de que estos compuestos son clave para mejorar la resistencia al estrés biótico y abiótico e influyen en su calidad y propiedades nutricionales (Bertoline et al., 2023).

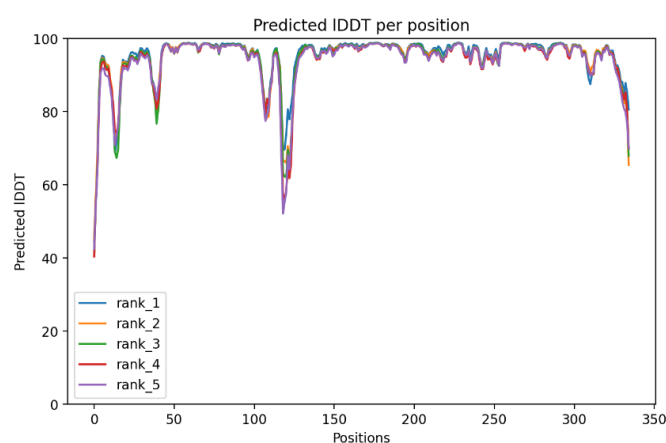


Figura 25. Predicción del IDDT por posición en proteínas del cacao.

Según el artículo de (Ruchawapol et al., 2022), el *docking molecular* nos permite verificar si existe interacción entre las enzimas identificadas y el ligando involucrado en la biosíntesis de los flavonoides, que para este estudio es el ATP (Adenosín trifosfato). Las enzimas flavanona 3-hidroxilasa (F3H) y el flavonol sintasa (FLS), se usaron para predecir la interacción con ligandos presentes en el entorno celular del cacao (ATP). El F3H convierte la naringenina en dihidroflavonol, mientras que el FLS convierte los dihidroflavonoles en flavonoles comunes como el kaempferol o la quercetina.

Para visualizar las interacciones entre las enzimas y el ligando, se identificaron los residuos en el sitio activo de la enzima que favorecen la conversión de los flavonoides. Es importante señalar que, si las enzimas propuestas para las rutas alternativas no

estuvieran relacionadas con la producción de flavonoides, se habría tenido que diseñar inhibidores o activadores enfocados en aumentar la producción de flavonoides (Fanelli & Sullivan, 2023).

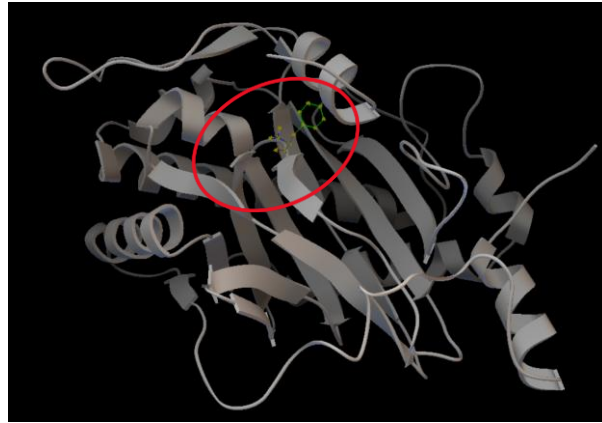


Figura 26. Unión sustrato enzima de F3H.

Utilizando AutoDock Tools, donde se introdujeron tanto el ligando como las enzimas en formato PDB. Posteriormente, se realizó el *docking molecular*, como se muestra en la figura 27. Este procedimiento permite modelar las interacciones entre estas moléculas (enzima-ligando) e identificar el mejor acoplamiento a partir de evaluar los cambios conformacionales que se generan en esta interacción (Danish Rizvi et al., 2013). La variabilidad genética en estas enzimas podría aumentar significativamente la cantidad de flavonoides producidos, lo que resulta crucial para identificar factores estructurales con mayor afinidad de unión. Esto, a su vez, incrementaría la eficiencia de la conversión metabólica, controlando la ruta de los flavonoides y mejorando la calidad del cacao.

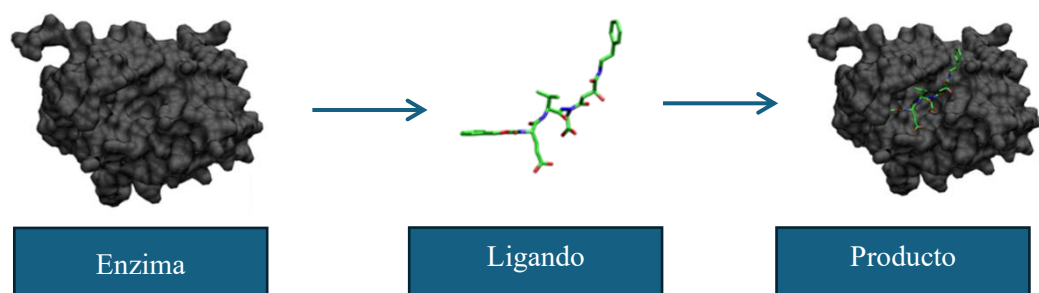


Figura 27. Representación esquemática del *docking*.

Se llevó a cabo un análisis de acoplamiento molecular (*docking*) utilizando AutoDockTools, con el objetivo de predecir la interacción entre la enzima flavonol sintasa (FLS) y el ligando ATP. Se evaluaron diez conformaciones principales como se muestra en la tabla 14, entre las cuales varias presentaron valores de energía de unión atípicamente altos y positivos, lo que sugiere interacciones inestables o poco favorables desde el punto de vista termodinámico. La conformación 1 mostró una energía de unión de 30.72 kcal/mol, mientras que las conformaciones 2 y 9 alcanzaron valores aún mayores (76.80 y 67.16 kcal/mol, respectivamente). Estos valores exceden ampliamente los rangos aceptables para una interacción biológicamente viable, lo que indica que dichas poses deben ser descartadas por inconsistencias energéticas significativas.

Las conformaciones 3, 4, 7 y 10 presentaron energías de unión más moderadas (14.59, 7.28, 11.05 y 10.80 kcal/mol, respectivamente), junto con una mejor correlación entre la energía intermolecular y la energía interna, lo que sugiere un ajuste conformacional más favorable y mayor estabilidad potencial del complejo. Las energías electrostáticas fueron bajas en casi todas las conformaciones analizadas, lo que indica que predominan las interacciones de Van der Waals e hidrofóbicas sobre las interacciones polares en el sitio de unión. El análisis del RMSD (desviación cuadrática media) arrojó valores entre 3.56 y 4.54 Å en las conformaciones más prometedoras, reflejando una variabilidad estructural considerable. A continuación, se presenta una tabla con el resumen de los valores obtenidos para cada conformación:

Tabla 14.

Resultados del *docking molecular* entre la enzima Flavonol sintasa y el ligando.

Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Energía de unión (kcal/mol)	30.7	76.8	14.5	7.2	0.4	4.5	11	19.4	67.1	10.8
Eficiencia del ligando	0.99	2.48	0.47	0.23	0.02	0.15	0.36	0.63	2.17	0.35

Energía intermolecular	26.25	72.32	10.12	2.80	-4.0	0.08	6.58	14.93	62.68	6.32
Energía electrostática	-0.17	0.56	0.56	0.17	-0.53	0.66	-0.02	0.44	0.17	-0.58
Energía interna	3.70	14.23	-1.37	-4.01	-2.01	-2.39	-1.13	-1.98	7.65	-2.18
RMSD ref (Å)	4.52	3.56	4.30	4.54	4.23	4.37	3.87	3.80	4.02	3.75

Después de analizar los parámetros de energía de unión, energía interna, energía intermolecular y estabilidad estructural (RMSD), se concluye que la Conformación 10 es la más adecuada para estudios posteriores como se muestra en la figura 28. Esta conformación presenta una energía de unión favorable, una estructura estable del ligando y un RMSD bajo, lo que la convierte en un modelo confiable para análisis complementarios (Fusani et al., 2020).

Tabla 15.

Modelos viables entre la enzima Flavonol sintasa y el ligando.

Conformación	Energía de unión (kcal/mol)	Energía Intermol.	Energía Interna	RMSD ref (Å)	Observaciones
10	10.80	6.32	-2.18	3.75	Balanceada y estable
7	11.05	6.58	-1.13	3.87	Ligeramente más inestable
4	7.28	2.80	-4.01	4.54	Menor energía, pero RMSD alto
3	14.59	10.12	-1.37	4.30	Mayor energía de unión

En la figura 38 se muestra la visualización tridimensional del complejo formado entre la enzima FLS y el ligando, correspondiente a la conformación 10, la más estable según

el análisis de docking. El ATP se encuentra ubicado en el sitio activo, estabilizado por cuatro enlaces de hidrógeno clave con los residuos LYS202 y HIS277, que se observan como líneas verdes. Los valores energéticos indican una afinidad favorable, con una energía de unión de -10.8 kcal/mol, energía interna negativa (-2.18 kcal/mol), lo que confirma un ajuste estructural confiable y una interacción bioquímicamente viable para estudios posteriores.

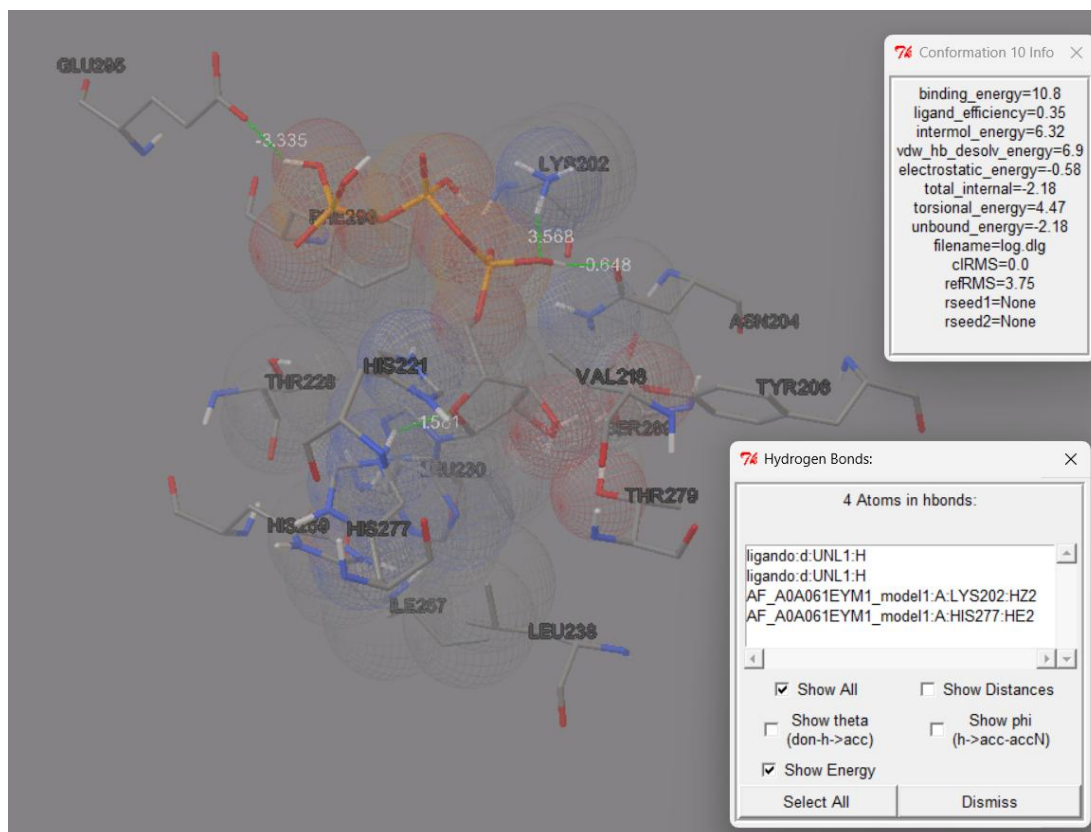


Figura 28. Resultado del *docking molecular* de FLS y parámetros presentes.

Los resultados del *docking molecular* entre la enzima flavanona 3-hidroxilasa (F3H) y el ligando ATP, los resultados presentes en la tabla 16 fueron en la energía de unión (Binding Energy): El valor más bajo corresponde a la Conformación 9 con -2.82 kcal/mol, lo que sugiere que esta sería la pose más favorable energéticamente. Otros valores negativos como el de la Conformación 1 y 7 (ambas -0.58 kcal/mol) indican una interacción débil. Valores positivos como el de la Conformación 10 (+12.33 kcal/mol) son inestables, por otra parte, en la energía intermolecular con la conformación 9 también presenta la energía intermolecular más baja con -7.29 kcal/mol, reforzando su estabilidad en el sitio de unión. La desviación cuadrática

media (RMSD) en la Conformación 1 tiene un valor de 4.33 Å, mientras que otras conformaciones oscilan entre 4.1 y 4.8 Å, lo que indica cierta variabilidad estructural (Bender et al., 2021).

Tabla 16.

Resultados del *docking molecular* entre la enzima Flavanona 3-hidroxilasa y el ligando.

Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Energía de Unión (kcal/mol)	-0.58	7.95	2.85	3.02	2.03	0.02	-0.58	2.6	-2.82	12.3
Eficiencia del Ligando	-0.02	0.26	0.09	0.1	0.07	0.0	-0.02	0.08	-0.09	0.4
Energía Intermolecular	-5.06	3.48	-1.63	-1.46	-2.45	-4.46	-5.05	-1.8	-7.29	7.86
Energía Electroestática	0.44	0.07	0.38	0.17	-0.18	-0.61	-0.32	0.27	-0.62	1.1
RMSD ref (Å)	4.33	4.12	4.55	4.56	4.57	4.67	4.86	4.49	4.54	4.48

En los resultados del docking molecular se observó que la interacción más estable entre la enzima flavonola 3-hidroxilasa y el ligando ATP corresponde a la conformación 9, con una energía de unión de -2.82 kcal/mol y una constante de inhibición (K_i) de 8.63 mM, lo que indica una afinidad moderada. En el artículo redactado por (Keil & Mayer, 2014) un aspecto relevante es que esta interacción está dominada por fuerzas de Van der Waals, evidenciado por una energía de desolvación negativa significativa, mientras que el componente electrostático es menor (-0.62 kcal/mol). Esto sugiere que el reconocimiento entre la enzima y el ATP se basa principalmente en un acoplamiento natural, es decir, en la complementariedad de formas entre el ligando y el sitio activo de la proteína. Como se muestra en la figura 29, este tipo de interacción, que poseen uniones electrostáticas o covalentes, son suficientes para estabilizar el complejo enzima-ligando y permitir una funcionalidad biológica básica, abriendo posibilidad de optimizar el ligando (Hernández et al., 2020).

La figura 29, muestra la interacción molecular entre el ATP (en color naranja) y la enzima F3H en su Conformación 9, la más estable según el análisis de docking. Se observan múltiples residuos del sitio activo, como TYR204, MET222, HIS275 y SER287, formando enlaces de hidrógeno con el ligando, lo que sugiere una unión específica y estabilizada. Además, se detalla los valores más relevantes, mientras que las esferas rojas y azules representan mapas de interacción y ocupación espacial alrededor del ligando y los residuos clave. Esta visualización respalda la selección de esta conformación como la más adecuada.

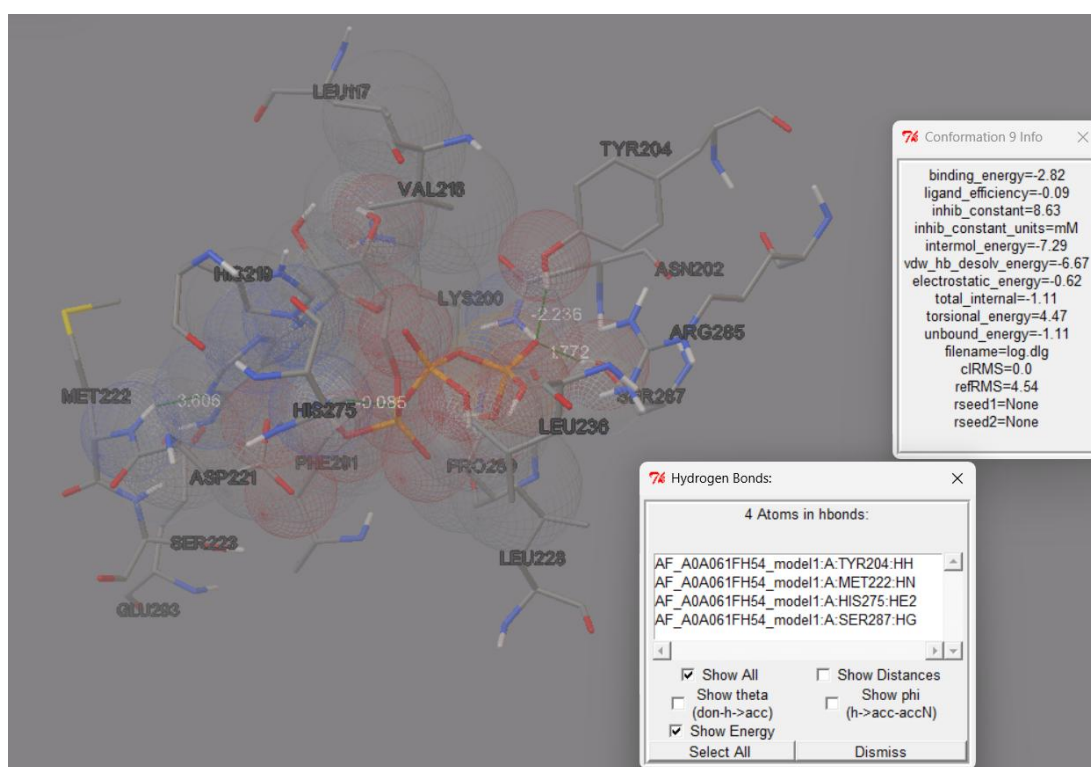


Figura 29. Resultado del *docking molecular* F3H y parámetros presentes.

Tabla 17.

Modelo viable entre la enzima Flavonona 3-hidroxilasa y el ligando.

Criterio	Resultado Conformación 9	Interpretación
Energía de Unión (Binding Energy)	-2.82 kcal/mol	Es la más baja entre todas las conformaciones (mejor afinidad).
Constante de Inhibición (Ki)	8.63 mM	Es el valor más bajo (mayor potencial inhibitorio).
Energía Intermolecular	-7.29 kcal/mol	Alta estabilidad del complejo enzima-ligando.
Energía Electroestática	-0.62 kcal/mol	Contribución negativa favorable a la interacción.
RMSD	4.54 Å	Aceptable considerando la flexibilidad del ligando.

La ruta alternativa se presenta en la tabla 18, en la ruta tradicional la flavanona 3-hidroxilasa (LOC18592290) actúa sobre la flavonona (naringenina), hidroxilándola en el carbono 3 para formar dihidroflavonoles, como dihidrokaempferol y dihidroquercetina. En la ruta alternativa, la flavonona glucosilada o modificada también puede ser hidroxilada en el carbono 3, lo que da lugar a la formación de un dihidroflavonol. Estos compuestos químicos actúan como intermediarios en la biosíntesis de flavonoles y antocianidinas, caracterizados por centros quirales en los carbonos C2 y C3, lo que da lugar a cuatro posibles estereoisómeros (Slade et al., 2005). En cuanto a la Flavonol Sintasa (LOC18599277), los dihidroflavonoles, como el dihidrokaempferol, se oxidan y se convierten en flavonoles, como el kaempferol. En la ruta alternativa, la Flavonol Sintasa puede actuar sobre flavanonas, produciendo tanto quercetina como kaempferol. Esta flexibilidad en la acción de la enzima permite una mayor diversidad en los flavonoides generados, ampliando las posibilidades de adaptación y optimización de los compuestos bioactivos (Sakakibara et al., 2019).

Tabla 18.

Rutas alternativas y producto final.

Enzima / Reacción	Reacción Química Tradicional	Reacción Química Vía Alternativa
Flavanone 3-hydroxylase (LOC18592290)	Flavanona (naringenina) + O ₂ + NADPH → Dihidroflavonol (dihidrokaempferol o dihidroquercetina) + H ₂ O + NADP ⁺	Flavanona glucosilada (modificada) + O ₂ + NADPH → Dihidroflavonol (modificado) + H ₂ O + NADP ⁺
Flavonol Synthase (LOC18599277)	Dihidroflavonol (como dihidrokaempferol) + O ₂ → Flavonol (kaempferol, quercetina) + H ₂ O	Flavanona o dihidroflavonol (como dihidrokaempferol) + O ₂ → Flavonol (kaempferol, quercetina, u otros flavonoles modificados) + H ₂ O
Producto Final	Dihidroflavonoles (dihidrokaempferol, dihidroquercetina) Flavonoles (kaempferol, quercetina, y derivados modificados)	

El uso de estas rutas alternativas en la biosíntesis de flavonoides contribuye a aumentar la diversidad química de estos compuestos, lo que mejora la capacidad de adaptación de las plantas a condiciones de estrés biótico y abiótico. Al permitir la síntesis de flavonoles modificados, estas vías favorecen funciones esenciales, como el incremento de antioxidantes en la producción de cacao, además de potenciar las defensas contra microorganismos y mejorar la pigmentación del fruto. Asimismo, aseguran la continuidad en la producción de flavonoides, incluso cuando la ruta clásica se ve bloqueada, garantizando así una protección efectiva frente a patógenos. Este enfoque representa un beneficio clave para el desarrollo de cultivos más resistentes y con propiedades funcionales mejoradas (Wang et al., 2022).

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES

- El análisis in silico de la ruta de flavonoides en *Theobroma cacao* permitió identificar y caracterizar enzimas clave implicadas en su biosíntesis, así como modelar sus interacciones moleculares y estructurales. Esto demostró que herramientas bioinformáticas como KEGG, STRING, AlphaFold y AutoDock permiten una comprensión profunda de las rutas metabólicas, facilitando la predicción de nuevos mecanismos de regulación y proponiendo rutas alternativas para optimizar la producción de flavonoides funcionales y bioactivos en el cacao ecuatoriano.
- Se clasificaron con éxito las secuencias genómicas de genes clave como *chalcona sintasa*, *trans-cinnamate 4-monooxygenasa* y *chalcona isomerasa*, mediante herramientas como KEGG y NCBI. El análisis de alineamiento BLAST confirmó una alta homología con otras especies, validando su rol funcional. Las predicciones de localización subcelular y dominios transmembrana evidenciaron la especificidad estructural y funcional de estas proteínas en la biosíntesis de flavonoides.
- El análisis proteómico mediante STRING y TMHMM reveló redes de interacción proteína-proteína altamente confiables entre enzimas esenciales de la ruta flavonoide, como CHS, C4H y CHI. Estas interacciones sugieren la existencia de metabolones que optimizan la eficiencia biosintética. Asimismo, la predicción estructural con SWISS-MODEL permitió comprender la configuración tridimensional de las proteínas, asociándolas con funciones biológicas claves como defensa vegetal, pigmentación y bioactividad antioxidante.
- La integración de modelos estructurales y análisis de docking molecular permitió predecir la afinidad de interacción entre enzimas y ligandos como ATP, destacando un alto potencial regulador de F3H y FLS. Se identificaron rutas alternativas viables mediante la acción de enzimas multifuncionales, que

podrían mantener la síntesis de flavonoides incluso bajo condiciones adversas. Estos hallazgos abren oportunidades para mejorar la resistencia vegetal y la calidad funcional del cacao mediante aplicaciones biotecnológicas.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C. C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/S41586-024-07487-W>;TECHMETA=139,141;SUBJMETA=114,1305,154,2411,535,631;KWRD=DRUG+DISCOVERY,MACHINE+LEARNING,PROTEIN+STRUCTURE+PREDICTIONS,STRUCTURAL+BIOLOGY
- Andrea Arrieta-guevara, M., Ligia Higuera-mancipe, B., Ciencias-Química, S., & Tulia Martínez-peralta, S. (2010). Induction of phenylalanine ammonia lyase and variation in phenolic compounds content in Lulo fruits (*Solanum quitoense* Lam) infected by *Colletotrichum acutatum*. In *Acta biol. Colomb* (Vol. 15, Issue 1).
- Bender, B. J., Gahbauer, S., Lutten, A., Lyu, J., Webb, C. M., Stein, R. M., Fink, E. A., Balus, T. E., Carlsson, J., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2021). A practical guide to large-scale docking. *Nature Protocols* 2021 16:10, 16(10), 4799–4832. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00597-z>
- Bertoline, L. M. F., Lima, A. N., Krieger, J. E., & Teixeira, S. K. (2023). Before and after AlphaFold2: An overview of protein structure prediction. *Frontiers in Bioinformatics*, 3, 1120370. <https://doi.org/10.3389/FBINF.2023.1120370/BIBTEX>
- 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>
- Culcay, M. (2024). Bioprospección de plantas amazónicas con alto contenido de flavonoides como indicador del potencial para la síntesis verde de nZVI. *Universidad Regional Amazónica Ikiam*. http://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/819
- Danish Rizvi, S. M., Shakil, S., & Haneef, M. (2013). A SIMPLE CLICK BY CLICK PROTOCOL TO PERFORM DOCKING: AUTODOCK 4.2 MADE EASY FOR

- NON-BIOINFORMATICIANS. In *EXCLI Journal* (Vol. 12).
<http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-registration/autodock-4-0-1-and-autogrid-4-0.0>
- Dao, T. T. H., Linthorst, H. J. M., & Verpoorte, R. (2011). Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 397.
<https://doi.org/10.1007/S11101-011-9211-7>
- Dias, T., de Melo, H. C., Alves, F. R. R., Carvalho, R. F., da Silva Carneiro, K., & Sousa, C. M. (2015). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em frutos de tomateiros mutantes fotomorfogenéticos. *Ciência Rural*, 45(5), 782–787.
<https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20140098>
- Fanelli, A., & Sullivan, M. L. (2023). Tools for protein structure prediction and for molecular docking applied to enzyme active site analysis: A case study using a BAHD hydroxycinnamoyltransferase. *Methods in Enzymology*, 683, 41–79.
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2022.10.004>
- Farmacéutica Mexicana, A., México Morales, A. J., & de Jesús, J. (2012). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43, 79–81.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57928311010>
- Fusani, L., Palmer, D. S., Somers, D. O., & Wall, I. D. (2020). Exploring Ligand Stability in Protein Crystal Structures Using Binding Pose Metadynamics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(3), 1528–1539.
<https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.9B00843>
- Gallego, A. M., Rojas, L. F., Valencia, W. G., Atehortúa, L., Urrea, A. I., Fister, A. S., Guiltinan, M. J., Maximova, S. N., & Pabón-Mora, N. (2021). Transcriptomic analyses of cacao flavonoids produced in photobioreactors. *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07871-0>
- González, C., Castillo, C., Angiolillo, G., Fernández, D., & Ascanio, A. (2016). Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias en el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. *Revista Del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 47(1–2), 143–149.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772016000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Hernández, J. P., Núñez-Zarur, F., Gutiérrez-Oliva, S., LastNameToro-Labbé, A., & Vivas-Reyes, R. (2020). Diels-Alder reaction mechanisms of substituted chiral

- anthracene: A theoretical study based on the reaction force and reaction electronic flux. *Journal of Computational Chemistry*, 41(23), 2022–2032. <https://doi.org/10.1002/JCC.26360>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:1096987X
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021 596:7873, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kang, Y. L., Pei, J., Cai, W. L., Liu, W., Luo, J., & Wu, Q. H. (2014). Research progress on flavonoid metabolic synthesis pathway and related function genes in medicinal plants. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 45(9), 1336–1341. <https://doi.org/10.7501/J.ISSN.0253-2670.2014.09.026>
- Keil, R. G., & Mayer, L. M. (2014). Mineral Matrices and Organic Matter. *Treatise on Geochemistry: Second Edition*, 12, 337–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.01024-X>
- Khatri, P., Chen, L., Rajcan, I., & Dhaubhadel, S. (2023a). Functional characterization of Cinnamate 4-hydroxylase gene family in soybean (*Glycine max*). *PLOS ONE*, 18(5), e0285698. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0285698>
- Khatri, P., Chen, L., Rajcan, I., & Dhaubhadel, S. (2023b). Functional characterization of Cinnamate 4-hydroxylase gene family in soybean (*Glycine max*). *PLOS ONE*, 18(5), e0285698. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0285698>
- Kumar, S., Pandey, A. K., Lu, K. P., & Sastre, J. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013(1), 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Lackie, J. M. (2013). Chalcona isomerasa. *The Dictionary of Cell & Molecular Biology*, 88–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384931-1.00003-9>
- Lewis, J. A., Zhang, B., Harza, R., Palmer, N., Sarath, G., Sattler, S. E., Twigg, P., Vermeris, W., & Kang, C. H. (2023). Structural Similarities and Overlapping Activities among Dihydroflavonol 4-Reductase, Flavanone 4-Reductase, and Anthocyanidin Reductase Offer Metabolic Flexibility in the Flavonoid Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13901.

<https://doi.org/10.3390/IJMS241813901/S1>

- 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>
- Lujano, E., Manganiello, L., Contento, A., & Ríos, Á. (2019). *Identificación y cuantificación de (+) - Catequinas y Procianidinas en cacao* . Revista INGENIERÍA UC, Vol. 26. <https://www.redalyc.org/journal/707/70760276008/html/>
- Martínez Cuesta, S., Rahman, S. A., Furnham, N., & Thornton, J. M. (2015). The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysical Journal*, 109(6), 1082–1086. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.020>
- Mate, D. (2019). *Evolución dirigida de enzimas: una revolución en Química*. Universidad de los Andes. <https://www.redalyc.org/journal/933/93361139004/html/>
- Montse, X., & Prado, A. (2021, January). *El cacao y sus propiedades saludables - Farmaceuticonline*. <https://www.farmaceuticonline.com/es/cacao-chocolate-propiedades-saludables/>
- Pak, M. A., Markhieva, K. A., Novikova, M. S., Petrov, D. S., Vorobyev, I. S., Maksimova, E. S., Kondrashov, F. A., & Ivankov, D. N. (2023). Using AlphaFold to predict the impact of single mutations on protein stability and function. *PLOS ONE*, 18(3), e0282689. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0282689>
- Pandey, P., Srivastava, S., Pandey, A. K., & Dubey, R. S. (2020). Abiotic-stress tolerance in plants-system biology approach. *Plant Life Under Changing Environment*, 577–609. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818204-8.00025-4>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/PRO.3943>;JOURNAL:JOURNAL:1469896X;CSUBTYPE:STRING:SPECIAL;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
- Ramírez, J., & Ayala, M. (2014). Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? *UNAM*. <https://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/>
- Recinos, M. F., Winnier, S., Lagerhausen, K., Ajayi, B., Wolff, K., Friedhoff, R., Dassow, C. M., Choudhary, N., & Pucker, B. (2024). Cacao genome sequence

- reveals insights into the flavonoid biosynthesis. *BioRxiv*, 2024.11.23.624982.
<https://doi.org/10.1101/2024.11.23.624982>
- Ruchawapol, C., Fu, W. W., & Xu, H. X. (2022). A review on computational approaches that support the researches on traditional Chinese medicines (TCM) against COVID-19. *Phytomedicine*, 104.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154324>
- Sakakibara, K., Higashi, Y., & Nakabayashi, R. (2019). The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 10, 468057.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00943/XML/NLM>
- Singh, S. K., Srivastav, S., Castellani, R. J., Plascencia-Villa, G., & Perry, G. (2019). Neuroprotective and Antioxidant Effect of Ginkgo biloba Extract Against AD and Other Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*, 16(3), 666.
<https://doi.org/10.1007/S13311-019-00767-8>
- Tang, H., Finn, R. D., & Thomas, P. D. (2019). TreeGrafter: Phylogenetic tree-based annotation of proteins with Gene Ontology terms and other annotations. *Bioinformatics*, 35(3), 518–520.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY625>,
- Vásquez, J. (2024). *Caracterización agro morfológica de genotipos de Theobroma cacao L. cacao elite, como estrategia de conservación genética bajo condiciones de trópico seco, Utcubamba, Amazonas, Perú.*
<http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/13281>
- 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* 2020 11:1, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14558-9>
- Wang, L., Chen, M., Lam, P. Y., Dini-Andreote, F., Dai, L., & Wei, Z. (2022). Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. *Microbiome* 2022 10:1, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S40168-022-01420-X>
- Wang, Y., Tian, Z., Li, Z., & Kim, J. C. (2023). Effects of Flavonoid Supplementation on Athletic Performance in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-

- Analysis. *Nutrients*, 15(21), 4547. <https://doi.org/10.3390/NU15214547>
- Wani, T. A., Pandith, S. A., Gupta, A. P., Chandra, S., Sharma, N., & Lattoo, S. K. (2017). Molecular and functional characterization of two isoforms of chalcone synthase and their expression analysis in relation to flavonoid constituents in *Grewia asiatica* L. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179155>
- Weston, L. A., & Mathesius, U. (2020). Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 2013 39:2, 39(2), 283–297. <https://doi.org/10.1007/S10886-013-0248-5>
- Zagoskina, N. V., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13874. <https://doi.org/10.3390/IJMS241813874>

ANEXOS

Anexo 1. Resultados del *docking molecular*, obtenidos de AutoDockTools.

Flavonol sintasa (FLS)	Flavanona 3-hidroxisilasa (F3H)
Conformation 1 Info	Conformation 1 Info
binding_energy = -0.58	binding energy range in this cluster of 5
ligand_efficiency = -0.02	is 30.25
inhib_constant = 372.81	binding_energy = 30.72
inhib_constant_units = mM	ligand_efficiency = 0.99
intermol_energy = -5.06	intermol_energy = 26.25
vdw_hb_desolv_energy = -5.5	vdw_hb_desolv_energy = 26.42
electrostatic_energy = 0.44	electrostatic_energy = -0.17
total_internal = -2.64	total_internal = 3.7
torsional_energy = 4.47	torsional_energy = 4.47
unbound_energy = -2.64	unbound_energy = 3.7
filename = log.dlg	filename = log.dlg
clRMS = 0.0	clRMS = 1.58
refRMS = 4.33	refRMS = 4.52
Conformation 2 Info	Conformation 2 Info
binding_energy = 7.95	binding energy range in this cluster of 1
ligand_efficiency = 0.26	is 0.00
intermol_energy = 3.48	binding_energy = 76.8
vdw_hb_desolv_energy = 3.4	ligand_efficiency = 2.48
electrostatic_energy = 0.07	intermol_energy = 72.32
total_internal = -1.54	vdw_hb_desolv_energy = 71.76
torsional_energy = 4.47	electrostatic_energy = 0.56
unbound_energy = -1.54	total_internal = 14.23
filename = log.dlg	torsional_energy = 4.47
clRMS = 0.0	unbound_energy = 14.23
refRMS = 4.12	filename = log.dlg
	clRMS = 0.0
	refRMS = 3.56
Conformation 3 Info	Conformation 3 Info

Flavonol sintasa (FLS)	Flavanona 3-hidroksilasa (F3H)
binding_energy = 2.85	binding energy range in this cluster of 5 is 30.25
ligand_efficiency = 0.09	
intermol_energy = -1.63	binding_energy = 14.59
vdw_hb_desolv_energy = -2.01	ligand_efficiency = 0.47
electrostatic_energy = 0.38	intermol_energy = 10.12
total_internal = -1.56	vdw_hb_desolv_energy = 9.56
torsional_energy = 4.47	electrostatic_energy = 0.56
unbound_energy = -1.56	total_internal = -1.37
filename = log.dlg	torsional_energy = 4.47
clRMS = 1.48	unbound_energy = -1.37
refRMS = 4.55	filename = log.dlg
	clRMS = 1.7
	refRMS = 4.3
Conformation 4 Info	Conformation 4 Info
binding_energy = 2.85	binding energy range in this cluster of 5 is 30.25
ligand_efficiency = 0.09	
intermol_energy = -1.63	binding_energy = 7.28
vdw_hb_desolv_energy = -2.01	ligand_efficiency = 0.23
electrostatic_energy = 0.38	intermol_energy = 2.8
total_internal = -1.56	vdw_hb_desolv_energy = 2.63
torsional_energy = 4.47	electrostatic_energy = 0.17
unbound_energy = -1.56	total_internal = -4.01
filename = log.dlg	torsional_energy = 4.47
clRMS = 1.48	unbound_energy = -4.01
refRMS = 4.55	filename = log.dlg
	clRMS = 1.61
	refRMS = 4.54
Conformation 5 Info	Conformation 5 Info
binding_energy = 2.03	binding energy range in this cluster of 5 is 30.25
ligand_efficiency = 0.07	
intermol_energy = -2.45	binding_energy = 0.47
vdw_hb_desolv_energy = -2.26	ligand_efficiency = 0.02

Flavonol sintasa (FLS)	Flavanona 3-hidroksilasa (F3H)
electrostatic_energy = -0.18	intermol_energy = -4.0
total_internal = -1.33	vdw_hb_desolv_energy = -3.47
torsional_energy = 4.47	electrostatic_energy = -0.53
unbound_energy = -1.33	total_internal = -2.01
filename = log.dlg	torsional_energy = 4.47
clRMS = 1.57	unbound_energy = -2.01
refRMS = 4.57	filename = log.dlg
	clRMS = 0.0
	refRMS = 4.23
Conformation 6 Info	Conformation 6 Info
binding_energy = 0.02	binding energy range in this cluster of 5
ligand_efficiency = 0.0	is 30.25
intermol_energy = -4.46	binding_energy = 4.55
vdw_hb_desolv_energy = -3.84	ligand_efficiency = 0.15
electrostatic_energy = -0.61	intermol_energy = 0.08
total_internal = -2.24	vdw_hb_desolv_energy = -0.59
torsional_energy = 4.47	electrostatic_energy = 0.66
unbound_energy = -2.24	total_internal = -2.39
filename = log.dlg	torsional_energy = 4.47
clRMS = 1.49	unbound_energy = -2.39
refRMS = 4.67	filename = log.dlg
	clRMS = 1.41
	refRMS = 4.37
Conformation 7 Info	Conformation 7 Info
binding_energy = -0.58	binding energy range in this cluster of 3
ligand_efficiency = -0.02	is 8.60
inhib_constant = 375.74	binding_energy = 11.05
inhib_constant_units = mM	ligand_efficiency = 0.36
intermol_energy = -5.05	intermol_energy = 6.58
vdw_hb_desolv_energy = -4.73	vdw_hb_desolv_energy = 6.6
electrostatic_energy = -0.32	electrostatic_energy = -0.02
total_internal = -1.77	total_internal = -1.13

Flavonol sintasa (FLS)	Flavanona 3-hidroxilasa (F3H)
torsional_energy = 4.47	torsional_energy = 4.47
unbound_energy = -1.77	unbound_energy = -1.13
filename = log.dlg	filename = log.dlg
clRMS = 1.39	clRMS = 1.71
refRMS = 4.86	refRMS = 3.87
Conformation 8 Info	Conformation 8 Info
binding_energy = 2.6	binding energy range in this cluster of 3
ligand_efficiency = 0.08	is 8.60
intermol_energy = -1.88	binding_energy = 19.4
vdw_hb_desolv_energy = -2.14	ligand_efficiency = 0.63
electrostatic_energy = 0.27	intermol_energy = 14.93
total_internal = -3.36	vdw_hb_desolv_energy = 14.49
torsional_energy = 4.47	electrostatic_energy = 0.44
unbound_energy = -3.36	total_internal = -1.98
filename = log.dlg	torsional_energy = 4.47
clRMS = 1.49	unbound_energy = -1.98
refRMS = 4.49	filename = log.dlg
	clRMS = 1.73
	refRMS = 3.8
Conformation 9 Info	Conformation 9 Info
binding_energy = -2.82	binding energy range in this cluster of 1
ligand_efficiency = -0.09	is 0.00
inhib_constant = 8.63	binding_energy = 67.16
inhib_constant_units = mM	ligand_efficiency = 2.17
intermol_energy = -7.29	intermol_energy = 62.68
vdw_hb_desolv_energy = -6.67	vdw_hb_desolv_energy = 62.51
electrostatic_energy = -0.62	electrostatic_energy = 0.17
total_internal = -1.11	total_internal = 7.65
torsional_energy = 4.47	torsional_energy = 4.47
unbound_energy = -1.11	unbound_energy = 7.65
filename = log.dlg	filename = log.dlg
clRMS = 0.0	clRMS = 0.0

Flavonol sintasa (FLS)	Flavanona 3-hidroxilasa (F3H)
refRMS = 4.54	refRMS = 4.02
Conformation 10 Info	Conformation 10 Info
binding_energy = 12.33	binding energy range in this cluster of 3
ligand_efficiency = 0.4	is 8.60
intermol_energy = 7.86	binding_energy = 10.8
vdw_hb_desolv_energy = 6.76	ligand_efficiency = 0.35
electrostatic_energy = 1.1	intermol_energy = 6.32
total_internal = -3.02	vdw_hb_desolv_energy = 6.9
torsional_energy = 4.47	electrostatic_energy = -0.58
unbound_energy = -3.02	total_internal = -2.18
filename = log.dlg	torsional_energy = 4.47
clRMS = 1.45	unbound_energy = -2.18
refRMS = 4.48	filename = log.dlg
	clRMS = 0.0
	refRMS = 3.75