

**UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA**

**Escuela de Ciencias**

**Departamento de Ciencias Químico Biológicas**



**Amplificación y análisis *in silico* de una probable chalcona  
sintasa de *Bacillus subtilis***

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores  
presenta la estudiante

**Gloria Priscila López Madrigal**

**150034**

**Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas**

**Director de Tesis: Dr. José Daniel Lozada Ramírez**

San Andrés Cholula, Puebla.

**Otoño 2018**

## Hoja de firmas

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores  
presenta el estudiante Gloria Priscila López Madrigal, 150034.

### **Director de Tesis**

---

**Dr. José Daniel Lozada Ramírez**

### **Presidente de Tesis**

---

**Dra. Ana Eugenia Ortega Regules**

### **Secretario de Tesis**

---

**M.C. Ana Laura Manzano Covarrubias**

## Índice

I. Introducción .....	4
I. Chalcona.....	4
II. Propiedades medicinales.....	5
III. Síntesis .....	7
IV. Biosíntesis: Chalcona sintasa .....	10
II. Justificación .....	13
III. Objetivos.....	14
I. Objetivo general .....	14
II. Objetivos específicos .....	14
IV. Marco teórico .....	15
V. Metodología.....	17
I. Elección de microorganismo.....	17
II. Extracción de ADN genómico .....	17
III. Diseño de oligonucleótidos .....	17
IV. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	18
V. Análisis <i>in silico</i> .....	18
VI. Resultados y discusión .....	19
I. Elección de microorganismo.....	19
II. Extracción de ADN genómico .....	20
III. Diseño de oligonucleótidos.....	22
IV. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	23
V. Análisis <i>in silico</i> .....	24
VII. Conclusiones y recomendaciones .....	32
VIII. Bibliografía.....	33

## I. Introducción

### I. Chalconas

Los productos naturales son una de las fuentes más importantes para la obtención de productos medicinales. De igual manera, el desarrollo de nuevos fármacos sintetizados a partir de materias primas naturales con actividades biológicas específicas es de gran importancia, por lo que continuamente se buscan en la naturaleza nuevos compuestos que pueden presentar alguna actividad biológica de interés (Ramírez, Barajas, Pérez, Sáenz & Silva, 2012).

Las plantas han sido una de las fuentes principales de fármacos y productos medicinales, un ejemplo de esto son las chalconas, también conocidas como acetilfenona bencilo o acetofenona bencilideno, que se pueden encontrar de manera extensa en plantas comestibles (Gomes et al., 2017).

Su estructura química consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres carbonos. Como se muestra en la Figura 1, las chalconas (1, 3-difenil-2-propen-1-onas) son cetonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas formadas por dos anillos aromáticos (anillo A y B) que tienen una amplia gama de sustituyentes. Estos anillos están interconectados por un sistema carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado de tres carbonos que asumen una estructura lineal o casi plana (Yerragunta et al., 2013).

Las chalconas existen como isómeros trans (E) o cis (Z). No obstante, en la mayoría de los casos el isómero E es la forma termodinámicamente más estable por lo que el isómero E se aísla como la mayoría de los chalconas. La configuración del isómero Z es inestable debido a los fuertes efectos estéricos entre el grupo carbonilo y el anillo B. Por lo

tanto, la recristalización de una mezcla E - Z resulta en el isómero E como el único estereoisómero (Evrans Aksöz & Ertan, 2011).

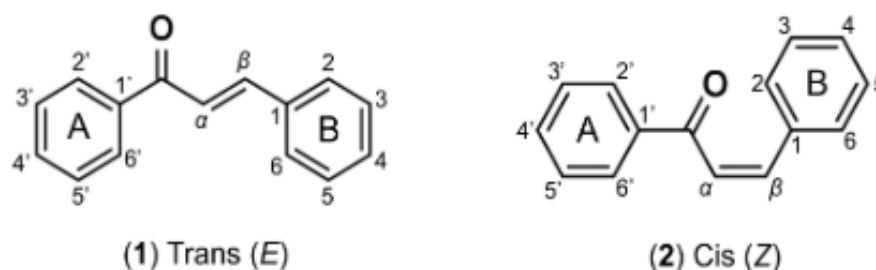


Figura 1. Estructura de los isómeros de chalconas (Gomes et al. 2017).

## II. Propiedades medicinales

Las chalconas son compuestos naturales que se pueden encontrar en diversos géneros de plantas como *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* y *Scutellaria*, las cuales son conocidas por su uso como remedios populares tradicionales para variedad de afecciones.

Cabe mencionar que chalconas son intermediarias en la biosíntesis de flavonoides, los cuales son sustancias muy difundidas en las plantas que presentan diversas actividades biológicas (Chavan et al., 2016).

La química de los chalconas significa un gran atractivo para los investigadores debido a la gran cantidad de hidrógenos reemplazables que permiten generar una extensa cantidad de derivados y con ello una variedad de actividades biológicas prometedoras. Por lo tanto las chalconas presentan una importante y amplia gama de propiedades medicinales.

Esta importancia se podría dividir en dos ramas. Siendo una de ellas su actividad biológica, incluidas sus propiedades antiinflamatorias (Israfi, Khaizurin, Syahida, Lajis &

Khozirah, 2007), propiedades antihistamínicas (Yamamoto et al., 2004), propiedades antioxidantes (Aoki, Muko, Ohta & Ohta, 2008), propiedades antigota (Kim et al., 2014), propiedades adyuvantes en el tratamiento de la obesidad (Birari, Gupta, Mohan & Bhutani, 2011), propiedades anti parasitarias (Chen et al., 1993), propiedades antitumorales (Canela et al., 2017), entre muchas otras.

Sin embargo, también es importante mencionar su reconocida utilidad sintética en la preparación de sistemas heterocíclicos de interés farmacológico como lo son, por ejemplo, las pirazolinas, las cuales son sintetizadas mediante la reacción de chalconas y clorhidrato de fenilhidrazina en presencia de una solución acuosa de acetato de sodio y ácido acético bajo irradiación con ultrasonido (Yusuf & Jain, 2014).

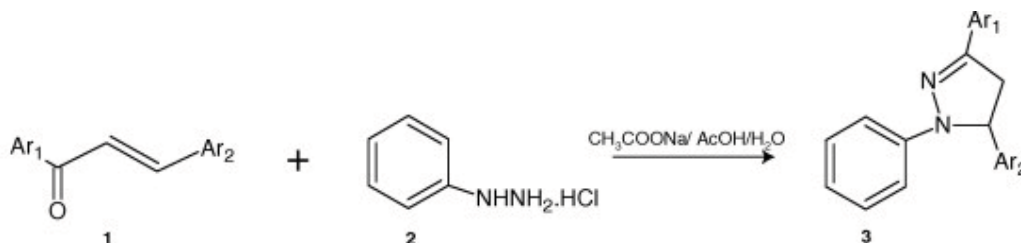


Figura 2. Reacción para la síntesis de pirazolinas (Yusuf & Jain, 2014).

Las pirazolinas y sus derivados han sido objeto de estudio en gran medida debido a sus actividades farmacológicas que incluyen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antituberculosas (Ahmad, Husain, Khan, Mujeeb & Bhandari, 2016). Además, tiene propiedades como inhibidor de la sintetasa de óxido nítrico, (Kumar, Bawa, Drabu, Kumar & Gupta, 2009) sustancia que se ha visto es una de las causas fundamentales que subyacen a los trastornos neurodegenerativos y al dolor neuropático (Mukherjee et al., 2014).

### III. Síntesis

Actualmente, existe una amplia variedad de métodos y esquemas disponibles para la síntesis de derivados de chalcona. Sin embargo, en cada uno de estos métodos, la parte más importante es la condensación de dos sistemas aromáticos (con grupos nucleófilos y electrófilos) para producir la base de la chalcona (Ramírez, Barajas, Pérez, Sáenz & Silva, 2012).

La forma principal de obtención de chalconas, es mediante el proceso conocido como reacción de Claisen-Schmidt. En esta la síntesis es posible a través de la condensación de derivados de benzaldehído y acetofenona en presencia de catalizadores alcalinos o ácidos (Figura 3) en solventes líquidos a temperaturas de entre 50-100 °C durante varias horas (Gomes et al., 2017).

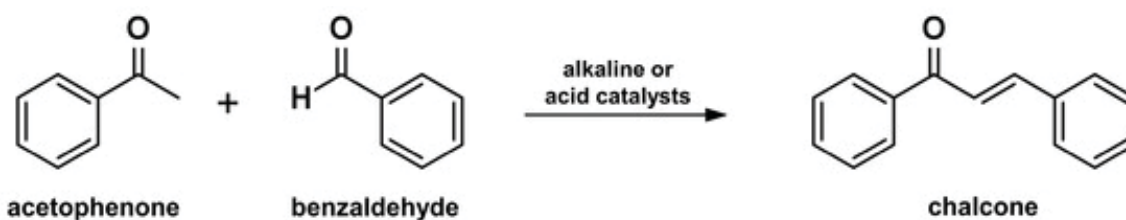


Figura 3. Condensación de Claisen-Schmidt (Gomes et al., 2017).

La reacción de Claisen-Schmidt convencional se lleva a cabo típicamente en la fase líquida, pero también existe la síntesis de chalconas en la fase sólida, como se muestra en la Figura 4, esta reacción se realiza empleando clorotritil cloruro como resina de soporte. En esta, los derivados de hidroxiacetofenona se unen principalmente a la resina y luego se tratan con derivados de benzaldehídos utilizando hidróxido de sodio en metanol como catalizador para que finalmente las hidroxichalconas formadas se liberen mediante la adición de ácido trifluoroacético.

Esta reacción también se puede llevar a cabo sin disolventes. Bajo este método las chalconas son sintetizadas por la condensación equimolar de benzaldehído y acetofenona en presencia de un catalizador. Por ejemplo, condensación en presencia del catalizador triazabicyclodeceno por 3 horas a 100 °C (Mahapatra, Bharti & Asati, 2015).

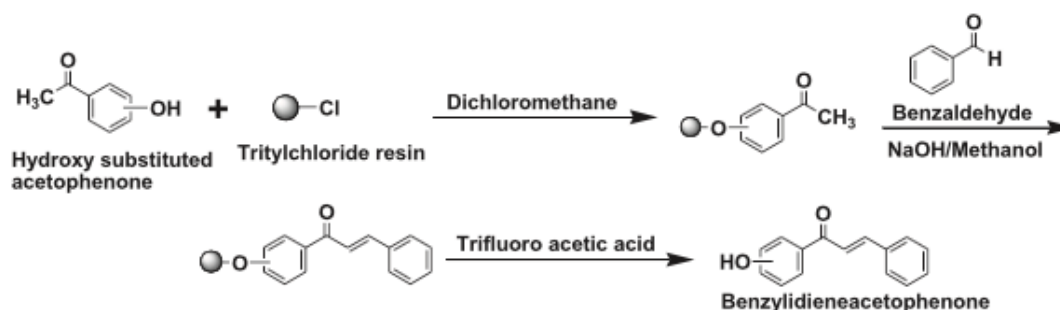


Figura 4. Condensación de Claisen-Schmidt en fase sólida (Mahapatra, Bharti & Asati, 2015).

Si bien el método de condensación de Claisen-Schmidt es el más común para la síntesis de chalconas, en la literatura es posible encontrar varias modificaciones al mismo, esto con el fin de hacerlo más eficiente y buscar mejoras tanto en el incremento de los rendimientos del producto, así como en la búsqueda de tiempos de reacción más cortos. Así mismo, se ha buscado incorporar tecnologías más limpias aplicando también métodos de sustitución.

Es así que se ha comprobado que mediante el uso de diferentes equipos como el ultrasonido se logran mejoras en la obtención de los productos teniendo un mayor rendimiento en la preparación de chalconas con propiedades biológicas de interés farmacéutico (Ramírez, Barajas, Pérez, Sáenz & Silva, 2012). De igual manera, se ha visto que el uso de microondas en reacciones de Claisen-Schmidt líquidas y sin disolventes



reduce el tiempo de síntesis y produce cantidades satisfactorias de chalconas (Gomes et al., 2017).

Otros métodos por los cuales se pueden sintetizar chalconas incluyen la reacción de acoplamiento de Heck (en el que las chalconas se sintetizan mediante la reacción de haluro de arilo con estireno en presencia de monóxido de carbono utilizando paladio como catalizador), reacción de acoplamiento (en el que las chalconas se sintetizan mediante una reacción de acoplamiento entre una cantidad equimolar de fenilacetileno y benzaldehído en presencia de bromuro de hidrógeno y 1-butil-3-metil-1H-imidazolium 4-metilbencenosulfonato (BmimOT) durante 12 horas a 100 °C), la reacción de acoplamiento SuzukiMiyaura (reacción de acoplamiento cruzado de organoboranos con haluro orgánico en presencia de una base catalizada por paladio en donde la síntesis de chalconas implica una de dos estrategias; acoplamiento de ácidos arilborónicos con cloruro de cinamoilo o ácido estilborónico con cloruro de benzoilo, cualquiera empleando trifenilfosfina paladio (Pd(PPh<sub>3</sub>)), carbonato de cesio y tolueno anhidro) (Mahapatra, Bharti & Asati, 2015). Estas y otras reacciones se muestran en la Figura 5.

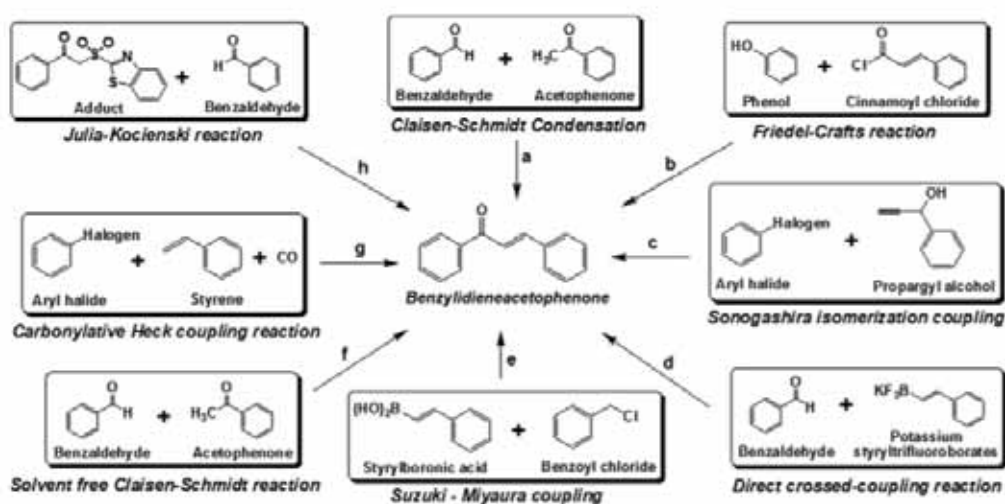


Figura 5. Reacciones populares para la síntesis de chalconas (Mahapatra, Bharti & Asati, 2015).

#### IV. Biosíntesis: Chalcona sintasa

En la naturaleza las plantas están expuestas a una variedad de estreses bióticos y abióticos. Los virus, bacterias, hongos, nematodos y otras plagas que atacan a las plantas son ejemplos de estrés bióticos, mientras que la luz, la temperatura, las heridas y la sequía son ejemplos de estrés abióticos. Dicho estrés puede inducir muchos cambios bioquímicos distintivos, los cuales pueden incluir la producción de compuestos protectores en el sitio de la lesión o bien sistemáticamente (Bowles, 1990).

La enzima chalcona sintasa (CHS, por sus siglas en inglés) es una enzima clave de la vía de biosíntesis de flavonoides e isoflavonoides. Esta además de ser parte del programa de desarrollo de la planta, se induce en plantas bajo condiciones de estrés, como en la exposición a luz UV, infección bacteriana o micótica. La expresión de CHS causa la acumulación de flavonoides y fitoalexinas isoflavonoides y está involucrada en la vía de defensa del ácido salicílico (Dao, Linthorst & Verpoorte, 2011).

La enzima chalcona sintasa forma parte del grupo de enzimas policétido sintasa (PKS, por sus siglas en inglés) de tipo III. Esta enzima es estructural y mecánicamente la PKS más simple. Esta es una enzima homodimérica, tal como se muestra en la Figura 6, con dos sitios activos independientes que catalizan una serie de reacciones de descarboxilación, condensación y ciclación. Consta de dos dominios estructurales; en el dominio superior hay cuatro aminoácidos (Cys164, Phe215, His303 y Asn336) que están presentes en el sitio activo y que forman parte de la maquinaria catalítica de CHS. Mientras que en el dominio inferior se encuentra un gran sitio activo que proporciona el espacio necesario para el tetracétido requerido para la formación de chalcona de un p-cumaroil-CoA y tres malonil-CoA (Dao, Linthorst & Verpoorte, 2011).

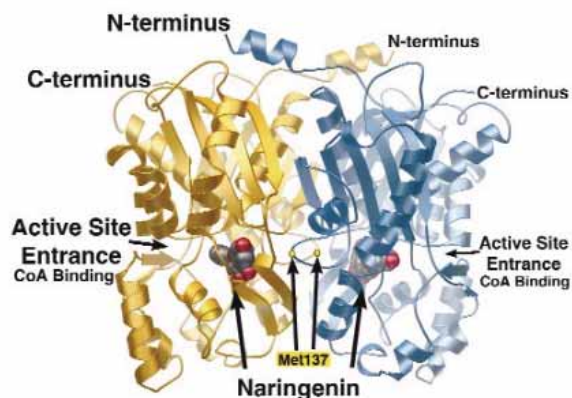


Figura 6. Representación del homodímero de CHS de *Medicago sativa* (Noel, Ferrer, Jez, Bowman & Dixon, 19996)

El mecanismo para la síntesis de chalcona da inicio con la unión de p-cumaroil-CoA a CHS. Posterior a esto, Cys164, activada por His303, ataca el enlace tioéster, transfiriendo el residuo cumarilo a Cys164, formando así el monocétido intermedio.

Seguidamente, la coenzima A se disocia de la enzima, dejando un tioéster de cumarilo en Cys164. La unión del primer malonil-CoA posiciona el carbono metileno del residuo malonilo cerca del carbono carbonilo del tioéster de cumarilo covalentemente unido. Posteriormente la descarboxilación de malonil-CoA conduce a la formación del carbanión. El ataque de este carbanión al tioéster cumarilo libera el anión tiolato de Cys164 y transfiere el grupo cumarilo al residuo acetilo del tioéster CoA, de esta manera se genera el dicétido CoA. La captura de este dicétido-CoA alargado por Cys164 y la liberación de CoA establece el escenario para dos rondas adicionales de alargamiento, lo que resulta en la formación del tetracétido intermedio de reacción.

La reacción de ciclación catalizada por CHS es una condensación de Claisen intramolecular que abarca las tres unidades de acetato derivadas de tres malonil-CoA.

Durante la ciclación, el grupo de metileno nucleófilo más cercano al resto cumariloilo ataca el carbono carbonilo del tioéster unido a Cys164. El cierre del anillo se produce a través de una transferencia interna de protones desde el carbono nucleófilo al oxígeno carbonilo y el desglose de este intermedio tetraédrico expulsa el sistema de anillo recién ciclado de Cys164. Finalmente, la posterior aromatización del anillo de triona a través de una segunda serie de transferencias internas de protones produce chalcona (Noel, Ferrer, Jez, Bowman & Dixon, 1999). Un esquema general de este mecanismo de reacción se muestra en la Figura 7.

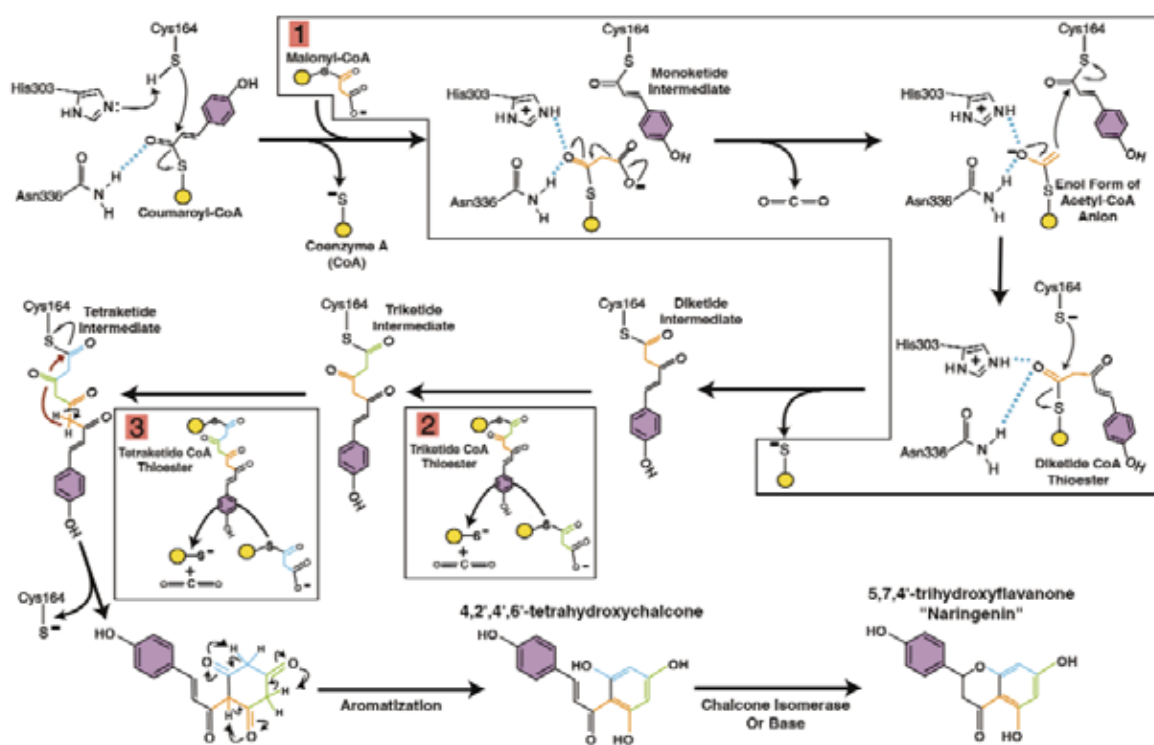


Figura 7. Esquema del mecanismo de reacción de la síntesis de chalcona por la enzima chalcona sintasa (Noel, Ferrer, Jez, Bowman & Dixon, 1999).

## II. Justificación

Las chalconas han sido ampliamente estudiadas debido a la gran cantidad de derivados que pueden generar y con ello a la gran variedad y potencial de actividades biológicas que presentan. Es por esto que dichos compuestos han encontrado una gran importancia en el estudio y desarrollo de distintos fármacos así como una valiosa utilidad sintética en la preparación de sistemas heterocíclicos que también resultan de interés farmacológico.

Actualmente, la obtención de estos compuestos se logra mediante reacciones químicas, siendo la reacción de Claisen-Schmidt la más común. Sin embargo, aunque esta reacción sea la más popular para la síntesis de chalconas esto no significa que sea una reacción con alto rendimiento. En efecto en la literatura se pueden encontrar diversas modificaciones que intentan incrementar el rendimiento de la reacción, acortar el tiempo de reacción, usar tecnologías más limpias, entre otros. De igual manera, muchos de los métodos para sintetizar chalconas requieren del uso de compuestos químicos dañinos para la salud y el medio ambiente, como por ejemplo el fenol.

Debido a esto, se decidió investigar acerca de una posible chalcona sintasa que se pudiera expresar mediante un microorganismo y mimetizara la función de las chalconas sintasas que se encuentran naturalmente en diversas plantas. De esta manera se podría crear una alternativa a los métodos actuales para la síntesis de chalconas, que fuera más limpio y potencialmente más eficiente.

### III. Objetivos

#### I. Objetivo general

Amplificar un gen que codifica para una enzima chalcona sintasa, con previo análisis *in silico* de la secuencia seleccionada.

#### II. Objetivos específicos

- Seleccionar microorganismo y gen a amplificar.
- Establecer el protocolo de extracción de ADN genómico del microorganismo seleccionado con mayor grado de satisfacción.
- Analizar la secuencia del gen amplificado usando herramientas bioinformáticas.
- Amplificar el gen codificante de la enzima chalcona sintasa del microorganismos seleccionado.

#### IV. Marco teórico

Como se mencionó en la introducción, la enzima chalcona sintasa es una enzima clave en la biosíntesis de flavonoides e isoflavonoides, las cuales son sustancias de gran importancia para las plantas ya que están involucradas en vías de defensa. Sin embargo, aunque esta clase de metabolitos secundarios biológicamente activos se puedan encontrar ampliamente en variedad de plantas, estos están en gran parte ausentes en las bacterias. No obstante, se ha visto en algunas bacterias la presencia de enzimas policétido sintasa de tipo III, familia a la que pertenece la enzima chalcona sintasa, por lo cual estudiar estas enzimas nos puede dar una idea de la manera en que la enzima chalcona sintasa putativa podría trabajar.

La primera enzima bacteriana de tipo CHS en ser caracterizada funcionalmente fue RppA, una PKS tipo III clonada de *Streptomyces griseus* la cual es una sintasa de 1,3,6,8-Tetrahidroxinaftaleno (THN), compuesto que participa en la vía de biosíntesis de la melanina y de la flaviolina. Este homodímero de ~85 kD cataliza la formación de THN a partir de cinco moléculas de malonil-CoA (Austin & Noel, 2003).

Se piensa que el THN se incorpora a una familia de productos naturales de naftoquinona prenilados encontrados en varias especies de *Streptomyces*. Consistente con esta hipótesis, una de las tres secuencias similares a CHS que se encontraron en *S. coelicolor* es altamente homóloga a RppA de *S. griseus* (Austin & Noel, 2003).

*Streptomyces coelicolor* es un modelo actinomiceto que ha servido como una herramienta genética clave en la biología de *Streptomyces*. Recientemente, se completó la secuenciación de su genoma y el análisis de la secuencia reveló tres genes PKS tipo III putativos, uno de ellos relacionados con la PKS de tipo III RppA de *S. griseus*.

El supuesto gen codificante THNS de *S. coelicolor* se amplificó por PCR con los sitios de restricción apropiados, se clonó en el plásmido de expresión pHIS8 y se sobreexpresó en *E. coli*. El transformante de *E. coli* produjo un pigmento rojo oscuro, y tras análisis de HPLC se verificó la presencia de flaviolina, el producto de autooxidación de THN (Moore et al., 2002).

Es importante mencionar que un modelo de homología de *S. coelicolor* THNS basado en la estructura cristalina de CHS de alfalfa reveló una serie de cambios inusuales en el sitio activo. La conservación de la tríada catalítica, como de la Pro375 absolutamente conservada hablan de la confiabilidad del alineamiento estructural, a pesar de que hay una baja similitud de secuencia entre las dos enzimas.

Sin embargo, a diferencia de las PKS de plantas, que tienen una cisteína de un solo sitio activo, este modelo reveló cuatro cisteínas en el sitio activo de THNS. Las tres cisteínas, en las posiciones de CHS 132, 194 y 197, se conservan entre las enzimas THN de *Streptomyces* y se producen en las posiciones que se sabe que son importantes para modular tanto la especificidad del sustrato como la ciclación adecuada de los compuestos intermedios de policétidos. Sin embargo, su función no ha sido comprobada por lo que es una cuestión de especulación si la reactividad potencial del sitio activo rico en cisteína en THNS desempeña un papel ya sea promoviendo el plegamiento adecuado de policétidos intermedios o previniendo la formación de conformaciones inadecuadas de policétidos que de otro modo conducirían a productos de truncamiento (Austin & Noel, 2003).



## V. Metodología

### I. Elección de microorganismo

La secuencia de la probable enzima chalcona sintasa fue obtenida en línea de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). En dicha base de datos se realizó una búsqueda de bacterias que presentaran enzimas chalcona sintasa putativas.

### II. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico se compararon dos técnicas distintas para evaluar cuál daba resultados más adecuados para este proyecto. Con este fin se realizó el protocolo de extracción de ADN genómico propuesto por Wecke (2010) y de igual manera se hizo uso del Kit *DNeasy Blood & Tissue* de QIAGEN.

### III. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñó un *primer* específico para amplificar el gen elegido, a este se le añadieron 3 nucleótidos en los extremos 5' o 3', dependiendo si el oligonucleótido es *forward* o *reverse*.

La elección de la enzima de restricción se basó en el uso del programa online NEBcutter (New England Biolabs, <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). En este programa se realizó un análisis de digestión para saber qué enzimas de restricción sí cortaban la secuencia diseñada y cuales no.

Por otro lado, el cálculo de las propiedades fisicoquímicas del oligonucleótido se llevó a cabo mediante el uso de la herramienta online OligoCalc (Northwestern University Medical School, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

#### IV. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la reacción en cadena de la polimerasa se usó el kit *Invitrogen Platinum SuperFi Green PCR Master Mix* (Invitrogen, USA) el cual es una mezcla lista para usar que contiene ADN polimerasa, sales, magnesio y dNTPs necesarios para llevar a cabo una PCR.

Se decidió usar este kit debido a que este se considera de alta fidelidad. De igual manera, las mezclas incluyen un reactivo de densidad y dos tintes de seguimiento de electroforesis que permiten la carga directa de los productos de PCR en gel, y de esta manera agiliza los procedimientos siguientes.

La mezcla se preparó de la siguiente manera:

- 25  $\mu$ L 2X Platinum SuperFi Green PCR Master Mix
- 2.5  $\mu$ L Oligo *forward* 10  $\mu$ M
- 2.5  $\mu$ L Oligo *reverse* 10  $\mu$ M
- 1  $\mu$ L ADN genómico
- 10  $\mu$ L 5X SuperFi GC Enhancer
- Agua libre de nucleasa hasta 50  $\mu$ L

La PCR se llevó a cabo en una termociclador MaxyGene Gradient (AxyGen, USA).

#### V. Análisis *in silico*

Se emplearon herramientas en línea para el análisis de la enzima amplificada.

Estas herramientas incluyen: BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)), MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>) y PDB-viewer (<https://spdbv.vital-it.ch>).

## VI. Resultados y discusión

### I. Elección de microorganismo

De acuerdo a los resultados de la búsqueda de enzimas chalconas sintasa putativas en microorganismos en la base de datos del NCBI se eligió a la bacteria *Bacillus subtilis*.

*Bacillus subtilis* es una bacteria gram positiva y móvil que se puede aislar de innumerables entornos terrestres y acuáticos. Esta bacteria, como todos los miembros del género *Bacillus*, es capaz de formar endosporas latentes altamente resistentes en respuesta a la privación de nutrientes y otros tipos de estreses ambientales (Cuervo, 2010).

El estudio de la secuencia del genoma de *B. subtilis* ha ayudado a brindar muchos conocimientos sobre este organismo. Consistente con la opinión de que la bacteria no es un patógeno, no se han encontrado genes en su secuencia que codifiquen factores de virulencia conocidos. Por otro lado, se ha visto que el genoma codifica numerosas vías para la utilización de moléculas derivadas de plantas, reforzando la idea de que esta especie se asocia íntimamente con las plantas (Earl, Losick & Kolter, 2008).

Se decidió trabajar con esta bacteria debido a la facilidad de obtención y mantenimiento de este microorganismo dentro de la universidad. De igual manera, dado que esta bacteria es considerada no patógena no suponía ningún riesgo biológico dada la infraestructura de la UDLAP.

Adicionalmente, la asociación de este microorganismo con moléculas derivadas de plantas puede suponer que la enzima putativa chalcona sintasa podría ser prometedora para su amplificación, ya que como se mencionó previamente las chalconas son metabolitos importantes en plantas.

## II. Extracción de ADN

La bacteria con la que se trabajó es gram positiva por lo tanto se buscaron protocolos que fueran específicos para esta clase de bacterias. También se tomaron en cuenta los materiales y reactivos con los que contábamos en el laboratorio. De acuerdo a esto se optó por llevar a cabo el protocolo de extracción de ADN genómico para *B. subtilis* propuesto por Wecke (2010) con algunas modificaciones muy ligeras, así como hacer una extracción con el Kit *DNeasy Blood & Tissue* de QIAGEN.

Para el protocolo de extracción propuesto por Wecke (2010) se inocularon aproximadamente 5 mL de medio Luria-Bertani Broth (LB) inoculado con *B. subtilis* y se mantuvieron por 24 horas en agitación a 250 rpm con una temperatura de 37 °C. Posterior a este tiempo se vació el contenido en un tubo eppendorf, se centrifugó por 2 minutos a 8000 rpm, y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, en este mismo tubo, se vació un poco más del medio y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones. Se repitió este procedimiento hasta que ya no quedara mas medio con el fin de tener la mayor cantidad de bacterias. Una vez que todo el medio se hubiera pasado al tubo eppendorf se llevó a cabo una última centrifugación por 10 minutos a 5000 rpm.

La pastilla resultante se resuspendió con 400  $\mu$ L de TEN (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl), se le añadieron 20  $\mu$ L de lisozima (20 mg/ml) y se dejó en incubación por 20 minutos a 37 °C. Después de este tiempo se le agregó 2  $\mu$ L de RNasa (20 mg/mL) y se dejó en incubación por 3 minutos a 65 °C. Posteriormente se le añadieron 40  $\mu$ L SDS(10% p/p), 5  $\mu$ L de proteinasa K y 550  $\mu$ L de TEN\*(10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl), se mezcló mediante vortex y se incubó por dos horas a 60 °C.

A continuación se añadieron 900  $\mu$ L de fenol, y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces. Se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm y se transfirió la fase de arriba a un nuevo tubo eppendorf. Se repitió la extracción con fenol una vez más y dos veces con cloroformo:isoamilalcohol (24:1).

Posteriormente se transfirió la fase acuosa (parte de arriba) a un tubo de 10 mL con etanol a -20 °C. Ya que el precipitado no se formó tan bien como esperábamos, el tubo fue incubado por 20 minutos a -20 °C. Transcurrido este tiempo se pescó el ADN precipitado con un asa bacteriológica estéril y se dejó que el ADN se seque al aire. Finalmente se disolvió el ADN en 100  $\mu$ L de TEN\*.

Para la extracción con el Kit *DNeasy Blood & Tissue* de QIAGEN se cultivaron las bacterias de la misma manera, es decir se inocularon 5 mL de medio Luria-Bertani Broth (LB) inoculado con *B. subtilis* y se mantuvieron en agitación a 250 rpm con una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se siguió el protocolo de pretratamiento de bacterias gram positivas y posteriormente el protocolo de purificación del ADN total a partir de tejidos animales tal como se especifica en las instrucciones del manual de *Blood & Tissue* (QIAGEN, 2006).

Ambas técnicas demostraron ser efectivas para la extracción de DNA genómico de *B. subtilis*. Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 8, el ADN extraído por el método de Wecke se ve un poco menos degradado y parece tener menos contaminación de ARN, por lo que se decidió seguir trabajando con esta muestra.



**Figura 8.** Extracción de ADN de *Bacillus subtilis*. A) Marcador de peso molecular, B) Extracción por Kit Blood and Tissue, C) Extracción por método de Wecke.

### III. Diseño de oligonucleótidos

Basándonos en los resultados de la búsqueda de enzimas de restricción que cortaran en la secuencia diseñada, se escogió la enzima de restricción BamHI debido a que esta no corta en nuestra secuencia.

A continuación se muestran los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la enzima chalcona sintasa putativa del microorganismo *Bacillus subtilis*. Los nucleótidos subrayados pertenecen a los sitios de corte de la enzima de restricción BamHI.

*Forward:* 5' AAA GGATCC ATGGCGTTTATTTTATCCATTGGA 3'

*Reverse:* 5' AAA GGA TCC TCAGGCCCCCTTTTCCCAGCTGAA 3'

Como se mencionó en el apartado de metodología, se calcularon las temperaturas de fusión para los oligonucleótidos *forward* y *reverse* resultando estos de 59.4 °C y 66.9 °C, respectivamente.

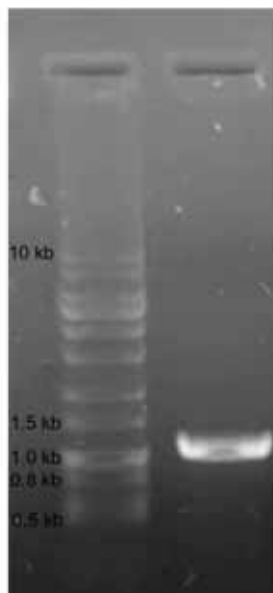
Los primers diseñados fueron obtenidos de Jena Bioscience.

#### IV. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se probaron distintos protocolos para la PCR cambiando la temperatura de hibridación. Para esto, en el programa que se introduce en el equipo, se indicó que hubiera un gradiente de temperaturas en las 12 filas que tiene el equipo, de esta manera la temperatura variaba solo en esta parte del ciclo de entre 62 a 66 °C. Como se observa en la Figura 9, los resultados indicaron que la temperatura óptima para que se lograra amplificar el gen fue de 64 °C.

De esta manera, el programa establecido requirió de los siguientes tiempos y temperaturas.

1. 1 ciclo de 94 °C durante 1 minuto
2. 30 ciclos a:
  - a. 94 °C durante 45 segundos
  - b. 64 °C durante 45 segundos
  - c. 72 °C durante 45 segundos
3. 1 ciclo de 72 °C durante 10 minutos



**Figura 9. Resultados de PCR. A) Marcador de peso molecular. B) Resultados de PCR con temperatura de hibridación de 64 °C.**

### V. *Análisis in silico*

Se llevó a cabo un análisis de la estructura primaria, secundaria y cuaternaria de la enzima chalcona sintasa putativa del microorganismo *Bacillus subtilis*.

Para el análisis de la estructura primaria se realizó un análisis de homología en la herramienta en línea MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) de la secuencia de la chalcona sintasa putativa de *B. Subtilis* contra la secuencia de la enzima chalcona sintasa de *Medicago sativa*, *Arabidopsis thaliana* y de *Marcanthia polymorpha*, así como de la enzima policétido sintasa 11 de *Mycobacterium tuberculosis*.

En la Figura 9 se muestra el resultado de dicha alineación. En ésta un asterisco indica las posiciones que tienen un único residuo totalmente conservado, los dos puntos indican la conservación entre grupos de propiedades muy similares y el punto indica la conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

Como se puede apreciar en la imagen, las secuencias presentan una semejanza relevante pero lo que es aun más interesante es que los sitios catalíticos se encuentran conservados (en la figura se encuentran resaltados en color amarillo), no sólo entre las enzimas chalcona sintasa de las plantas sino también en la policétido sintasa 11 de la bacteria *M. tuberculosis*, por lo que el hecho de que la probable chalcona sintasa de *Bacillus subtilis* presente los mismos residuos conservados puede suponer que la catálisis de esta enzima se llevaría de similar o igual manera y que esta misma tríada catalítica podría estar involucrada en dicha reacción

De igual manera estas enzimas tienen conservada una prolina (como se muestra con el color azul en la imagen) la cual se cree proporciona rigidez para promover la ciclación de



los productos. Esta prolina está altamente conservada en la familia de enzimas policétido sintasa de tipo III.

```

M.polymorpha      GSGMKETAATAAKFERQHMDSPDLGTDGDDDDKAMADIGSMANIVNAAAYKHRRRAAGPATVLAI
M.sativa          -----MV-----SVSEIRKA-----QRAEGPATILAI
A.thaliana        -----MVMAGASSLDEIRQA-----QRADGPAGILAI
B.subtilis        -----MAFILSI
M.tuberculosis    -----MSVIAGV
                  : : :

M.polymorpha      GKATPPTAYSQSEYPDFFFDITNTSHKTELKAKFARICKNSGINTRYFHCTEDILKANPS
M.sativa          GTANFANCVEQSTYPDFYFKITNSEHKTLEKFKQRMCDKSMIKRRYMYLTEEILKENPN
A.thaliana        GTANFENHVLQAEYPDYFRITNSEHMTDLKEKFKRMCDKSTIRKRMHLTEEFLENPN
B.subtilis        GTSLPAYNVNQEKAAE-FARYMFQHSFKDIDRLSSF-KNGQIHSRQFVKPIEYKE---
M.tuberculosis    FGALPPHRYSQSEITDSFVEF---PGLKEHEKIIRRLHAAAVNGRHLVLPQQYPS---
                  : *   *   . : :   . : . : :   . : . * : . :

M.polymorpha      MCTYLEPSLDVRQDIAIREVPRLAEKAAIEALA-----ENGQPRDQITHVVFATTSGVNM
M.sativa          VCEYMAPSLDARQDMVVVEVPRLGKEAAVKAIK-----ENGQPKSKITHLIVCTTSGVDM
A.thaliana        MCAYMAPSLDTRQDIVVVEVPKLGKEAAVKAIK-----ENGQPKSKITHVVFCTTSGVDM
B.subtilis        -----GHSFEEKNQIYIEETLKHSRAAVRECLSHPEFFQEAIPYEKVEAVFVSSSTGLST
M.tuberculosis    -----LTDFGDANEIFIEKAVDLGVEALLGALD-----DANLRPSDIDMIATATVTVGAV
                  . :   : : : : . . *   . :   :   . :   :   : : :

M.polymorpha      PGADLTLTRLLGLNPNVKTMLYQQCCFAGGATVLRVAKDLAENNKGARVLTVVSELTQVTV
M.sativa          PGADYQLTKLLGLRPYVKRYMYQQCCFAGGTVLRVAKDLAENNKGARVLVVCSEITAVT
A.thaliana        PGADYQLTKLLGLRPSVKRLAMYQQCCFAGGTVLRVAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVT
B.subtilis        PSIEARLMNELPFSPYTKRIPWGLGCAGGASGLARAAEYCKAYPEAFVLVISAELCSLT
M.tuberculosis    PSLDARIAGRLGLRPDVRMPFLFGLGCVAGAAGVARLRDYLRGAPDQVAVLVSELCST
                  * . :   : * : * ..* : : ** .* : :   :   . : : * : . :

M.polymorpha      FRAPNEEHLNVLVGSALFVGDG-ASVLVIGSDPIPEV-EKPFQF---EIHWSGETILPESDG
M.sativa          FRGPSDTHLDSLVGQALFVGDG-AAALVIGSDPVPEI-EKPIF---EMVWTAQTIAPDSEG
A.thaliana        FRGPSDTHLDSLVGQALFSDG-AAALVIGSDPDTSVGEKPIF---EMVSAAQITILPDSGD
B.subtilis        FQ-PEDKTKSNLIGTSLFGDIAAALLCCEKADRRV-SKLKL-APKIMDAQSVLMKQSED
M.Tuberculosis    YP-AVKPTVSSLVGTALFVGDGAAAVVAVG---DRRA-EQVRAGSPDILDSRSLYPSLH
                  : . .   ..** * : : ** * : : *   . :   . :   . :   : *

M.polymorpha      AIEGRLEAGLIFHLLKDVPLISRNTPIFNKAIEVAGSFSWNDLFWCVHPGGRAILDE
M.sativa          AIDGHLREAGLTFHLLKDVPLIVSKNITKALVEAFEPFGISDYNISFWIAHPGGPAILDQ
A.thaliana        AIDGHLREAGLTFHLLKDVPLISKNIVKSLDEAFKPLGSDWNSLFWIAHPGGPAILDQ
B.subtilis        VMGWDFTDQGFVIFSRDIPTLVEKWLKTNVQIFLDKHKLSFHDISVFLAHPGGKVIDA
M.tuberculosis    IMGWDVSHGLRLRLSPDLINLIERYLANDVITFLDAHRLTKDDIGAVVSHPPGPKVIDA
                  : . . * : : : * : : : . . . :   . :   . :   : * : : * :

M.polymorpha      VAKTLSLKPENLEATRIDILYNYGNMSGASVLFVLDQMRRRSAEKKSRITGEGCEWGLVVG
M.sativa          VEQKLALKPEKNATREVLSEYGNMSSACVLFILDEMRRKSTQNGLKTGEGLEWGLVFG
A.thaliana        VEIKLGLKEEKMRATRHVLESEYGNMSSACVLFILDEMRRKSAKDGVAATTGEGLEWGLVFG
B.subtilis        YIKSLGLSSEKLSAQSILOKHGNMSSATILYVI----KDHQNGHKKEAER---GLIGA
M.tuberculosis    VATSLALPPEALELWRSLSGEIGNLSSASILHIL----RDTIEK-RPPSGSA---GLMLA
                  . * . * :   : . * : * : * : * * : : . . . . * : :

M.polymorpha      FGGGLTVEVSVLRAIATGH
M.sativa          FGGGLTIETVVLRSVAI--
A.thaliana        FGGGLTVETVVLHVSVPL--
B.subtilis        LGGGFSSELLFSWEKGA-
M.tuberculosis    MGGGFCTELVLLRWR----
                  : * : *   : :

```

Figura 9. Resultado del análisis de alineación múltiple usando el programa online MUSCLE. Enzima chalcona sintasa de *M. Polymorpha*, enzima chalcona sintasa de *M. Sativa*, enzima chalcona sintasa de *A. thaliana*, enzima chalcona sintasa putativa de *B. subtilis*, enzima policétido sintasa 11 de *M. tuberculosis*. La tríada catalítica conservada se encuentra resaltada en color amarillo mientras que la prolina conservada se encuentra resaltada en color azul (Chojnacki, Cowley, Lee, Foix & Lopez, 2017).

El análisis de la estructura secundaria se llevo a cabo con la herramienta SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)), el resultado se muestra en la Figura 10. En esta el color azul indica alfa hélices, el color rojo indica laminas extendidas, el color rosa indica giros aleatorios, y el color verde giros beta.

La predicción de la estructura secundaria indica un porcentaje de 44.66% de alfa hélices, seguida de 33.15% de giros aleatorios, 15.62% de laminas extendidas y finalmente un 6.58% de giros beta.

En base a los resultados de la alineación anterior (Figura 9) se marcó la posible tríada catalítica en el número indicado de la estructura secundaria para poder visualizar a que estructura corresponde y también debido a que se esperaría que el plegamiento se llevara a cabo de tal manera que permitiera que estos residuos interactúen entre ellos para poder llevar a cabo la catálisis, si esta fuera en efecto la función de dicha tríada de aminoácidos.

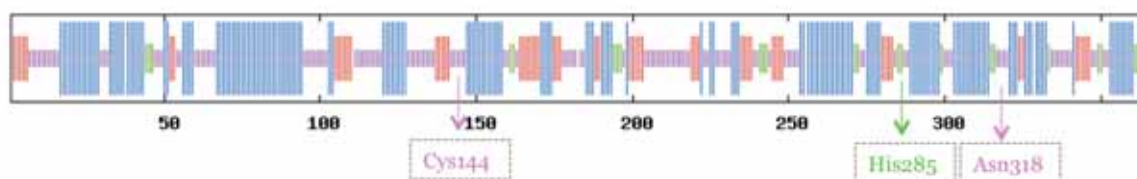


Figura 10. Resultado del análisis de la estructura secundaria de la probable enzima chalcona sintasa de *B. subtilis* usando la herramienta en línea SOPMA. La probable tríada catalítica se encuentra señalada de acuerdo a la estructura correspondiente: color rosa indica giros aleatorios y el color verde indicica giros beta (Geourjon & Deléage, 1995).

De igual manera se llevó a cabo el análisis de la estructura secundaria de la policétido sintasa 11 de *Mycobacterium tuberculosis* con el fin de comparar estas dos estructuras, ya que debido a que esta es una enzima bacteriana puede estar más

estrechamente relacionada con la enzima chalcona sintasa putativa de *B. subtilis*. En la Figura 11 se muestran los resultados, en este también se decidió señalar la tríada catalítica.

Ambas estructuras resultaron ser bastante similares y las tríadas catalíticas indican la misma estructura. La Cys144 y Asn318 de *B. subtilis* corresponden a giros aleatorios lo cual concuerda con la Cys138 y Asn310 de *M. tuberculosis*. De igual manera, la His285 de *B. subtilis* y la His277 de *M. tuberculosis* corresponden a giros beta.

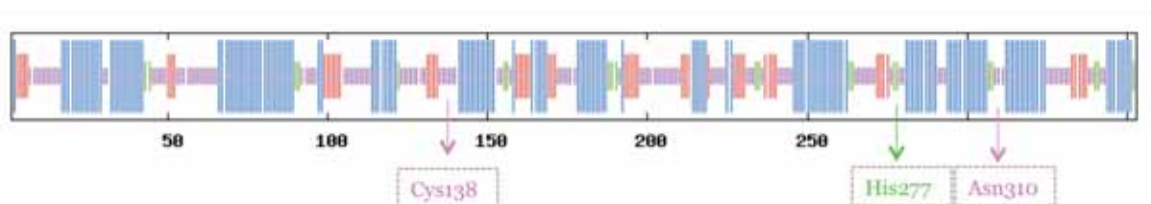


Figura 11. Resultado del análisis de la estructura secundaria de la enzima policétido sintasa 11 de *M. tuberculosis* usando la herramienta en línea SOPMA. La tríada catalítica se encuentra señalada de acuerdo a la estructura correspondiente: color rosa indica giros aleatorios y el color verde indica giros beta (Geourjon & Deléage, 1995).

Finalmente, la secuencia de aminoácidos fue analizada con la herramienta en línea Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>). El modelo 3D resultante fue un homodímero como se puede ver en la Figura 12.

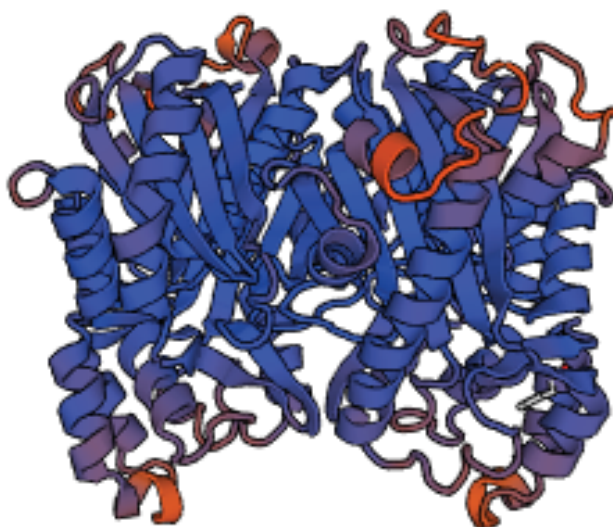
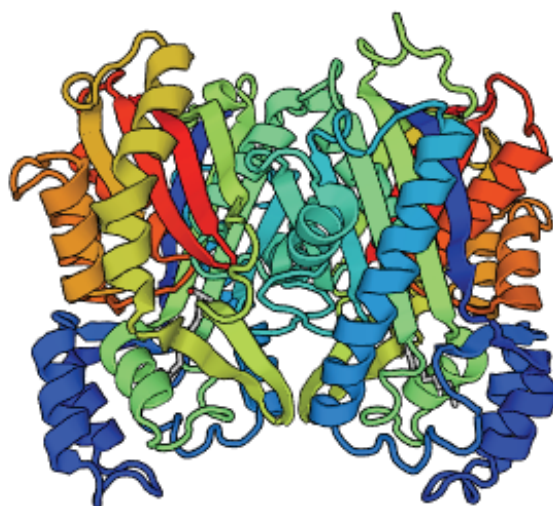


Figura 12. Posible estructura de la enzima chalcona sintasa putativa de *Bacillus subtilis* (Waterhouse et al., 2018).

La herramienta en línea usó como plantilla la enzima policétido sintasa 11 (Figura 13) la cual también es un dímero. Esta enzima es una de las tres policétido sintasa de tipo III identificadas en *Mycobacterium tuberculosis*, aunque su actividad biológica es desconocida se cree que, al igual que muchas PKS en *M. Tuberculosis*, esta pueda estar implicada en la producción de complejos glicolípidicos de la pared celular.



**Figura 13. Estructura de la enzima policétido sintasa 11 de *Mycobacterium tuberculosis* (Waterhouse et al., 2018).**

Es importante recordar que las PKS producen una amplia gama de metabolitos secundarios, desde flavonoides y fitoalexinas en plantas, hasta lípidos complejos de la pared celular en procariotas y aunque varios de los productos de las PKS en *M. tuberculosis* que se han identificado son cétidos lineales, los productos finales de PKS a menudo se ciclan en otros organismos (por ejemplo, chalconas, estilbeno y resveratrol) (Gokulan et al., 2013).

El estudio estructural de la policétido sintasa 11 de *M. Tuberculosis* ha podido comprobar que cada subunidad de PKS11 exhibe un pliegue de  $\alpha\beta\alpha\beta$  tiolasa, el cual es un pliegue altamente conservado entre las PKS de tipo III determinadas estructuralmente. En

la celda unitaria, las cuatro subunidades están organizadas como dos pares de subunidades relacionadas por una simetría doble, con cada par estrechamente agrupados

Por otro lado, el sitio activo contiene una tríada catalítica que consiste en Cys138, His277 y Asn310, las cuales son requeridas para la catálisis en otras PKS. Por analogía con otras, His277 sirve como base general para desprotonar a Cys138, facilitando la transesterificación de sustratos de acilo entre los tioésteres de CoA y el tiolato de cisteína. Mientras que Asn310 contribuye con un enlace de hidrógeno estabilizador al oxígeno tioéster. Además, el residuo 341 es una prolina, que se conserva en todas las demás PKS de tipo III (incluidas la CHS y la estilbena sintasa). Este residuo se encuentra en un giro de horquilla  $\beta$ , y la rigidez proporcionada por la prolina se ha postulado para promover la ciclación de los productos (Gokulan et al., 2013).

Con la información recabada de la enzima policétido sintasa 11 de *M. Tuberculosis* que fue usada como plantilla para la posible estructura de la enzima chalcona sintasa de *B. subtilis*, se decidió hacer una comparación entre las dos estructuras, en especial de los sitios catalíticos ya que es probable que la enzima chalcona sintasa llevara a cabo su catálisis de una manera semejante a esta otra enzima.

Para esto se usó el programa swiss-PdbViewer (<https://spdbv.vital-it.ch>), en el cual se descargaron ambas estructuras para poder sobreponerlas y buscar en la enzima chalcona sintasa putativa semejanzas con la PKS11. De esta manera se vio que la tríada de aminoácidos Cys144, His285 y Asn318 se asemeja en posición a la tríada catalítica de PKS11, tal y como se muestra en la Figura 14.

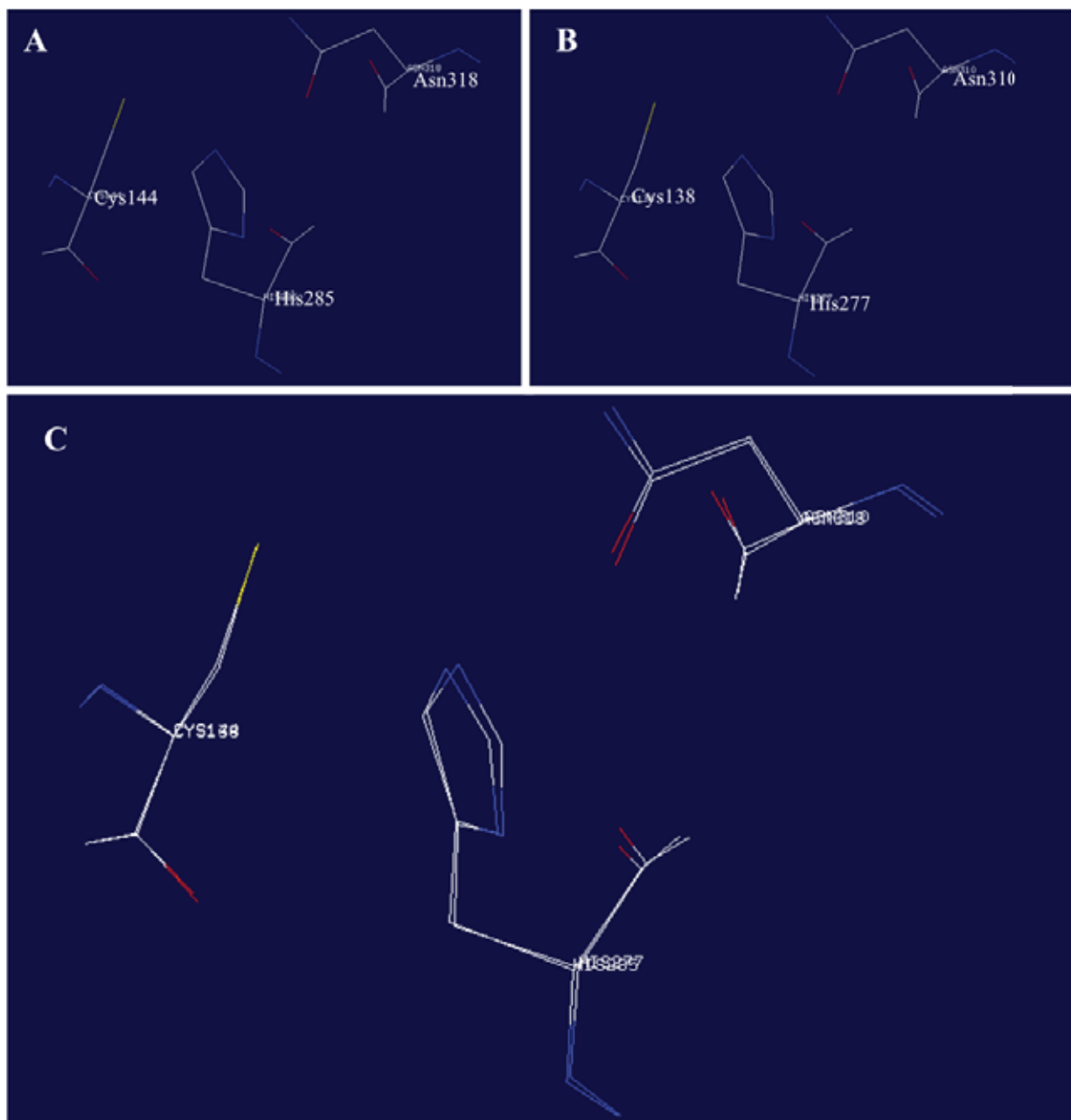


Figura 14. A) Probable tríada catalítica de la enzima chalcona sintasa de *B. subtilis*, B) Tríada catalítica de PKS11 de *M. tuberculosis*, C) Imagen de A) y B) sobrepuestas (Guex & Peitsch, 1997).

De igual manera, se observó que la prolina 350 en la enzima chalcona sintasa putativa tiene una ubicación, en relación a la tríada catalítica probable, muy parecida a la ubicación que tiene la prolina 341 con la tríada catalítica en la policétido sintasa 11 de *M.*

*tuberculosis* (Figura 15) por lo que es probable que este residuo tenga la misma función que se explicó previamente.

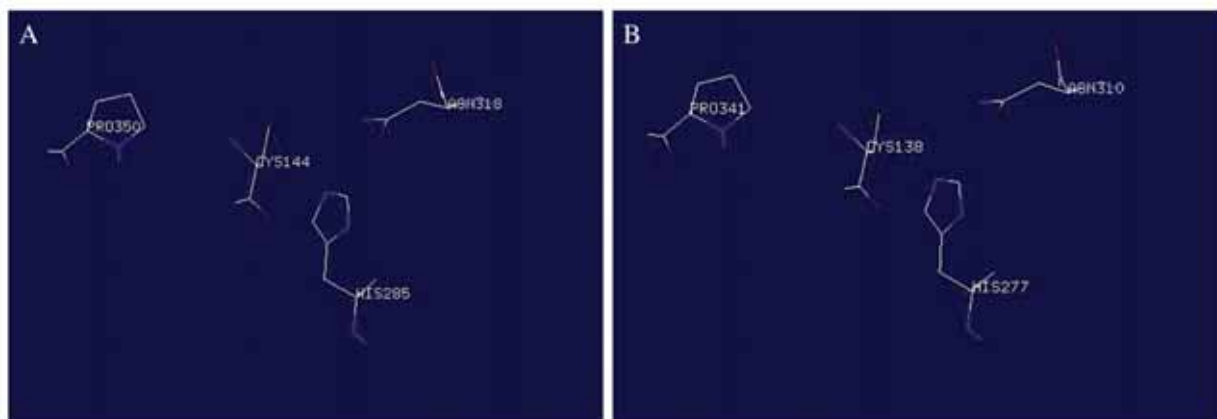


Figura 15. A) Conformación de la enzima chalcona sintasa putativa de *B. subtilis*, B) Conformación de enzima policíclico sintasa 11 de *M. tuberculosis* (Guex & Peitsch, 1997).

## VII. Conclusiones y Recomendaciones

En este trabajo se logró amplificar el gen que codifica la enzima putativa chalcona sintasa proveniente de *Bacillus subtilis*.

El análisis *in silico* de la posible proteína codificada por el gen amplificado arrojó información relevante, ya que la homología que presenta con la sintasa de policétidos 11 nos podría dar una idea de la manera en que esta probable enzima pudiera llevar a cabo su catálisis así como algunas características de la enzima. Es por esto que es muy interesante ver la gran semejanza que tuvieron estas dos enzimas, ya que la probable tríada catalítica de la enzima chalcona sintasa putativa es muy parecida al sitio catalítico reportado para la PKS11 de *M. Tuberculosis*, y dada su semejanza estructural, también es muy probable que estos sitios activos tengan la misma función en la chalcona sintasa putativa que se está estudiando.

Cabe resaltar la importancia de tener una prolina cerca de este sitio activo, característica conservada en la mayoría de las PKS de tipo III (es necesario recordar que la chalcona sintasa es parte de este grupo), nos aporta aun más evidencia de que esta enzima podría funcionar de la misma manera que el resto de esta familia.

No obstante, es importante mencionar es necesario llevar a cabo la clonación y su subsecuente caracterización bioquímica para determinar si las especulaciones aquí realizadas son o no verdaderas.

De igual manera, antes de cualquier introducción de esta enzima en la industria deben analizarse las ventajas y desventajas de utilizar sistemas que use microorganismos así como las condiciones óptimas para su uso en caso de ser este favorable.



## VIII. Bibliografía

- Ahmad, A., Husain, A., Khan, S., Mujeeb, M., & Bhandari, A. (2016). Synthesis, antimicrobial and antitubercular activities of some novel pyrazoline derivatives. *Journal Of Saudi Chemical Society*, 20(5), 577-584. doi: 10.1016/j.jscs.2014.12.004
- Aoki, N., Muko, M., Ohta, E., & Ohta, S. (2008). C-Geranylated Chalcones from the Stems of *Angelica keiskei* with Superoxide-Scavenging Activity. *Journal Of Natural Products*, 71(7), 1308-1310. doi: 10.1021/np800187f
- Austin, M., & Noel, J. (2003). The Chalcone Synthase Superfamily of Type III Polyketide Synthases. *Cheminform*, 34(17). doi: 10.1002/chin.200317284
- Birari, R., Gupta, S., Mohan, C., & Bhutani, K. (2011). Antiobesity and lipid lowering effects of Glycyrrhiza chalcones: Experimental and computational studies. *Phytomedicine*, 18(8-9), 795-801. doi: 10.1016/j.phymed.2011.01.002
- Bowles, D. (1990). Defense-Related Proteins In Higher Plants. *Annual Review Of Biochemistry*, 59(1), 873-907. doi: 10.1146/annurev.biochem.59.1.873
- Canela, M. D., Noppen, S., Bueno, O., Protá, A. E., Bargsten, K., Sáez-Calvo, G., Jimeno, M. L., Benkheil, M., Ribatti, D., Velázquez, S., Camarasa, M. J., Díaz, J. F.,

- Steinmetz, M. O., Priego, E. M., Pérez-Pérez, M. J., ... Liekens, S. (2016). Antivascular and antitumor properties of the tubulin-binding chalcone TUB091. *Oncotarget*, 8(9), 14325-14342.
- Chavan, B., Gadekar, A., Mehta, P., Vawhal, P., Kolsure, A., & Chabukswar, A. (2016). Synthesis and Medicinal Significance of Chalcones- A Review. *Asian Journal Of Biomedical And Pharmaceutical Sciences*, 6(56).
- Chen, M., Christensen, S., Blom, J., Lemmich, E., Nadelmann, L., & Fich, K. et al. (1993). Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 37(12), 2550-2556. doi: 10.1128/aac.37.12.2550
- Chojnacki, S., Cowley, A., Lee, J., Foix, A., & Lopez, R. (2017). Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W550-W553. doi: 10.1093/nar/gkx273
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*(Undergraduate). Pontificia Universidad Javeriana.

Dao, T. T., Linthorst, H. J., & Verpoorte, R. (2011). Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 10(3), 397-412.

Earl, A., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends In Microbiology*, 16(6), 269-275. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.004

Evranos Aksöz, B., & Ertan, R. (2011). Chemical and structural properties of chalcone I. *FABAD J. Pharm. Sci*, 36(223-242).

Geourjon, C., & Deléage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics*, 11(6), 681-684. doi: 10.1093/bioinformatics/11.6.681

Gokulan, K., O'Leary, S., Russell, W., Russell, D., Lalgondar, M., & Begley, T. et al. (2013). Crystal Structure of Mycobacterium tuberculosis Polyketide Synthase 11 (PKS11) Reveals Intermediates in the Synthesis of Methyl-branched Alkylpyrones. *Journal Of Biological Chemistry*, 288(23), 16484-16494. doi: 10.1074/jbc.m113.468892

Gomes, M., Muratov, E., Pereira, M., Peixoto, J., Rosseto, L., & Cravo, P. et al. (2017). Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. *Molecules*, 22(8), 1210. doi: 10.3390/molecules22081210

- Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723
- Israf, D., Khaizurin, T., Syahida, A., Lajis, N., & Khozirah, S. (2007). Cardamonin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF- $\kappa$ B nuclear translocation and I $\kappa$ B phosphorylation in RAW 264.7 macrophage cells. *Molecular Immunology*, 44(5), 673-679. doi: 10.1016/j.molimm.2006.04.025
- Kim, D., Curtis-Long, M., Yuk, H., Wang, Y., Song, Y., Jeong, S., & Park, K. (2014). Quantitative analysis of phenolic metabolites from different parts of *Angelica keiskei* by HPLC–ESI MS/MS and their xanthine oxidase inhibition. *Food Chemistry*, 153, 20-27. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.026
- Kumar, S., Bawa, S., Drabu, S., Kumar, R., & Gupta, H. (2009). Biological Activities of Pyrazoline Derivatives -A Recent Development. *Recent Patents On Anti-Infective Drug Discovery*, 4(3), 154-163. doi: 10.2174/157489109789318569
- Mahapatra, D., Bharti, S., & Asati, V. (2015). Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 101, 496-524. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.06.052

- Moore, B., Hertweck, C., Hopke, J., Izumikawa, M., Kalaitzis, J., & Nilsen, G. et al. (2002). Plant-like Biosynthetic Pathways in Bacteria: From Benzoic Acid to Chalcone. *Journal Of Natural Products*, 65(12), 1956-1962. doi: 10.1021/np020230m
- Mukherjee, P., Cinelli, M. A., Kang, S., & Silverman, R. B. (2014). Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. *Chemical Society reviews*, 43(19), 6814-38.
- Noel, J., Ferrer, J., Jez, J., Bowman, M., & Dixon, R. (1999). Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide pathway. *Nature Structural Biology*, 6(8), 775-784. doi: 10.1038/11553
- Ramírez, M., Barajas, L., Pérez, C., Sáenz, A., & Silva, S. (2012). Síntesis y actividad biológica de las chalconas. *Revista Mexicana De Ciencias Farmacéuticas*, 43(4). Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/579/57928311002/>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W296-W303

- Yamamoto, T., Yoshimura, M., Yamaguchi, F., Kouchi, T., Tsuji, R., & Saito, M. et al. (2004). Anti-allergic Activity of Naringenin Chalcone from a Tomato Skin Extract. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, 68(8), 1706-1711. doi: 10.1271/bbb.68.1706
- Yerragunta, V., Kumaraswamy, T., Suman, D., Anusha, V., Patil, P., & Samitha, T. (2013). A review on chalcones and its importance. *Pharmatutor*, 1(2).
- Yusuf, M., & Jain, P. (2014). Synthetic and biological studies of pyrazolines and related heterocyclic compounds. *Arabian Journal Of Chemistry*, 7(5), 553-596. doi:10.1016/j.arabjc.2011.09.013