

Revista Bioc Scientia Vol.1 Núm.2, JULIO 2025



La Revista Bioc Scientia se dedica a la publicación de investigaciones originales, revisiones, notas cortas y artículos de opinión en las áreas de agricultura, biomedicina, acuicultura, biotecnología, ciencias ambientales y salud humana. Su objetivo es difundir avances científicos y tecnológicos que contribuyan al desarrollo sostenible y al bienestar humano.

Revista Bioc Scientia. Boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional S/N Col. Las Malvinas, Los Mochis, Sinaloa, C.P. 81216. correo electrónico biocscientia@uadeo.mx . Teléfono: 668 8 16 10 50, extensión 6490.

Áreas Temáticas:

Ciencia de plantas. El área temática de Ciencias de las Plantas aborda estudios en el entendimiento de la biología de plantas. La revista recibe investigaciones originales, revisiones y notas cortas en secciones específicas: horticultura, agronomía, cultivo de células vegetales, genética y genómica funcional, biología molecular y celular, fisiología y metabolismo, sistemática y evolución, interacciones simbióticas, interacciones patogénicas, interacciones planta-insecto, fitoquímica, bioinformática de plantas, ciencias ómicas, ecología, biotecnología, nutrición vegetal y tecnologías avanzadas de ciencias de las plantas.

Tópicos

- Biodiversidad y conservación
- Fitopatología
- Mejoramiento genético
- Manejo agrícola y nutrición
- Interacción planta-microorganismo
- Biotecnología vegetal
- Biotecnología agrícola
- Control biológico
- Etnobotánica

Ciencias Acuícolas y Pesqueras. El área temática de Acuicultura y Pesquerías aborda estudios multidisciplinarios en el entendimiento de los recursos acuícolas y pesqueros. La revista recibe investigaciones originales, revisiones, notas cortas en secciones específicas: reproducción y desarrollo, genética y genómica funcional, biología molecular y celular, fisiología y metabolismo, patología, bioinformática, Ciencias Ómicas, ecología, biotecnología, nutrición, sistemas de producción y manejo, conservación y sustentabilidad marina, biotecnología marina y bio-productos, inmunología, contaminación acuícola, ecología de población y comunidades marinas.

Tópicos

- Eco-fisiología
- Sistemas de producción
- Patología y manejo de enfermedades

- Biología y manejo de recursos pesqueros
- Nutrición

Ciencias Ambientales. El área temática de Ciencias Ambientales aborda publicaciones de investigación sobre los cambios que ocurren en nuestro ambiente natural debido a las actividades antropogénicas. La revista recibe investigaciones originales, revisiones y notas cortas en secciones específicas: Toxicología y salud ambiental, contaminación y manejo de residuos, conservación ambiental, riesgo ambiental, vida silvestre, restauración ecológica, procesamiento de suelos, biorremediación, biomarcadores y bio-monitores, química ambiental, análisis ambientales, nanomateriales, microbiología ambiental.

Tópicos

- Biodiversidad y servicios ecosistémicos
- Protección y prevención de la contaminación
- Impacto ambiental y análisis de riesgos
- Biorremediación
- Manejo de recursos.

Ciencias Biomédicas. Estudios en áreas que son fundamentales para entender mejor la biología humana, desarrollar tratamientos más efectivos y mejorar la prevención y manejo de enfermedades a nivel individual y poblacional como son la biología molecular y la genómica, salud pública y el desarrollo de pruebas de diagnóstico y terapias innovadoras, entre otras.

Tópicos:

- Biotecnología biomédica
- Epidemiología y Salud Pública
- Microbiología
- Farmacología
- Nutrición
- Actividad Física y Salud

Estas áreas temáticas permiten abarcar una amplia gama de investigaciones que contribuyan significativamente al avance del conocimiento en las áreas de Ciencias de las plantas, Ciencias Acuícolas y Pesqueras, Ciencias Ambientales y Ciencias Biomédicas.

Revista Bioc Scientia. Boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional S/N Col. Las Malvinas, Los Mochis, Sinaloa, C.P. 81216. correo electrónico biocscientia@uadeo.mx . Teléfono: 668 8 16 10 50, extensión 6490.

Cintillo Legal: BIOC SCIENTIA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE, Vol. 1, ENERO-JULIO 2025, es una publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Occidente, Blvd. Macario Gaxiola y Carretera Internacional S/N, Col. Malvinas, C.P. 81216, Los Mochis, Sinaloa. Tel. 668 816-10-50. <https://editoriallince.uadeo.mx/index.php/BiocScientia/index>. Editor responsable: Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo: 04-2025-090510190200-102. e-ISSN en trámite. Ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Fecha de la última modificación: 25/Enero/2025. Responsable de la última modificación: Guadalupe Arlene Mora Romero. BIOC SCIENTIA se encuentra bajo la licencia internacional Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0. (CC BY-NC 4.0).

EQUIPO EDITORIAL

Revista Bioc Scientia
Universidad Autónoma de Occidente

COMITÉ EDITORIAL PRINCIPAL

Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero

Editora en Jefe

editor.biocscientia@uadeo.mx

Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal

Co-Editora

co-editor.biocscientia@uadeo.mx

Dra. Gisela Cota Yucupicio

Editora Consultora

editor.consultor.biocscientia@uadeo.mx

Dra. Norma Ávila Alistac

Editora Técnica

editor.tecnico.biocscientia@uadeo.mx

Dr. Luis Gerardo Sarmiento López

Editor Técnico

editor.tecnico2.biocscientia@uadeo.mx

Dr. Rubén Félix Gastélum

Editor Adjunto – Ciencias de Plantas

editor.plantas.biocscientia@uadeo.mx

Dra. María Aurora Armienta Hernández

Editora Adjunta – Ciencias Ambientales

editor.ambientales.biocscientia@uadeo.mx

Dra. Sylvia Paz Díaz Camacho

Editora Adjunta – Ciencias Biomédicas

editor.biomedicas.biocscientia@uadeo.mx

EDITORES ASOCIADOS – CIENCIAS DE PLANTAS

Revista Bioc Scientia. Boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional S/N Col. Las Malvinas, Los Mochis, Sinaloa, C.P. 81216. correo electrónico biocscientia@uadeo.mx . Teléfono: 668 8 16 10 50, extensión 6490.

Dr. César del Ángel Hernández Galeno – INIFAP
Dr. Luis G. Sarmiento López – Universidad Autónoma de Occidente (UAdeO)
Dra. Melina López Meyer – CIIDIR-IPN
Dr. Sergio de los Santos – Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON)
Dr. Domingo Martínez Soto – CICESE
Dr. Mario Rodríguez Monroy – CeProBi-IPN
Dr. Julián Mario Peña Castro – Universidad del Papaloapan (UNPA)
Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza – CIIDIR-IPN
Dr. Juan C. Martínez Álvarez – CIIDIR-IPN
Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza – CIAD, Unidad Culiacán

EDITORES ASOCIADOS – CIENCIAS AMBIENTALES

Dr. Luis Brito Castillo – CIBNOR
Dr. Manuel Chinchillas Chinchillas – Universidad Autónoma de Occidente (UAdeO)
Dr. Fabián Fernández Luqueño – CINVESTAV-IPN

EDITORES ASOCIADOS – CIENCIAS BIOMÉDICAS

Dr. Juan Pedro Laclette San Román – Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
Dra. Gabriela López Angulo – Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS)
Dr. Abraham Landa Piedra – Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
Dr. Francisco Delgado Vargas – Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS)
Dr. José Ángel López Valenzuela – Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS)
Dra. María Elena Báez Flores – Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS)
Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado – Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS)
Dra. Rosa Victoria Pando Robles – Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI)
Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl – CISEI
Dr. Carlos Eslava Campos – Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
Dra. María Teresa Estrada García – CINVESTAV-IPN
Dr. Rodolfo Bernal Reynaga – Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS)
Dr. Lorenzo Ulises Osuna Martínez – Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS)
Dr. Javier Abednego Magaña Gómez – Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS)
Dr. Luis Felipe Reynoso Sánchez – Universidad Autónoma de Occidente (UAdeO)

Revista Bioc Scientia. Boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional S/N Col. Las Malvinas, Los Mochis, Sinaloa, C.P. 81216. correo electrónico biocscientia@uadeo.mx . Teléfono: 668 8 16 10 50, extensión 6490.

CONTENIDO

Vol. 1 Núm. 2 (julio-diciembre 2025)

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

1. Impacto del extracto acuoso de *Bromelia pinguin* en los mecanismos de muerte celular en la línea MDA-MB-231 derivada de cáncer de mama

Nereida Montes Castro, Elizabeth Méndez Nevárez, Marilyn Shomara Criollo Mendoza, Carmen Martínez Valenzuela, Sylvia Paz Díaz Camacho, Israel García Aguiar

2. Efecto del extracto etanólico de *Capsicum chinense* sobre citoquinas inflamatorias y esteatosis hepática en ratas Wistar obesas por dieta hipercalórica

Elisa Anali Camacho-Ureta, Guadalupe Bravo, Selene de Jesús Acosta-Cota, Silvestre Guadalupe Cázarez-Salazar, Patrick Mailloux-Salinas, Juventino III Colado-Velázquez

3. Conocimiento sobre la zoonosis por *Anisakis* en consumidores de pescado y mariscos en Sinaloa, México

Dania López-Moreno, Francisco Neptalí Morales-Serna

4. Vigilancia genómica *in silico* de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana en cepas clínicas de *Salmonella enterica* aisladas en México

Jesús Ignacio García-Aguirre, Martín Soto-Gamboa, Lennin Isaac Garrido-Palazuelos, Omar Guerra-Meza, María Belia Contreras-Soto, José Roberto Aguirre-Sánchez

5. Molecular docking, dynamic simulations, and network pharmacology approach to explore the therapeutic potential of *Zanthoxylum armatum* phytochemicals against Malaria

Hamna Khan, Ayesha Bibi, Mamuna Mukhtar, Nouman Ahmad, Haris Ahmed Khan

6. Producción de enzimas proteolíticas a partir de microorganismos halófilos aislados de suelos salinos del sur de Sonora

Azalea Fernanda Aguirre-Félix, Raúl Balam Martínez-Pérez, Alma Guadalupe Villa-Lerma, Roberto Rodríguez-Ramírez, Rigoberto Plascencia-Jatomea, Alejandro Miguel Figueroa-López

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

7. El Cempoalxóchitl: historia, presente y perspectivas

José L. Sánchez-Millán, Elsa Gutiérrez-Cortes, Alejandro Heredia-Barbero, Ana I. Chávez-Martínez, Janet Palacios-Martínez, Luis Cárdenas

8. Aprovechamiento agroindustrial de la candelilla (*Euphorbia antisiphilitica*)

María Lizbeth Guerrero-Manzanares, Francisco Marcelo Lara-Viveros, Ana Margarita Rodríguez-Hernández, Quetzalli Maricela García-Amaro, Yolanda Ortega-Ortega, Arxel de León-Santillán, Antonio Serguei Ledezma-Pérez, Erik Diaz-Cervantes, Marco Antonio Castillo-Campohermoso

Impacto del extracto acuoso de *Bromelia pinguin* en los mecanismos de muerte celular en la línea MDA-MB-231 derivada de cáncer de mama

Montes-Castro Nereida⁴✉, Méndez-Nevárez Elizabeth¹, Criollo-Mendoza Marilyn Shomara²✉, Martínez-Valenzuela Carmen³✉, Díaz-Camacho Sylvia Paz⁴✉, García-Aguilar Israel⁴✉

¹Programa Educativo de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias de la Salud, Unidad Regional Culiacán, Universidad Autónoma de Occidente, Boulevard Lola Beltrán S/N, 4 de marzo, C.P. 80054 Culiacán, Sinaloa, México.

²Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Culiacán.

³Laboratorio de Genotoxicología "Dr. Jesús Kumate Rodríguez", Unidad de Investigación en Ambiente y Salud, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis.

⁴Unidad de Investigaciones en Biotecnología Biomédica, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Culiacán, Boulevard Lola Beltrán S/N, 4 de marzo, C.P. 80054

✉ **Correspondencia:** israel.garcia@uadeo.mx

Área Temática:
Ciencias Biomédicas

Recibido: 01 de diciembre, 2024

Aceptado: 26 de mayo, 2025

Publicado: 25 de junio, 2025

Cita: Montes-Castro N, Méndez-Nevárez E, Criollo-Mendoza MS, Martínez-Valenzuela C, Díaz-Camacho SP y García-Aguilar I. 2025. Impacto del extracto acuoso de *Bromelia pinguin* en los mecanismos de muerte celular en la línea MDA-MB-231 derivada de cáncer de mama. *Bioc Scientia* 1(2). <https://doi.org/10.63622/RBS.2405>.



Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Resumen: El cáncer de mama constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial. En 2022, se registraron aproximadamente 2.3 millones de nuevos casos, siendo el tipo de cáncer más común entre las mujeres. En México, representa la principal causa de muerte por cáncer en la población femenina. Diversos fitoquímicos han demostrado inducir la muerte celular e inhibir el crecimiento tumoral. *Bromelia pinguin*, una planta tropical de la familia Bromeliaceae, ha sido empleada tradicionalmente como antiinflamatoria, antitusiva y antimicrobiana. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del extracto acuoso de *B. pinguin* sobre la viabilidad celular y la apoptosis en la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama. Se realizaron ensayos de viabilidad y análisis por Western blot de marcadores de apoptosis. Los resultados indican que, a la concentración evaluada, el extracto no induce apoptosis, lo cual se evidenció por el procesamiento parcial de pro-caspasa-3 y la ausencia de escisión de PARP1. Este estudio representa un primer acercamiento al potencial antitumoral de *Bromelia pinguin* y destaca la necesidad de investigaciones adicionales que profundicen en su actividad biológica y aplicaciones terapéuticas.

Palabras clave: cáncer, cáncer de mama, fitoquímicos, *Bromelia pinguin*.

Abstract: Breast cancer is a major global public health issue. In 2022, approximately 2.3 million new cases were reported, making it the most common cancer among women. In Mexico, it is the leading cause of cancer-related death in women. Several phytochemicals have shown potential to induce cell death and inhibit tumor growth. *B. pinguin*, a tropical plant from the Bromeliaceae family, has been traditionally used as an anti-inflammatory, antitussive, and antimicrobial agent. This study aimed to evaluate the effect of aqueous *B. pinguin* extract on cell viability and apoptosis in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. Viability assays and Western blot analysis of key apoptotic proteins were performed. Results indicate that at the tested concentration, the extract does not induce apoptosis, as evidenced by partial processing of pro-caspase-3 and the absence of PARP1 cleavage. This study represents a preliminary exploration of the antitumor potential of *Bromelia pinguin* and highlights the need for further research.

Keywords: Cancer, Breast cancer, Phytochemicals, *Bromelia pinguin*.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tipo cáncer de mayor incidencia en el mundo, con más de 2 millones de casos nuevos y cerca de 700 mil defunciones; lo que lo posiciona como la cuarta causa más frecuente de muerte por cáncer (International Agency for Research on Cancer, 2022). En México, durante 2023, se registraron más de 8,000 muertes a causa del cáncer de mama, cifra que aumenta cada año. Para las mujeres, a partir de los 30 años, la tasa más alta de mortalidad se debió al cáncer de mama, que fue también la principal causa de muerte por cáncer en mujeres de 60 años y más. A nivel nacional, por cada 100,000 mujeres de 20 años o más, la tasa de mortalidad por cáncer de mama fue de 17.9. Sinaloa presenta una tasa de 20.5, ubicándose entre las entidades con las tasas más altas y por encima del promedio nacional (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2022). La incidencia creciente y la alta tasa de mortalidad se deben, en parte, a la detección tardía y a la resistencia a terapias convencionales, especialmente en subtipos agresivos como el cáncer de mama triple negativo (CMTN), caracterizado por la ausencia de receptores hormonales (estrógeno y progesterona) y HER2 (Bianchini et al., 2016).

Las terapias oncológicas actuales suelen estar asociadas, en mayor o menor medida, con la aparición de efectos tóxicos o secundarios. Ante la necesidad de alternativas terapéuticas eficaces, la investigación científica ha centrado su atención en compuestos bioactivos derivados de plantas, debido a su diversidad estructural y potencial citotóxico selectivo contra células tumorales. Entre estos compuestos destacan los polifenoles, flavonoides, taninos y otros metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y proapoptóticas (Cragg et al., 2014; Newman y Cragg, 2020).

B. pinguin, conocida en Centroamérica como “muta”, “maya”, “piñuela” y “piña de ratón”; como guámara en Nayarit y como aguama en el estado de Sinaloa, México, presenta frutos con un alto contenido de vitamina C y minerales (Ca, Mg, Mn y Zn), a los cuales se le han atribuido actividades antibacterianas, antihelmínticas y antitusivas; adicionalmente, se ha evidenciado la presencia de antioxidantes, tales como compuestos fenólicos (taninos y flavonoides), terpenos, saponinas y ácidos grasos (Abreu-Payrol et al., 2005; Pío-León et al., 2009). Estas propiedades fitoquímicas y funcionales han contribuido a que los frutos de aguama sean considerados un recurso prometedor en investigaciones recientes orientadas al desarrollo y aprovechamiento de compuestos bioactivos de origen vegetal (Looby y Eaton, 2014; Masías-Ambriz et al., 2024; Meza-Espinoza et al., 2018; Moreno-Hernández et al., 2017; Tejada-Portero et al., 2023). Sin embargo, son escasos los trabajos que evalúan su efecto sobre líneas celulares de cáncer de mama, en particular sobre CMTN.

Dado el creciente interés en agentes naturales como posibles coadyuvantes terapéuticos, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto acuoso de *B. pinguin* sobre la viabilidad y expresión de marcadores

proapoptóticos en la línea celular MDA-MB-231, derivada de un subtipo agresivo de cáncer de mama triple negativo. Este trabajo busca contribuir al conocimiento sobre los mecanismos de acción de extractos vegetales con potencial uso oncológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los frutos maduros de *B. pinguin* fueron recolectados en el municipio de El Fuerte, Sinaloa. Posteriormente, se lavaron cuidadosamente, se desinfestaron y se les retiró la cáscara. La pulpa obtenida fue liofilizada para obtener harina, la cual se almacenó adecuadamente hasta su uso. A partir de esta harina liofilizada, se preparó el extracto acuoso siguiendo el protocolo descrito por Pio-León et al. (2009).

Cultivo celular

La línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) fue adquirida de American Type Culture Collection (ATCC, EE. UU.). El mantenimiento y subcultivo se realizaron conforme a las recomendaciones del proveedor. Las células se cultivaron en placas de 60 mm o 100 mm × 15 mm, y/o en frascos de cultivo de 75 cm², a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, utilizando medio DMEM (#11966025) suplementado con 10% de suero fetal bovino (#16000-044) y 50 µg mL⁻¹ de estreptomicina – 50 U mL de penicilina (#15140122). Todos los reactivos fueron adquiridos de Gibco™ (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar el efecto sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 del extracto acuoso de *B. pinguin* se siguió el protocolo reportado por Crowley et al. (2016). Brevemente, se sembraron 4x10⁶ células en botellas de cultivo de 75 cm² y fueron tratadas con 135 µg mL⁻¹ del extracto por 24, 48 y 72 horas. Una vez que se cumplieron los tiempos de tratamiento las células fueron recuperadas con Tripsina-EDTA (#25300062, Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y lavadas dos veces con PBS 1X centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el botón celular se resuspendió en PBS 1X, se tomó una alícuota de la suspensión de células y se mezcló 1:1 con azul tripano (#15250061, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.); se depositaron en la cámara de Neubauer y se visualizaron en un microscopio invertido Leica DM IL LED para realizar el conteo y determinar el porcentaje de viabilidad celular. Se utilizó como control de muerte a las células tratadas con 250 µM de Cisplatino, donado por el Dr. José Basilio Heredia del Laboratorio de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Culiacán. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar

(DE) de tres experimentos independientes. Las diferencias entre el control y los tratamientos con el extracto acuoso de *B. pinguin* se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideraron diferencias significativas aquellas con un valor de $P < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5.

Ensayos de Western blot

El análisis de proteínas mediante Western blot se realizó como se describe en el estudio de Martínez-Castillo et al. (2016), con ligeras modificaciones en las condiciones de incubación de anticuerpos. Los extractos de proteínas totales fueron preparados utilizando $5\text{--}10 \times 10^6$ células. Las células fueron lavadas con PBS 1X y lisadas en 500 μL de Buffer RIPA Buffer (150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 50 mM de Tris, 1% de Triton X-100, 0.5% de Deoxicolato de Sodio y 0.1% de SDS) adicionado con inhibidor de proteasas cOmplete™ (11697498001, Merck, Alemania). Los extractos fueron clarificados por centrifugación a 13,000 rpm a 4 °C durante 15 min. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el Kit de ensayo de proteínas Coomassie (Bradford) (#23200, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Los extractos de proteína (30 μg) fueron mezclados con una concentración apropiada de Buffer Laemmli 2X (1:1) o 4X (1:3), fueron hervidas a 96 °C, y separadas por SDS-PAGE; posteriormente transferidas a membranas de PVDF (LC2002, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche en polvo sin grasa en TBS 1X suplementada con 0.1 % de Tween-20 y se dejaron incubando toda la noche a 4° C. Se utilizaron como anticuerpos primarios anti-Caspasa-3 (#9662), anti-PARP1 (#9542) y anti- β -Actina (#4967) los cuales fueron adquiridos de Cell Signaling Technology (EE. UU.). Para la inmunodetección, las membranas se lavaron tres veces con TBS 1X-Tween-20 y se incubaron durante 1.30 horas con el anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo ligado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (#7074, Cell Signaling Technology, EE. UU.) diluido 1:3000 en TBS 1X-Tween-20 con 5% de leche en polvo sin grasa. Después, las membranas se lavaron tres veces con TBS 1X y los inmunocomplejos se revelaron por quimioluminiscencia con el equipo ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad, EE. UU.). La mayoría de las membranas fueron desnudadas y se volvieron a probar para detectar β -Actina como control de carga.

RESULTADOS

Realizamos el ensayo de exclusión con azul tripano con el objetivo de evaluar el efecto del extracto acuoso de *B. pinguin* sobre la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231, correspondiente a un subtipo agresivo de cáncer de mama triple negativo. Basándonos en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, se seleccionó una concentración de $135 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Masías-Ambriz et al., 2024). Nuestros resultados muestran que a dicha concentración el extracto no afectó significativamente la viabilidad celular en ninguno de los tiempos evaluados, en comparación con los niveles de muerte observados en las células control tratadas con $250 \mu\text{M}$ de Cisplatino durante 24 horas. En la Figura 1 se representa una comparación de las células no tratadas con aquellas tratadas con el extracto acuoso de *B. pinguin* a las 24 horas. Ambas condiciones mostraron un comportamiento similar y una morfología celular normal. De manera interesante, las células tratadas con el extracto mostraron un aumento gradual en la viabilidad a lo largo del tiempo, con valores de 68.2% a las 24 h, 76.4% a las 48 h y 94.8% a las 72 h (Figura 2).

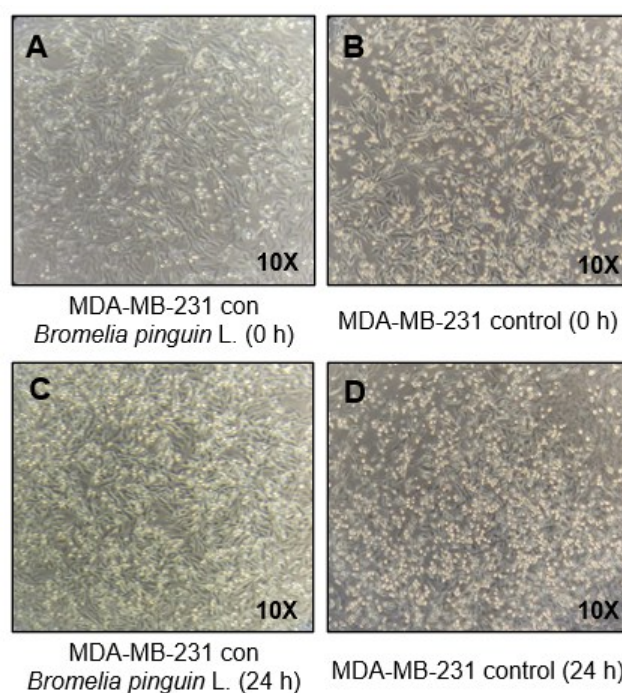


Figura 1. Comparación del cultivo de células MDA-MB-231 tratadas con o sin el extracto acuoso de *Bromelia pinguin*. A y C: imagen representativa del cultivo celular de MDA-MB-231 tratadas con el extracto al inicio de la cinética y después de 24 horas de incubación, respectivamente. B y D: imagen representativa del cultivo celular de MDA-MB-231 sin tratamiento al inicio de la cinética y después de 24 horas de incubación, respectivamente. Las células fueron observadas a un objetivo de 10X. Las imágenes son representativas de tres ensayos independientes.

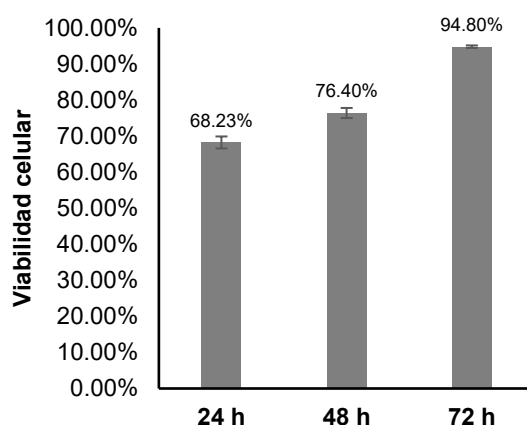


Figura 2. Viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas con el extracto acuoso de *Bromelia pinguin*. Se sembraron 4×10^6 células y fueron tratadas con $135 \mu\text{g mL}^{-1}$ del extracto por 24, 48 y 72 horas. Se realizó el ensayo de exclusión con azul tripano para determinar los porcentajes de viabilidad. Se muestran los datos obtenidos de los tres experimentos independientes y se presentan como la media $\pm$ SD. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y se realizó la prueba post-hoc de Tukey.

Para evaluar si el extracto acuoso de *B. pinguin* induce activación de apoptosis en la línea celular MDA-MB-231, se analizó mediante Western blot la expresión y el procesamiento de caspasa-3 y PARP1, marcadores clásicos de apoptosis (Figuras 3 y 4). En el caso de caspasa-3, se detectó una banda correspondiente a su forma como zimógeno (pro-caspasa-3; ~ 35 kDa) en todas las condiciones experimentales. No obstante, no se observaron los fragmentos de 17 y 19 kDa, generados por escisión proteolítica y necesarios para su completa activación. Este resultado se mantuvo incluso tras la sobreexposición de las membranas empleando el sustrato quimioluminiscente ultrasensible SuperSignal™ West Femto. De manera paralela, al evaluar el procesamiento de PARP1, se detectó una banda correspondiente a la forma completa de esta proteína (116 kDa) en todas las condiciones analizadas; sin embargo, el fragmento de 89 kDa, generado por la acción de caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y/o -7) y considerado un marcador clásico de apoptosis, no fue detectado en las condiciones tratadas con el extracto acuoso de *B. pinguin*, en concordancia con los datos obtenidos en nuestros ensayos de viabilidad.

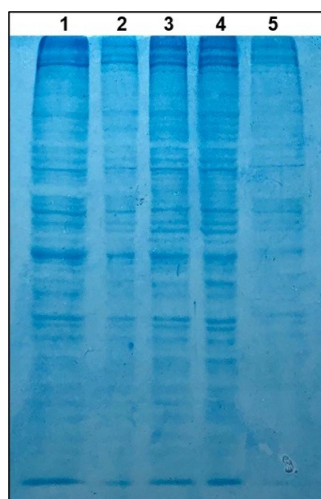


Figura 3. Perfil proteico de las células MDA-MB-231 obtenido por SDS-PAGE. Imagen representativa de un gel de poliacrilamida al 10% teñido con Azul de Coomassie de tres ensayos de SDS-PAGE independientes. Se cargaron 30 μ g de muestra en Buffer Laemmli 2X (1:1) o 4X (3:1). Carriles: control de células sin tratamiento (1), células tratadas con el extracto acuoso de *Bromelia pinguin* a las 24 (2), 48 (3) y 72 horas (4); y células tratadas con cisplatino (5). Se utilizó anti-actina como control de carga.

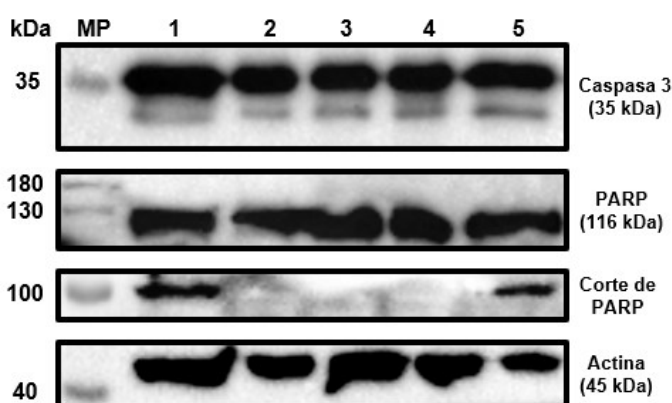


Figura 4. Análisis del efecto del extracto acuoso de *B. pinguin* en la activación de caspasa-3 y el procesamiento de PARP1 en células MDA-MB-231. Imagen representativa de tres ensayos independientes de western blot para el análisis de proteínas involucradas en la activación de la cascada de apoptosis. Carriles: MP: marcador de peso molecular; control de células sin tratamiento (1), células tratadas con el extracto acuoso de *B. pinguin* a las 24 (2), 48 (3) y 72 horas (4); y células tratadas con cisplatino (5). Se utilizó anti-actina como control de carga.

DISCUSIÓN

En este estudio evaluamos los efectos del extracto acuoso de *B. pinguin* sobre la viabilidad y marcadores de apoptosis en células MDA-MB-23, derivadas de un cáncer de mama triple negativo. Nuestros resultados indican que a la concentración evaluada el extracto no afecta significativamente la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231. En comparación, estudios previos reportan efectos citotóxicos significativos de extractos acuosos en células MDA-MB-231. Zhang et al. (2018) observaron una disminución dependiente de dosis y tiempo al

tratar estas células con el extracto acuoso de hojas de *Ficus carica* (0-8 mg mL⁻¹, 24-72 h). De forma similar, Kahlout y Eid (2014) demostraron una disminución en la viabilidad utilizando extractos de hojas de *Origanum syriacum* (0.8-1.6 mg mL⁻¹). Nuestros hallazgos subrayan la necesidad de explorar concentraciones más altas del extracto de *B. pinguin* para determinar su potencial citotóxico.

Por otro lado, Wan-Ibrahim et al. (2019) reportaron que el extracto acuoso de hojas de *Abrus precatorius* a 99 µg mL⁻¹ no mostró actividad significativa en células MDA-MB-231; mientras que el extracto metanólico indujo la muerte celular. Esto resalta la importancia de evaluar diferentes tipos de extractos, debido a que la composición química varía considerablemente según el método de extracción. Consideramos que la evaluación de extractos orgánicos, como el etanólico o metanólico, podría revelar propiedades adicionales de *B. pinguin*.

En cuanto a los efectos antitumorales de la familia *Bromeliaceae*, se ha demostrado que compuestos purificados como la bromelina presentan propiedades anticancerígenas. Chang et al. (2019) reportaron actividad antiproliferativa en células de carcinoma gástrico y de colon. De manera similar, se encontró que a una dosis de 50 µg mL⁻¹, la bromelina redujo la viabilidad celular en un 75% en células DLD-1 de carcinoma colorrectal posterior a 12 horas de tratamiento (Park et al., 2018). Por otro lado, la fastuosaina, una cisteína proteasa aislada de *Bromelia fastuosa*, mostró propiedades antitumorales significativas, incluyendo la inhibición del crecimiento de células de melanoma B16F10-Nex2 (Guimarães-Ferreira et al., 2007). Considerando estas evidencias, proponemos futuras investigaciones dirigidas a la purificación y caracterización de cisteína proteasas del extracto de *B. pinguin* para evaluar su potencial antitumoral.

Aunque no observamos una disminución en la viabilidad celular en nuestras condiciones experimentales, analizamos el efecto del extracto acuoso sobre la vía de apoptosis en células MDA-MB-231. Los resultados son consistentes con los obtenidos en los ensayos de viabilidad y sugieren que el extracto no induce apoptosis, dado que únicamente se detectó un procesamiento parcial de la pro-caspasa-3 y no se observó la escisión de PARP1 en ninguno de los tiempos de tratamiento; esto último nos pareció un hallazgo particularmente llamativo ya que el fragmento de 89 kDa fue detectable tanto en el control negativo como en el control positivo de apoptosis tratado con cisplatino, lo que nos pudiera sugerir que el extracto acuoso a la concentración de 135 µg mL⁻¹ está actuando como un citoprotector más que como un agente citotóxico. Este efecto fue observado por Masías-Ambriz et al. (2024), donde reportaron que la coexposición de PBMC con extractos de *B. pinguin* mejoró significativamente la viabilidad de estas células cuando eran expuestas a sales de glifosato y al herbicida Faena®.

Nuestros resultados representan un primer acercamiento al análisis de la posible actividad antitumoral de *B. pinguin* en células de cáncer de mama; sin embargo, es clara la importancia de realizar investigaciones adicionales que podrían centrarse en evaluar el efecto biológico del extracto acuoso de esta fruta a diferentes concentraciones y en diversas líneas celulares, así como en explorar el impacto de extractos de distinta naturaleza obtenidos de su fruto, para profundizar

en su potencial biológico, lo que permitirá ampliar el conocimiento sobre sus propiedades y aplicaciones terapéuticas.

CONCLUSIONES

El extracto acuoso de *B. pinguin* a una concentración de 135 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no afectó la viabilidad ni promovió la apoptosis en la línea celular MDA-MB-231. Sin embargo, este estudio representa el primer antecedente que evalúa una posible actividad antitumoral de este fruto nativo, lo que resalta la necesidad de realizar investigaciones adicionales para explorar su potencial biológico.

Contribución de los autores

Conceptualización: E.M.N., N.M.C., e I.G.A.; metodología: E.M.N., M.S.C.M., e I.G.A.; software: N.M.C., e I.G.A.; validación: I.G.A.; análisis formal: C.M.V. y S.P.D.C.; recursos: N.M.C., C.M.V., S.P.D.C., e I.G.A.; curación de datos: N.M.C., e I.G.A.; redacción del borrador original: E.M.N.; redacción, revisión y edición: M.S.C.M., N.M.C., C.M.V., S.P.D.C., e I.G.A.; supervisión: N.M.C., e I.G.A. Todos los autores han leído y aprobado la versión publicada del manuscrito

Financiamiento

Este proyecto fue financiado en parte por el estímulo otorgado como parte del Sistema Nacional de Investigadoras e Investigadores (SNII) del CONAHCYT.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. José Andrés Medrano-Félix y al Dr. Juan Daniel Lira-Morales del Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Coordinación Regional Culiacán, por las facilidades para el uso del ChemiDoc™ MP Imaging System.

Conflicto de interés

Los autores declaran que la investigación se llevó a cabo sin ninguna relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un posible conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Abreu-Payrol J, González-Mosquera DM, Meneses A, Cruz-de-la-Cruz ME, Banze F, Miranda-Martínez M, Ros-López O. 2005. Determinación de parámetros farmacognósticos y bromatológicos y evaluación de la actividad antiparasitaria de una preparación obtenida del fruto de bromelia pinguin L. que crece en Cuba. *Acta Farm. Bonaerense*. ISSN: 0326-2383.
- Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. 2016. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 10.1038/nrclinonc.2016.66.
- Chang TC, Wei PL, Makondi PT, Chen WT, Huang CY, Chang YJ. 2019. Bromelain inhibits the ability of colorectal cancer cells to proliferate via activation of ROS production and autophagy. *Plos One*. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0210274.
- Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. 2014. New horizons for old drugs and drug leads. *Journal of Natural Products*. 10.1021/NP5000796/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NP-2014-000796_0012.GIF.
- Crowley LC, Marfell BJ, Christensen ME, Waterhouse NJ. 2016. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. 10.1101/PDB.PROT087155.

- Guimarães-Ferreira CA, Rodrigues EG, Mortara RA, Cabral H, Serrano FA, Ribeiro-dos-Santos R, Travassos LR. 2007. Antitumor effects in vitro and in vivo and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. *Neoplasia*. 10.1593/neo.07427.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2022. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- International Agency for Research on Cancer. 2022. *Cancer Today*. https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars-compare-populations?mode=cancer&group_populations=1&types=0_1&sort_by=value1&sexes=2&key=total&populations=904
- Kahlout A, Eid A. 2014. Aqueous Extract Of *Origanum Syriacum* Inhibits Proliferation, Migration, Adhesion As Well As Erk1/2 Phosphorylation In Aggressive Breast Cancer. *Hamad bin Khalifa University Press*. 10.5339/QFARC.2014.HBSP1103.
- Looby CI, Eaton WD. 2014. Effects of *Bromelia pinguin* (Bromeliaceae) on soil ecosystem function and fungal diversity in the lowland forests of Costa Rica. *BMC Ecology*. 10.1186/1472-6785-14-12/TABLES/5.
- Martínez-Castillo M, Bonilla-Moreno R, Aleman-Lazarini L, Meraz-Rios MA, Orozco L, Cedillo-Barron L, Cordova EJ, Villegas-Sepulveda N. 2016. A Subpopulation of the K562 Cells Are Killed by Curcumin Treatment after G2/M Arrest and Mitotic Catastrophe. *Plos One*. 10.1371/JOURNAL.PONE.0165971.
- Masías-Ambríz LO, Caba-Flores MD, Montes-Castro N, García-Aguiré I, Ruiz-Ramos R, Zenteno E, Martínez-Valenzuela C. 2024. *Bromelia pinguin* Extract Mitigates Glyphosate-Induced Toxicity in Human Cells. *Cureus*. 10.7759/CUREUS.74701.
- Meza-Espinoza L, de los Ángeles Viver-Vera M, de Lourdes García-Magaña M, Sáyago-Ayerdi SG, Chacón-López A, Becerra-Verdín EM, Montalvo-González E. 2018. Enzyme activity and partial characterization of proteases obtained from *Bromelia karatas* fruit and compared with *Bromelia pinguin* proteases. *Food Science and Biotechnology*. 10.1007/S10068-017-0244-6/METRICS.
- Moreno-Hernández JM, Hernández-Mancillas XD, Navarrete E, Mazorra-Manzano MÁ, Osuna-Ruiz I, Rodríguez-Tirado VA, Salazar-Leyva JA. 2017. Partial Characterization of the Proteolytic Properties of an Enzymatic Extract From “Aguama” *Bromelia pinguin* L. Fruit Grown in Mexico. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 10.1007/S12010-016-2319-X/METRICS.
- Newman DJ, Cragg GM. 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. 10.1021/ACS.JNATPROD.9B01285/SUPPL_FILE/NP9B01285_SI_009.PDF.
- Park S, Oh J, Kim M, Jin EJ. 2018. Bromelain effectively suppresses Kras-mutant colorectal cancer by stimulating ferroptosis. *Animal Cells and Systems*. 10.1080/19768354.2018.1512521.
- Pío-León JF, López GG, Paredes-López O, de Jesús MB, Díaz-Camacho SP, Delgado-Vargas F. 2009. Physicochemical, nutritional and antibacterial characteristics of the fruit of *Bromelia pinguin* L. *Plant Foods for Human Nutrition*. 10.1007/S11130-009-0125-0
- Tejada-Portero L, Abellán-Guillén A, Bueno-Gavilá E, Salazar-Serna E, Rodríguez-Jiménez M, Montalvo-González E, López-García, M, Barros-Castillo CJ, Ragazzo-Sánchez AJ, García-Magaña M. 2023. Guamara and Cocuixtle: Source of Proteases for the Transformation of Shrimp By-Products into Hydrolysates with Potential Application. *Biology*. 10.3390/BIOLOGY12050753.
- Wan-Ibrahim W, Ismail N, Mohd-Salleh S, Yajid A, Wong M, Md Hashim M. 2019. Methanolic extract of *Abrus precatorius* promotes breast cancer MDA-MB-231 cell death by inducing cell cycle arrest at G0/G1 and upregulating Bax. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 10.4103/2221-1691.260397.
- Zhang Y, Wan Y, Huo B, Li B, Jin Y, Hu X. 2018. Extracts and components of *Ficus carica* leaves suppress survival, cell cycle, and migration of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *OncoTargets and Therapy*. 10.2147/OTT.S171601.

Efecto del extracto etanólico de *Capsicum chinense* sobre citoquinas inflamatorias y esteatosis hepática en ratas Wistar obesas por dieta hipercalórica

Camacho-Ureta Elisa Anali^{1,*}, Bravo Guadalupe^{2,*}, Acosta-Cota Selene de Jesús¹, Cázarez-Salazar, Silvestre Guadalupe¹, Mailloux-Salinas, Patrick², Colado-Velázquez, Juventino III¹

¹Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Culiacán.

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Sede Sur.

◆ **Correspondencia:** juvenino.colado@uadeo.mx

*Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

Área Temática:
Ciencias Biomédicas

Recibido: 29 de noviembre, 2024

Aceptado: 30 de junio, 2025

Publicado: 31 de julio de 2025

Cita: Camacho UEA, Bravo G, Acosta CSJ, Cázarez S, Silvestre G, Mailloux SP y Colado VJ. 2025. Extracto etanólico de *Capsicum chinense* sobre citoquinas inflamatorias y esteatosis hepática en ratas Wistar obesas por dieta hipercalórica. *Bioc Scientia* 1(2). <https://doi.org/10.63622/RBS.2409>



Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Resumen: La obesidad inducida por dietas hipercalóricas genera alteraciones metabólicas como aumento de peso, acumulación de grasa, inflamación sistémica, resistencia a la insulina y esteatosis hepática. Este estudio evaluó los efectos de la capsaicina y un extracto etanólico de *Capsicum chinense* sobre estas alteraciones en un modelo experimental de ratas obesas. Los resultados mostraron que ambos tratamientos disminuyeron significativamente la ingesta calórica, el peso corporal y la acumulación de tejido adiposo retroperitoneal en comparación con el grupo control obeso sin tratamiento, con un mayor efecto del extracto. Histológicamente, el extracto y la capsaicina redujeron la esteatosis hepática y el tamaño de los adipocitos en tejido adiposo retroperitoneal. En términos inflamatorios, ambos tratamientos disminuyeron los niveles hepáticos de TNF- α e IL-1 β , siendo el efecto del extracto superior al de la capsaicina pura. El efecto mayor del extracto podría atribuirse a su composición diversa, que incluye capsaicinoides y capsinoides, compuestos que activan los receptores TRPV1 y promueven la activación de la vía de AMPK (proteína quinasa activada por AMP), regulando procesos inflamatorios, oxidativos y metabólicos. Estos hallazgos sugieren que el extracto de *C. chinense* puede ser una herramienta prometedora para mitigar alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, como la esteatosis hepática y la inflamación crónica. Sin embargo, se requiere mayor investigación para determinar la contribución específica de cada componente del extracto y sus posibles interacciones sinérgicas.

Palabras clave: Obesidad, capsaicina, *Capsicum chinense*, esteatosis hepática, inflamación, AMPK, TRPV1, metabolismo.

Abstract: Obesity induced by hypercaloric diets leads to metabolic alterations such as weight gain, fat accumulation, systemic inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis. This study evaluated the effects of capsaicin and an ethanolic extract of *Capsicum chinense* on these alterations in an experimental model of obese rats. The results showed that both treatments significantly reduced caloric intake, body weight, and retroperitoneal adipose tissue accumulation compared to the untreated obese control group, with the extract exhibiting a stronger effect. Histologically, the extract and capsaicin decreased hepatic steatosis and adipocyte size in retroperitoneal adipose tissue. In terms of inflammation, both treatments reduced hepatic TNF- α and IL-1 β levels, with the extract demonstrating superior effects compared to pure capsaicin. The extract's greater effect may be attributed to its diverse composition, including capsaicinoids and capsinoids, which activate TRPV1 receptors and promote the activation of the AMPK pathway, modulating inflammatory, oxidative, and metabolic processes. These findings suggest that the *C. chinense* extract could be a promising tool to mitigate metabolic alterations associated with

obesity, such as hepatic steatosis and chronic inflammation. However, further research is needed to determine the specific contributions of each component in the extract and their potential synergistic interactions.

Keywords: Obesity, capsaicin, *Capsicum chinense*, hepatic steatosis, inflammation, AMPK, TRPV1, metabolism.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por un exceso de tejido adiposo que resulta de un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético (World Health Organization [WHO], 2021). Este trastorno afecta a millones de personas en todo el mundo y está asociado con el desarrollo de complicaciones metabólicas, como resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Ng et al., 2014). Entre estas, el hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) ha ganado especial relevancia debido a su prevalencia creciente en individuos obesos. NAFLD abarca un espectro de patologías hepáticas que van desde la simple esteatosis hasta la esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis y, en casos graves, cirrosis hepática (Younossi et al., 2018).

Uno de los mecanismos clave implicados en la fisiopatología tanto de la obesidad como del NAFLD es la inflamación crónica de bajo grado. Este proceso está mediado por la activación del sistema inmune innato y la liberación de citoquinas proinflamatorias como la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) (Hotamisligil, 2006). La IL-1 β desempeña un papel central en la inflamación metabólica al promover la activación del inflamasoma NLRP3 y la liberación de otras citoquinas inflamatorias, mientras que el TNF- α actúa como un mediador clave en la resistencia a la insulina y el daño tisular (Wang et al., 2021). Además, el tejido adiposo disfuncional en individuos obesos libera cantidades elevadas de estas citoquinas, exacerbando el estado inflamatorio y contribuyendo al desarrollo de complicaciones metabólicas como NAFLD.

En este contexto, se ha investigado el potencial terapéutico de compuestos bioactivos derivados de plantas para modular la inflamación y mitigar el daño metabólico asociado. Entre estos, los capsaicinoides presentes en *C. chinense*, como la capsaicina y la dihidrocapsaicina, han demostrado propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y hepatoprotectoras (Luo et al., 2011; Kang et al., 2016). *C. chinense*, conocido por su alto contenido en estos compuestos, podría ser una herramienta terapéutica prometedora para la prevención y manejo de la inflamación crónica y sus complicaciones en la obesidad.

Los extractos etanólicos de *C. chinense* contienen una combinación única de capsaicinoides, flavonoides y carotenoides que contribuyen a sus propiedades bioactivas. Estudios *in vitro* e *in vivo* han señalado que estos compuestos no solo reducen la expresión de IL-1 β y TNF- α , sino que también mejoran la función hepática al disminuir la acumulación de lípidos y el estrés oxidativo en el hígado (Martínez et al., 2020; Sánchez-Hidalgo et al., 2019). Este efecto hepatoprotector

podría ser particularmente relevante en el contexto de NAFLD, ya que las dietas hipercalóricas, ricas en grasas y carbohidratos refinados, son un factor determinante en el desarrollo de esta condición (Hariri y Thibault, 2010).

Las ratas Wistar alimentadas con dietas hipercalóricas constituyen un modelo experimental ampliamente utilizado para estudiar la obesidad y sus complicaciones metabólicas, incluyendo el desarrollo de NAFLD y la inflamación sistémica. Este modelo no solo reproduce características clave de la obesidad humana, sino que también permite evaluar intervenciones farmacológicas y naturales en un entorno controlado (Gibson et al., 2020). En este contexto, la administración de extractos botánicos como el de *C. chinense* podría ofrecer una estrategia efectiva para modular marcadores inflamatorios como IL-1 β e IL-6, y prevenir el daño hepático inducido por la obesidad.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto antiinflamatorio y hepatoprotector del extracto etanólico de *C. chinense* en ratas Wistar obesas alimentadas con una dieta hipercalórica. Se analizarán los niveles séricos y tisulares de IL-1 β e IL-6, junto con parámetros bioquímicos relacionados con el daño hepático y el metabolismo lipídico. Esta investigación busca proporcionar evidencia sobre el potencial terapéutico de los compuestos bioactivos del *C. chinense* en el manejo de la inflamación y las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad, incluyendo NAFLD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formulación de crema de capsaicina al 0.075 %

La crema de capsaicina se preparó disolviendo 15 mg de capsaicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en 0.5 mL de etanol (JT Baker, Fontana, CA, EE. UU.). Luego, esta solución se añadió a 20 g de crema fría base USP y se homogeneizó con un mezclador de alta velocidad (Oster, Torrington, CT, EE. UU.) durante 5 min. Se utilizó una gota de colorante vegetal comercial de color verde (McCormick, Ciudad de México, México) como referencia visual para confirmar la homogenización completa. La crema base (vehículo) se preparó de la misma manera, utilizando colorante vegetal azul (McCormick, Ciudad de México, México), pero sin añadir capsaicina ni extracto y, se almacenaron a 3 °C hasta su utilización.

Preparación del extracto etanólico de *Capsicum chinense*

Se sometieron a secado por temperatura a 60 °C ejemplares de *C. chinense* por 36 h; una vez secados se molieron utilizando una licuadora industrial hasta quedar un polvo fino. El polvo fino fue añadido a tubos de vidrio con taparrosca con etanol absoluto (JT Baker, Fontana, Ca, EE.UU.) en proporción 20 % p/v, y se sometieron a maceración por 48 h a 30 °C con agitación a 120 rpm. Una vez obtenido el extracto se filtró utilizando un embudo de Büchner y un filtro de papel Whatman cuantitativo grado 598 con retención de partículas de 8-10 μ m. Una vez

obtenido el extracto se procedió a la evaporación del solvente mediante destilación en un sistema Soxhlet. Para la cuantificación de capsaicina presente en el extracto, éste se reconstituyó en etanol grado HPLC en concentración de 1 mg mL⁻¹ y se sometió a análisis mediante HPLC utilizando estándar de capsaicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en una columna C18 Spherisorb ODS2 (80Å, fase reversa 5 µm, 4.6 mm * 150 mm, 1 pkg [PSS831913], silanol) para fase estacionaria; la fase móvil consistió en Metanol 60 %, Acetonitrilo 20 %, Agua 20 %, grado HPLC, en elución isocrática. Flujo de 0.8 mL min⁻¹ con un volumen de inyección de 20 µL. Y se realizó la medición con detector 2998 PDA Photodiode UV/vis de longitud de onda programable a 280 nm (Waters, EE. UU). La concentración obtenida de capsaicina presente en el extracto fue de 0.85 mg mL⁻¹.

Formulación de crema de extracto de *Capsicum chinense*

La crema de extracto se preparó reconstituyendo el extracto en etanol en concentración de 1 mg mL⁻¹ de Etanol, añadiendo 17.647 mL de extracto etanólico de *C. chinense* a 20 g de crema fría base USP y se homogeneizó con un mezclador de alta velocidad (Oster, Torrington, CT, EE. UU.) durante 5 min para tener una concentración equivalente al 0.075 % de capsaicina en la crema final; se utilizó una gota de colorante vegetal comercial de color rojo (McCormick, Ciudad de México, México) como referencia visual para confirmar la homogenización completa. Y se almacenó a 3 °C hasta su utilización.

Modelo experimental

Los animales experimentales utilizados fueron ratas Wistar macho, obtenidas del bioterio del CINVESTAV Sede Sur. Todos los procedimientos y protocolos con animales en la presente investigación fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética (CICUAL-Cinvestav-IPN, número: 449-08) y se llevaron a cabo siguiendo las regulaciones descritas en la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Bienestar de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Para garantizar la homogeneidad de los animales en cada grupo, se obtuvieron un total de 40 ratas Wistar macho, con un peso de 190–210 g, provenientes de nuestra unidad experimental de animales. Las ratas se alojaron individualmente bajo un ciclo normal de luz-oscuridad de 12 h y en condiciones controladas de temperatura y humedad (22 ± 2 °C y 60 %, respectivamente). Los animales se dividieron en dos grupos principales: Control (n=10) con dieta normal y Obeso (n=30) con dieta de sacarosa. Después de 28 semanas, las ratas se asignaron aleatoriamente a cuatro subgrupos de la siguiente manera: Control-Veh, Obeso-Veh, Obeso-Cap, Obeso-Ext (n=10) por grupo.

Inducción de obesidad

Se utilizó una dieta hipercalórica basada en carbohidratos, como se ha reportado previamente (Medina-Contreras et al., 2017). Durante un periodo de 28 semanas, el grupo Control recibió diariamente 30 g de alimento sólido para ratas LabDiet 5008 (LabDiet, St. Louis, MO, EE. UU.) y agua *ad libitum*, mientras que los grupos Obesos recibieron agua de bebida *ad libitum* con 30 % (peso/volumen) de sacarosa refinada comercial (Ingenio Azucarero Potrero, Veracruz, México), además del alimento estándar sólido LabDiet 5008. La dieta hipercalórica se administró durante todo el protocolo experimental. La cantidad de alimento y líquido consumido se registró diariamente, y el alimento del día anterior se reemplazó por una nueva ración fresca; de igual manera el líquido consumido fue medido diariamente y reemplazado por un frasco nuevo. La ingesta calórica se determinó tomando en cuenta la cantidad de alimento sólido LabDiet 5008 ingerido (4.33 kcal g^{-1}) por día; en los grupos obesos se sumó la ingesta en mL de sacarosa al 30 % (1.2 kcal mL^{-1}) a la ingesta de alimento sólido para tener la ingesta calórica total por día; realizándose un promedio general al final del período de tratamiento.

Tratamiento farmacológico

Las ratas de los grupos Obeso-Cap y Obeso-Ext recibieron tratamiento farmacológico de la siguiente manera: los animales del grupo Cap fueron tratados con crema de capsaicina al 0.075 % a una dosis de 0.6 mg kg^{-1} , aplicada diariamente en un área delimitada de 5 cm^2 de piel abdominal rasurada, aplicando durante 1 minuto hasta su absorción completa. Los animales del grupo Ext fueron tratados con crema preparada con extracto de *C. chinense*, con concentración de capsaicina al 0.075 % a una dosis de 0.6 mg kg^{-1} . Los grupos Control-Veh y Obeso-Veh solo recibieron crema base (vehículo) diariamente y sirvieron como controles de referencia. El tratamiento se proporcionó por 28 días.

Preparación de muestras de tejido hepático y adiposo

En el último día del periodo experimental, las ratas de cada grupo fueron sometidas a un ayuno de 12 h y posteriormente sacrificadas por decapitación. Se realizó disección del hígado y el tejido adiposo retroperitoneal (TARP). Todos los tejidos extraídos se lavaron inmediatamente en solución de PBS fría (0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M NaH_2PO_4 , 0.002 M KH_2PO_4 , pH 7.4) (Sigma-Aldrich, EE.UU.), se secaron con papel de filtro y se pesaron. Posteriormente, se cortaron en mitades; la mitad se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su utilización; la otra mitad de los tejidos fueron sometidos a fijación en una solución de formalina al 10 % en PBS y se almacenaron para su procesamiento y análisis histológico.

Evaluación morfológica e histológica

Una porción del TARP e hígado almacenados de cada rata se fijaron con formalina–PBS, se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Posteriormente, se cortaron en láminas de 8 μm de grosor utilizando un micrótomo y se tiñeron con hematoxilina–eosina. Se obtuvieron y analizaron imágenes de tres a cinco láminas histológicas diferentes por grupo utilizando un microscopio óptico (Carl Zeiss modelo 63300, EE. UU.) equipado con una cámara digital de 9 megapíxeles. Las fotografías se analizaron mediante densitometría óptica utilizando el software Sigma Scan Pro-5 para análisis de imágenes (SigmaScan EE. UU.). Este análisis se realizó en tres campos de cada lámina, con un aumento de 40x para TARP e hígado.

Ensayo para IL-1 β y TNF- α

Para medir la expresión de citoquinas IL-1 β y TNF- α en hígado, se prepararon de 5 a 6 muestras de hígado por cada grupo. Los tejidos se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su homogenización utilizando un buffer de lisis (pH 8) que contenía: 0.25 % de desoxicolato de sodio, 1 % de NP40, 0.1 % de Triton X-100, (en mM) 50 Tris–HCl, 50 HEPES, 50 KCl, 150 NaCl, 1 EDTA, 1 EGTA, 5 β -glicerol fosfato, 1 ortovanadato, 1 DTT, 5 NaPPi, 1 PMSF, 50 NaF, inhibidores de proteasas: aprotinina ($2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), leupeptina ($2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) y pepstatina ($1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; Sigma-Aldrich, EE.UU.). Los homogenados se centrifugaron a 14 000 g durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El ensayo enzimático ligado a inmunosorbente (ELISA) se realizó utilizando kits comerciales Rat IL-1b (Q63264. Raybiotech, EE.UU.), Rat TNF-a (P16599. Raybiotech, EE.UU.). Los homogenados se adecuaron según las instrucciones del fabricante del kit y se colocaron en una microplaca sensibilizada con el anticuerpo primario para la citoquina específica, posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario, el conjugado enzimático y el sustrato. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron a 450 nm en un lector de microplacas Tecan Infinite 200®.

Análisis estadístico

Los valores se expresaron como media $\pm$ desviación estándar. Los datos se analizaron para determinar la normalidad mediante pruebas de Shapiro–Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante pruebas de Bartlett. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron mediante análisis de varianza de una o dos vías. Las comparaciones *post hoc* entre grupos se realizaron utilizando las pruebas de Tukey–Kramer o Bonferroni, empleando el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Los resultados se consideraron significativos si $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Efecto de tratamientos sobre el aumento de peso corporal, porcentaje de tejido adiposo retroperitoneal e ingesta calórica

La Figura 1A muestra la ingesta calórica al final del tratamiento; puede observarse que el grupo Obeso-Veh mostró un incremento muy significativo del consumo calórico ($p < 0.001$), mientras que ambos tratamientos Cap y Ext, disminuyeron significativamente el consumo calórico en comparación al grupo Obeso-Veh ($p < 0.01$), a su vez no hubo diferencias significativas en el consumo calórico entre ambos tratamientos. La acumulación porcentual de TARP (Figura 1B) fue significativamente mayor en las ratas Obeso-Veh en comparación con las ratas Control-Veh ($p < 0.001$); en las ratas Obesas, los tratamientos con Cap y Ext disminuyeron significativamente el incremento de peso en comparación con Obeso-Veh ($p < 0.001$), siendo significativamente menor el tratamiento Ext en comparación con Cap ($p < 0.01$). El TARP se vio incrementado significativamente en el grupo Obeso-Veh ($p < 0.001$); los tratamientos con Cap y Ext redujeron significativamente el TARP en comparación con el grupo Obeso-Veh en comparación con el grupo Control-Veh ($p < 0.001$), los grupos Obesos Cap y Ext redujeron significativamente el TARP en comparación con el grupo Obeso-Veh ($p < 0.001$), exhibiendo el tratamiento Ext una disminución estadísticamente significativa en comparación con el grupo tratado con Cap ($p < 0.001$).

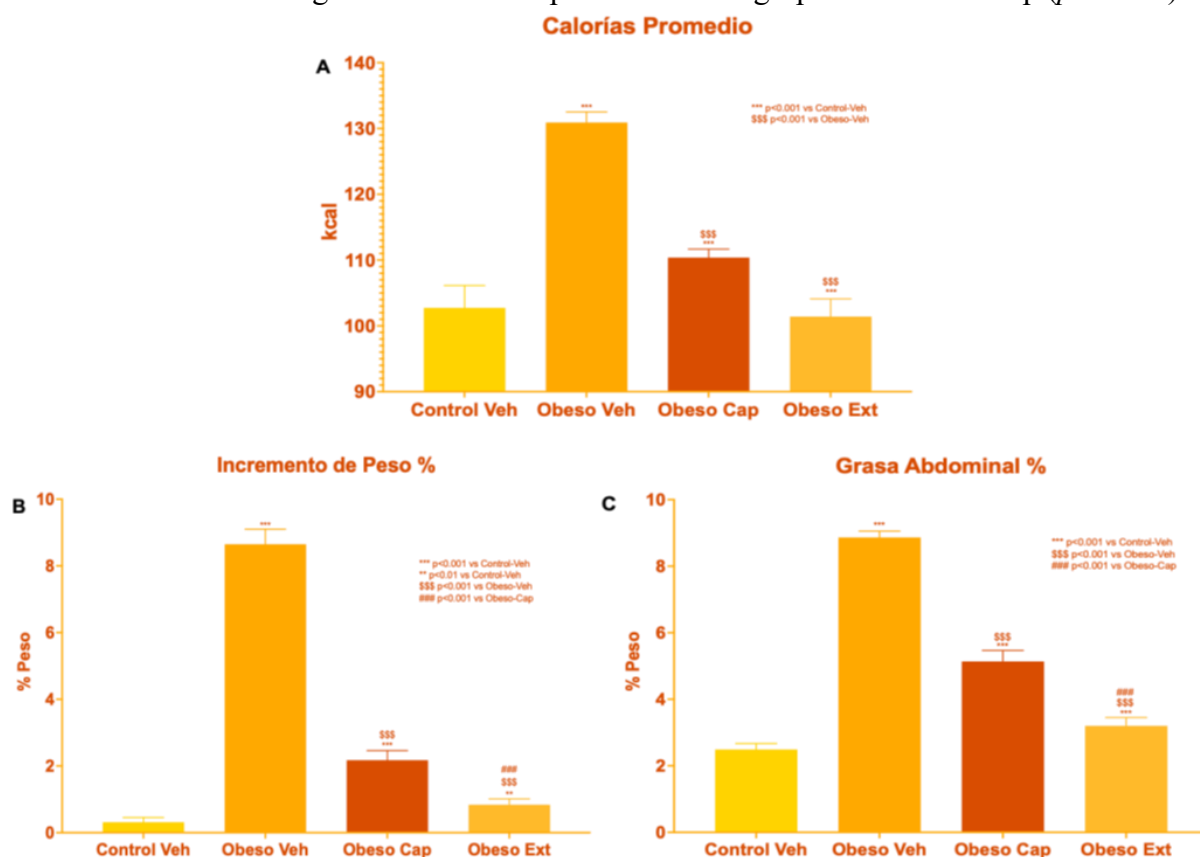


Figura 1. A) Consumo de calorías promedio por los grupos experimentales (n=8); B) Incremento de peso porcentual por los grupos experimentales al final de los tratamientos (n=8); C) Incremento en el porcentaje de grasa abdominal al final de los tratamientos (n=8) (Promedio $\pm$ desviación estándar).

Efecto del tratamiento en la histología de TARP e hígado

La esteatosis hepática fue evidente en las ratas del grupo Obeso-Veh; es particularmente notable que la presencia de esteatosis disminuye significativamente el número de hepatocitos observados por campo, ya que las vacuolas de grasa desplazan a los adipocitos y los tratamientos restablecen el número de adipocitos de manera comparable al grupo Control-Veh (figura 2A, Cuadro 1). Las ratas del grupo Obeso-Veh mostraron un incremento muy significativo de vacuolas de grasa presentes en comparación el grupo Control-Veh; por su parte, los tratamientos Cap y Ext redujeron de manera significativa la esteatosis hepática reduciendo el número de vacuolas de grasa, siendo el grupo Obeso-Ext el que mostró una reducción comparable al grupo Control-Veh (Cuadro 1). En el caso del TARP, en ratas del grupo Obeso-Veh pudo observarse un incremento significativo en el diámetro adipocitario así como una disminución significativa del número de adipocitos por campo debidos al incremento en el diámetro, mientras que ambos tratamientos (Cap y Ext) mostraron una reducción significativa en el diámetro de los adipocitos en comparación con el grupo Obeso-veh, siendo el grupo Obeso-Ext el que mostró una reducción comparable al grupo Control-Veh (Figura 2B, Cuadro 1); haciéndose evidente el efecto de los tratamientos sobre el tejido adiposo retroperitoneal.

Cuadro 1. Estereometría de hepatocitos, vacuolas de grasa en hepatocitos y de adipocitos en cortes de tejido en los diversos tratamientos (Promedio $\pm$ desviación estándar).

	Control-Veh	Obeso-Veh	Obeso-Cap	Obeso Ext
Hepatocitos por campo	549 $\pm$ 23 ^S	496 $\pm$ 19*	535 $\pm$ 20 ^S	543 $\pm$ 26 ^S
Vacuolas de grasa por campo	0	78 $\pm$ 11*	30 $\pm$ 10*	6 $\pm$ 3
Diámetro de vacuolas grasas (mM)	0	251 $\pm$ 10*	50 $\pm$ 8*	77 $\pm$ 12*
Adipocitos por campo	53 $\pm$ 7	20 $\pm$ 3*	44 $\pm$ 5	49 $\pm$ 6
Diámetro Adipocitario (mM)	490 $\pm$ 14 ^S	685 $\pm$ 23*	527 $\pm$ 20* ^S	475 $\pm$ 17 ^S

* $p < 0.05$ vs Control-Veh

^S $p < 0.05$ vs Obeso-Veh

Efecto de los tratamientos en la expresión de IL-1 β y TNF- α

Las concentraciones de IL-1 β y TNF- α en los homogenados de hígado fueron directamente influenciadas por el estado de obesidad (Figura 3A y 3B); ya que incrementó significativamente la concentración de estas citocinas inflamatorias en los animales Obeso-veh en comparación con el grupo Control-Veh ($p < 0.001$). El tratamiento con capsaicina redujo significativamente estos incrementos ($p < 0.001$); de la misma forma, el tratamiento con extracto también redujo significativamente el incremento en la expresión de ambas citoquinas, mostrándose una reducción significativamente mayor dada por el extracto en

comparación con el tratamiento con capsaicina ($p<0.01$) en ambas citoquinas. En el caso del TNF- α ambos tratamientos redujeron la expresión de esta citoquina a niveles comparables al control, mostrando que el extracto disminuye las respuestas inflamatorias en hígado en mayor magnitud que la capsaicina sola.

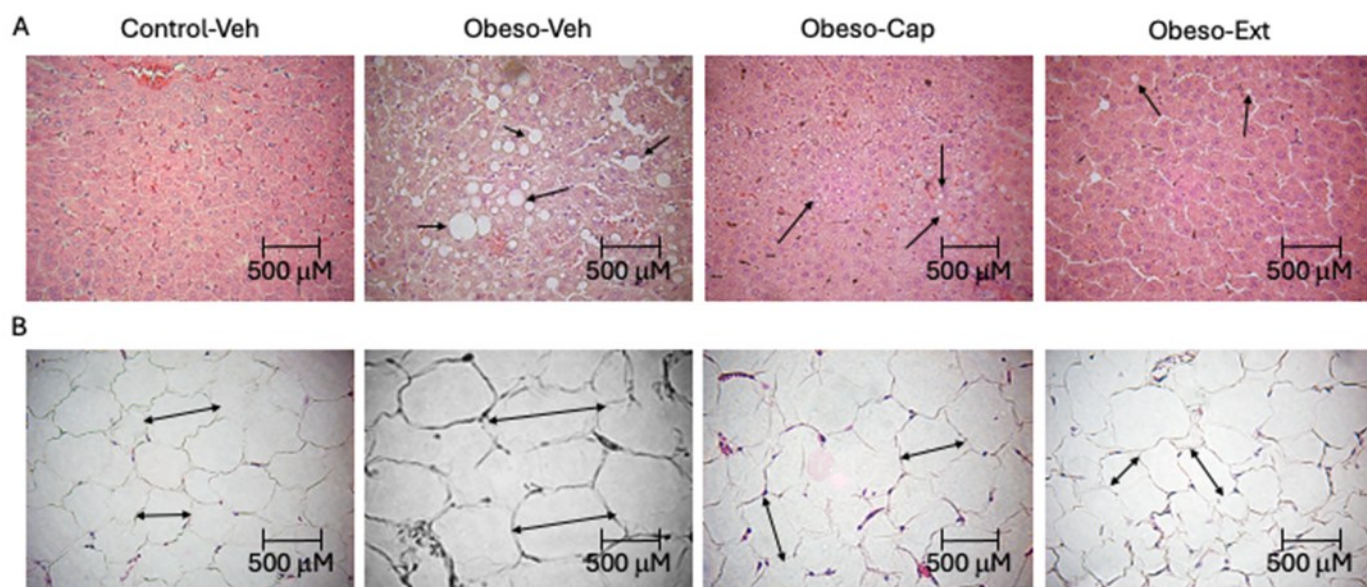


Figura 2. A) Micrografías de muestras de hígado de los diferentes grupos a 40x, tinción Hematoxilina-Eosina. B) Muestras de tejido adiposo retroperitoneal a 40x, Tinción Hematoxilina-Eosina.

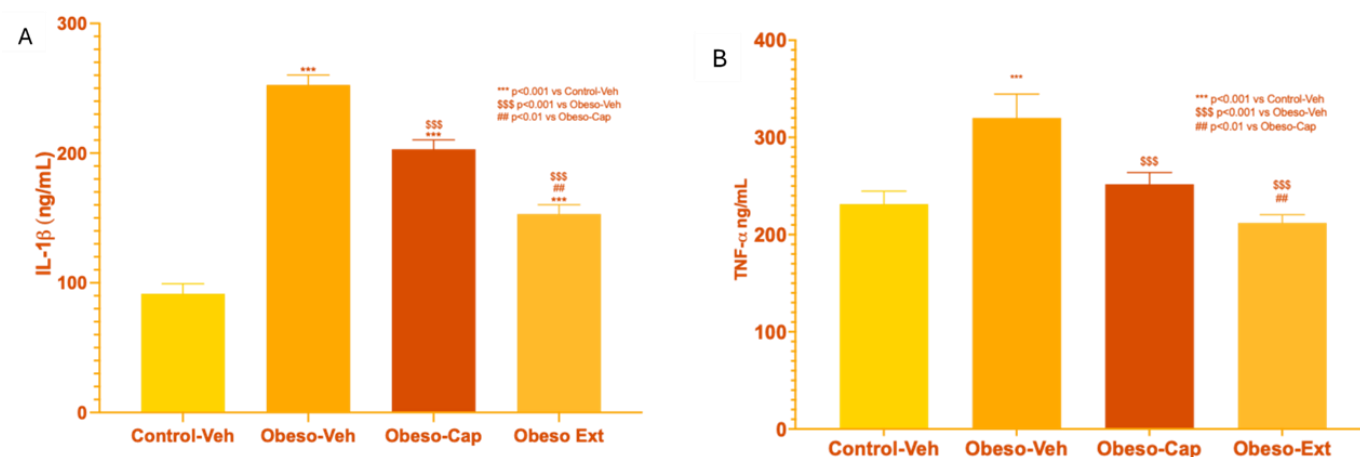


Figura 3. A) Niveles de IL-1 β en los grupos experimentales (n=5). B) Niveles de TNF- α en los grupos experimentales (n=5) (Promedio $\pm$ desviación estándar).

DISCUSIÓN

La dieta hipercalórica con sacarosa es uno de los modelos que representan con mayor fidelidad la obesidad más común en el ser humano. Diversos grupos

de investigación han informado que la obesidad por dieta alta en carbohidratos, por sí misma, incrementa la ingesta de alimentos, el peso corporal y el tejido adiposo retroperitoneal. También provoca varias alteraciones metabólicas relacionadas, como resistencia a la insulina (RI), estrés oxidativo, inflamación, intolerancia a la glucosa, dislipidemia, aumento de la presión arterial y daño hepático y pancreático.

En este estudio, las ratas obesas que no llevaron tratamiento farmacológico presentaron mayores afectaciones, tanto en parámetros de consumo calórico, incremento de peso y porcentaje de TARP como en alteraciones histopatológicas en hígado y tejido adiposo. De la misma manera el efecto de la dieta hipercalórica es evidente en el incremento de citocinas inflamatorias.

El tratamiento con capsaicina produjo una disminución significativa de las alteraciones ocasionadas por la obesidad secundaria a una dieta hipercalórica. Lo que es congruente con los estudios realizados previamente (Lee et al., 2003; Kang et al., 2016; Medina-Contreras et al., 2017; Medina-Contreras et al., 2020); se ha sugerido que los efectos terapéuticos de la capsaicina podrían deberse principalmente a la activación de la enzima AMPK (proteína quinasa activada por AMP). La activación de esta enzima por el tratamiento con capsaicina desencadena procesos catabólicos que aumentan la captación y oxidación de sustratos energéticos, además de presentar un efecto anorexigénico, lo que podría explicar la reducción de la ingesta calórica, disminución del peso corporal, la grasa retroperitoneal, y la mejora en el perfil inflamatorio de los grupos tratados.

Se ha estudiado la capsaicina en esteatosis hepática, encontrándose que reduce la lipogénesis y promueve la β -oxidación de los ácidos grasos a través de la activación de AMPK lo cual es clave en el metabolismo energético hepático (Kang et al., 2016). La activación del receptor TRPV1 por la capsaicina en el sistema hepático reduce la acumulación de grasa al promover la oxidación de ácidos grasos. Este mecanismo también contribuye a mejorar la sensibilidad a la insulina, reduciendo el riesgo de hígado graso asociado a resistencia a la insulina (Zhai et al., 2014).

Estudios previos han mostrado que la capsaicina reduce significativamente la expresión de IL-1 β en modelos de inflamación aguda y crónica. La activación de los receptores TRPV1 en células inmunes puede atenuar la producción de IL-1 β mediante la inhibición de la vía NF- κ B, un factor de transcripción clave en la respuesta inflamatoria (Kim et al., 2010). Asimismo, en modelos animales con obesidad inducida por dieta alta en grasas, la administración de capsaicina disminuyó los niveles séricos de IL-1 β , lo que se asocia con una mejora en la inflamación sistémica y sensibilidad a la insulina (Chung et al., 2013).

A su vez, se ha demostrado que la capsaicina inhibe la producción de TNF- α en macrófagos y otros tipos celulares en respuesta a estímulos inflamatorios como el LPS (lipopolisacárido). Este efecto se asocia con la activación de la vía AMPK, que bloquea la transcripción de genes proinflamatorios dependientes de NF- κ B (Lee et al., 2003). En modelos de enfermedades metabólicas, como la obesidad y la diabetes tipo 2, la capsaicina reduce los niveles de TNF- α en tejido adiposo y

suero, lo que contribuye a la mejora de la resistencia a la insulina y la inflamación crónica de bajo grado (Kim et al., 2015).

En ratas con inflamación inducida por LPS, la capsaicina redujo significativamente los niveles de IL-1 β y TNF- α en plasma y tejidos inflamados (Yang et al., 2010). En cultivos de macrófagos humanos, tanto la capsaicina como el capsato disminuyeron la liberación de TNF- α tras la estimulación con LPS, sugiriendo un efecto directo sobre la regulación de citoquinas (Huang et al., 2015). Aunque hay información clínica limitada, algunos ensayos en humanos han mostrado que la suplementación con capsaicinoides disminuye marcadores inflamatorios sistémicos, incluyendo TNF- α , en personas con obesidad y resistencia a la insulina (Whiting et al., 2012).

Se han estudiado tres posibles mecanismos por los que la capsaicina puede ejercer su efecto. El primero es a través de la modulación de los receptores TRPV1 los cuales median efectos antiinflamatorios al regular el flujo de calcio intracelular, promoviendo vías antiinflamatorias como AMPK y PPAR- γ (Yang et al., 2010). El segundo es la inhibición de la activación de NF- κ B, que es crucial para la transcripción de IL-1 β , TNF- α y otras citoquinas inflamatorias (Kim et al., 2015; Huang et al., 2015) y finalmente la regulación del estrés oxidativo ya que la capsaicina reduce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que suelen amplificar la inflamación mediada por IL-1 β y TNF- α (Kawabata et al., 2013; Lee et al., 2003).

El extracto de *C. chinense* mostró un mayor efecto que la capsaicina pura en todos los parámetros medidos en el estudio. Múltiples grupos de investigación han estudiado los extractos etanólicos de *C. chinense* encontrando que en su composición pueden encontrarse: capsaicina y dihidrocapsaicina que constituyen los compuestos picantes principales, responsables de la pungencia característica; así como nordihidrocapsaicina, homocapsaicina, y homodihidrocapsaicina que se encuentran presentes en menores cantidades (Collins et al., 1997).

Se ha encontrado además la presencia de capsinoides como capsato y dihidrocapsato en los extractos etanólicos de *C. chinense*, que no son pungentes, pero también son activadores de los receptores TRPV1. De estos, el capsato es el más estudiado y tiene propiedades metabólicas y antioxidantes, se encuentra en altas concentraciones en frutas maduras de diversas especies de *Capsicum*. Tiene potencial para incrementar el gasto energético y la oxidación de grasas sin los efectos secundarios de la picantez. Por su parte el dihidrocapsato estructuralmente es similar al capsato pero con un grupo funcional reducido y se ha demostrado que comparte propiedades termogénicas y antioxidantes (Kawabata et al., 2013).

Sin embargo, se sabe poco sobre el efecto que pueden tener la combinación de diversos capsaicinoides y capsinoides de manera directa. El efecto combinado de los capsaicinoides y los capsinoides en el metabolismo ha sido objeto de investigación debido a sus propiedades termogénicas y metabólicas. Ambos compuestos influyen positivamente en el gasto energético y la regulación

metabólica, aunque presentan diferencias en su mecanismo de acción y tolerabilidad.

Se sabe que tanto capsaicinoides como capsinoides activan los receptores TRPV1 (receptores potenciales transitorios vaniloides tipo 1) en las neuronas sensoriales, lo que desencadena un aumento en la liberación de catecolaminas y estimula la termogénesis en el tejido adiposo marrón. Este proceso promueve la oxidación de lípidos y aumenta el gasto energético (Yoneshiro et al., 2012). Por su parte los capsinoides aunque activan los mismos receptores TRPV1, tienen una acción más suave debido a su menor capacidad de cruzar las membranas celulares. Esto los hace menos irritantes y más tolerables para personas sensibles al picante (Snitker et al., 2009).

La combinación de capsaicinoides y capsinoides podría potenciar los efectos metabólicos, ya que ambos activan la vía de la AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y mejoran la oxidación de grasas, aunque con diferentes grados de intensidad (Ohshima et al., 2014). La activación conjunta de la vía TRPV1 puede aumentar la sensibilidad a la insulina, reducir la acumulación de grasa visceral y mejorar los perfiles metabólicos en condiciones como la obesidad y el síndrome metabólico (Whiting et al., 2012). Ambos compuestos contribuyen a la disminución del apetito al modular los niveles de grelina y leptina. Los capsaicinoides tienden a ser más efectivos en este aspecto debido a su interacción más fuerte con TRPV1 (Ludy et al., 2012). Los capsinoides, han mostrado efectos de reducción de esteatosis hepática al regular genes relacionados con la síntesis y oxidación de lípidos, como PPAR- α y SREBP-1c (Kang et al., 2016).

Tanto los capsaicinoides como los capsinoides han demostrado propiedades antiinflamatorias, reduciendo marcadores de inflamación sistémica, lo que es beneficioso en condiciones metabólicas crónicas como la obesidad y la resistencia a la insulina (Hsu y Yen, 2007). Ambos compuestos también promueven la reducción del estrés oxidativo al incrementar la expresión de enzimas antioxidantes (Kawabata et al., 2013).

Estudios previos en modelos animales han mostrado que la combinación de capsaicina y capsinoides tiene un efecto acumulativo en la pérdida de peso, reducción del tejido adiposo y mejora en la sensibilidad a la insulina (Ohshima et al., 2014). Mientras que, en humanos, aunque los estudios son más limitados, se ha observado que la suplementación con ambos compuestos incrementa el metabolismo basal y la oxidación de grasas durante el reposo y el ejercicio (Snitker et al., 2009).

Podemos entonces entender que los mayores efectos terapéuticos de la terapia dada por el extracto podrían deberse a la integración de diferentes señales que activan la AMPK (Ohshima et al., 2014). La capsaicina activa los receptores TRPV1 promoviendo la liberación de calcio en el retículo endoplásmico, así como la entrada a través de canales, lo que a su vez estimula la quinasa de proteínas dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKK β), que fosforila y activa la AMPK. De igual manera, otros capsaicinoides y capsinoides presentes en el extracto, como dihidrocapsaicina, capsiato y dihidrocapsiato, también activan los

receptores TRPV1 y pudieran estar ejerciendo un efecto sinérgico en la activación de la vía AMPK (Kawabata et al., 2013; Ohyama et al., 2014).

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *C. chinense* mostró mayor actividad que la capsaicina pura en la reducción de la cantidad porcentual de TARP, reducción del incremento de peso, esteatosis en la microarquitectura de hígado, así como la reducción de citoquinas inflamatorias.

Estos hallazgos sugieren el posible empleo del extracto de *C. chinense* en el tratamiento de alteraciones ocasionadas por dieta hipercalórica como la esteatosis hepática. Sin embargo, se requieren estudios que evalúen el efecto de la combinación de capsaicinoides y capsinoides en el extracto, así como sus proporciones para poder determinar la magnitud de los posibles efectos sinérgicos que aparentemente se están presentando en este modelo experimental.

Contribución de los autores

C. U. E. A. Conceptualización del estudio, diseño del experimento, ejecución del experimento, preparación del manuscrito. G. B. Conceptualización del estudio, diseño del experimento, verificación del experimento, edición y revisión. A. C. S de J. Verificación de experimento, edición y revisión. C. S. S. G. Ejecución del experimento, verificación del experimento. M. S. P. Ejecución del experimento, verificación de experimento. C. V. J III. Conceptualización del estudio, diseño del experimento, análisis e interpretación de datos, análisis estadístico, preparación del manuscrito, aprobación de la versión final del manuscrito.

Financiamiento

Este estudio fue financiado parcialmente con apoyo PIFIP 2019-2020 de la Universidad Autónoma de Occidente.

Agradecimientos

Los autores extienden agradecimiento a la Rectoría de la Universidad Autónoma de Occidente gestión 2017-2020 por brindar el apoyo en infraestructura para la realización de este estudio, así como al CINVESTAV-Sede Sur por el apoyo en la realización de la fase experimental en modelo animal.

Conflicto de interés

Los autores declaran que la investigación se llevó a cabo sin ninguna relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un posible conflicto de intereses.

Declaración de ética

Todos los procedimientos y protocolos con animales en la presente investigación fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética (CICUAL-Cinvestav-IPN, número: 449-08) y se llevaron a cabo siguiendo las regulaciones

descritas en la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Bienestar de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999)

REFERENCIAS

- Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, González-Gross M. 2017. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition*. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114511005460>
- Collins MD, Wasmund LM. 1997. Capsaicin: Structure, mechanisms of action, and applications in the food and pharmaceutical industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408399709527756>
- Gibson PR, Nguyen QN, Tolhurst RJ. 2020. High-fat diet-induced NAFLD in rat models: Mechanisms and experimental applications. *Journal of Experimental Biology*. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.224108>
- Hariri N, Thibault L. 2010. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>
- Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05485>
- Hsu CL, Yen GC. 2007. Effects of capsaicin on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in mouse macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf071034j>
- Huang CC, Lin KJ, Lee LT, Chen CW. 2015. Capsaicin ameliorates inflammation in mice via modulation of the NF- κ B and MAPK pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf504711y>
- Kang JH, Kim CS, Han IS. 2016. Effects of capsaicin on obesity and inflammation in vitro and in vivo. *Journal of Medicinal Food*. DOI: <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.3654>
- Kang JH, Tsuyoshi G, Le Ngoc H, Kim HM, Tu TH, Noh HJ, Han IS. 2016. Capsaicin, a spicy component of hot pepper, attenuates obesity-induced hepatic steatosis by inhibiting PPAR γ activity in high-fat diet-fed mice. *International Journal of Obesity*. DOI: <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.22>
- Kawabata F, Inoue N, Masamoto Y, Matsumoto T, Kato M, Kimura T. 2013. Non-pungent capsaicin analogs (capsinoids) increase metabolic rate and enhance thermogenesis via gastrointestinal TRPV1 in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.120960>
- Kim CS, Park WH, Park JY. 2015. Capsaicin reduces TNF- α expression in obesity-induced inflammation through inhibition of NF- κ B pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.04.002>
- Lee JY, Hwang WI, Lim ST. 2003. Anti-inflammatory effects of capsaicin: Inhibition of TNF- α expression in stimulated human macrophages. *Journal of Medicinal Food*. DOI: <https://doi.org/10.1089/109662003772519924>
- Ludy MJ, Mattes RD, Hudak R. 2012. Spicing up a high-fat, high-carbohydrate meal with capsaicin or spicy mustard: Effects on appetite and energy expenditure in healthy weight individuals. *Physiology & Behavior*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.016>
- Luo XJ, Peng J, Li Y, Zhang Y, Liao H. 2011. Capsaicin ameliorates obesity-associated inflammation and metabolic disorders in obese rats fed with a high-fat diet. *Journal of Food Science*. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02265.x>
- Martínez LE, Pérez HJ, González FJ. 2020. Bioactive compounds in *Capsicum chinense* and their health-promoting properties. *Plant Foods for Human Nutrition*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00815-1>
- Medina-Contreras JML, Colado-Velázquez J, Gómez-Viquez NL, Mailloux-Salinas P, Pérez-Torres I, Aranda-Fraustro A, Carvajal K, Bravo G. 2017. Effects of topical capsaicin combined with moderate exercise on insulin resistance, body weight and oxidative stress in hypoestrogenic obese rats. *International Journal of Obesity*. DOI: <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.33>
- Medina-Contreras JML, Mailloux-Salinas P, Colado-Velázquez J, Gómez-Viquez NL, Velázquez-Espejel R, Susunaga-Notario AC, Arias-Chávez DJ, Bravo G. 2020. Topical capsaicin cream with moderate exercise protects against hepatic steatosis, dyslipidemia and increased blood pressure in hypoestrogenic obese rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10357>
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M. E., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., ... Gakidou, E. (2014, August 30). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet* (London, England). <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4624264/>
- Ohyama K, Nogusa Y, Shinoda K. 2014. Thermogenic and metabolic impact of capsinoids in humans and mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. DOI: <https://doi.org/10.3177/jnsv.60.S59>
- Sánchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Fernández-Bolaños JG. 2019. Capsaicinoids: Role in obesity and NAFLD prevention. *Advances in Nutrition Research*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01994-8>
- Snitker S, Fujishima Y, Shen H, Ott S, Pi-Sunyer X, Furuhashi Y, Takahashi M. 2009. Effects of novel capsinoid treatment on fatness and energy metabolism in humans: Possible pharmacogenetic implications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26764>
- Wang H, Meng Q, Guo J. 2021. Role of IL-1 β and IL-6 in inflammation and NAFLD development. *Frontiers in Endocrinology*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.768900>
- Whiting S, Derbyshire E, Tiwari BK. 2012. Capsaicinoids and capsinoids: A potential role for weight management? *Journal of Nutritional Science*. DOI: <https://doi.org/10.1017/jns.2012.2>
- Yoneshiro T, Aita S, Kawai Y, Iwanaga T, Saito M, Saito T. 2012. Nonpungent capsaicin analogs (capsinoids) increase energy expenditure through the activation of brown adipose tissue in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.025536>
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. 2018. Global epidemiology of NAFLD—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.28431>
- Zhai X, Zhang L, Chen X, Shi H, Zhong W, Kang Z. 2014. Activation of TRPV1 by dietary capsaicin ameliorates hepatic steatosis through the CaMKK β /AMPK pathway. *Metabolism*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.05.002>

Conocimiento sobre la zoonosis por *Anisakis* en consumidores de pescado y mariscos en Sinaloa, México

López-Moreno Dania ¹✉, Morales-Serna Francisco Neptalí ²✉

¹ Posgrado en Ciencias en Recursos Acuáticos, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, México.

² Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, México.

✉ **Correspondencia:** danialopez96.dlm@gmail.com

Área Temática:

Ciencias Acuáticas y Pesqueras

Recibido: 28 de abril, 2025

Aceptado: 10 de julio, 2025

Publicado: 17 de julio de 2025

Cita: López-Moreno D y Morales-Serna FN. 2025. Conocimiento sobre la zoonosis por *Anisakis* en consumidores de pescado y mariscos en Sinaloa, México. *Bioc Scientia* 1(2). <https://doi.org/10.63622/RBS.2506>



Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Resumen: El consumo de pescado y mariscos crudos o semicrudos representa un riesgo para la salud pública debido a posibles infecciones parasitarias. Entre los parásitos transmitidos por productos marinos destacan los nematodos de la familia Anisakidae, causantes de anisakidosis, una zoonosis emergente con potencial impacto en la salud humana. Una de las anisakidosis más conocidas es la anisakiasis, causada por nematodos del género *Anisakis*. El objetivo de este estudio fue evaluar el nivel de conocimiento sobre la anisakiasis entre consumidores en Sinaloa, México. Se aplicó una encuesta a 501 participantes. La mayoría de los participantes reportó consumir ceviche o sushi al menos una vez al mes. Aunque la mayoría de los encuestados reconoce el riesgo general de adquirir parásitos a través del consumo de pescado crudo o semicrudo, existe un desconocimiento marcado sobre *Anisakis* como agente etiológico específico. Adicionalmente, mediante el análisis de tendencias de búsqueda de Google Trends, se observó un aumento sostenido en el interés por preparaciones como ceviche y sushi durante los últimos 20 años. Estos hallazgos resaltan la necesidad de implementar campañas educativas enfocadas en la prevención de anisakiasis y la promoción de prácticas seguras de consumo.

Palabras clave: Seguridad alimentaria, Anisakidosis, Anisakiasis, Nematoda, Parasitología.

Abstract: The consumption of raw or undercooked fish and seafood poses a public health risk due to potential parasitic infections. Among the parasites transmitted through marine products, nematodes of the family Anisakidae are particularly noteworthy, as they cause anisakidosis, an emerging zoonosis with potential impacts on human health. One of the most well-known forms of anisakidosis is anisakiasis, caused by nematodes of the genus *Anisakis*. The aim of this study was to assess the level of knowledge about anisakiasis among consumers in Sinaloa, Mexico. A total of 501 individuals completed a structured survey, the majority of whom reported consuming ceviche or sushi at least once a month. Although the majority acknowledged the general risk of acquiring parasites from eating raw or undercooked fish, there was a marked lack of awareness regarding *Anisakis* as a specific etiological agent. Additionally, an analysis of Google Trends data revealed a sustained increase in public interest in raw fish dishes, such as ceviche and sushi, over the past 20 years. These findings highlight the need for educational campaigns focused on the prevention of anisakiasis and the promotion of safe seafood consumption practices.

Keywords: Food safety, Anisakidosis, Anisakiasis, Nematoda, Parasitology.

INTRODUCCIÓN

En México, el sector gubernamental ha promovido el consumo de pescados y mariscos, debido a que el consumo per cápita actual es inferior a 13 kg anuales, mientras que la ingesta recomendada para mantener una población saludable es de al menos 16.5 kg al año (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2025). El pescado es ampliamente reconocido como una fuente rica en nutrientes esenciales, ya que aporta proteínas de alta calidad, ácidos grasos omega-3, minerales, vitaminas y aminoácidos beneficiosos (Khalili y Sampels, 2018). Su consumo se asocia con múltiples efectos positivos para la salud, entre ellos propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, promotoras de la cicatrización, neuroprotectoras, cardioprotectoras y hepatoprotectoras (Chen et al., 2022). No obstante, para aprovechar estos beneficios es fundamental considerar también los posibles riesgos asociados, como la presencia de parásitos zoonóticos en productos pesqueros (Chai et al., 2005).

Más de 40 especies de parásitos, principalmente trematodos y nematodos, se han asociado al consumo de pescado y mariscos, constituyendo un riesgo para la salud humana (Shamsi, 2019). Entre las infecciones parasitarias transmitidas por productos marinos, la anisakidosis es una de las más relevantes y se emplea como término general para describir las infecciones causadas por nematodos de la familia Anisakidae. Dentro de este grupo, las especies del género *Anisakis* son las responsables específicas de la anisakiasis. Sin embargo, la literatura científica refleja cierta confusión terminológica, ya que los términos anisakidosis, anisakiasis y anisakiosis se han utilizado de manera indistinta (Shamsi y Barton, 2023), a pesar de las recomendaciones de un grupo de expertos que sugiere diferenciarlos según el género del agente etiológico (Kassai et al., 1988). Además de *Anisakis*, los géneros *Pseudoterranova* y *Contracaecum* han adquirido importancia en el ámbito zoonótico (Mattiucci y Nascetti, 2008), por ser causantes de pseudoterranoviasis y contraecaeciasis, respectivamente. Estos parásitos se encuentran en una amplia variedad de peces marinos y en algunos invertebrados, como el calamar (Koinari et al., 2013; Gutiérrez et al., 2025). La infección en humanos ocurre al consumir pescado crudo o semicrudo contaminado con anisákidos (Shamsi y Sheorey, 2018). Los síntomas clínicos de la anisakidosis pueden incluir irritación esofágica y gástrica, náuseas, vómitos, diarrea, así como dolor epigástrico y abdominal intenso (Buchmann y Mehrdana, 2016). España, Japón y Corea del Sur figuran entre los países con mayor número de casos registrados, probablemente debido a sus prácticas culinarias y a la disponibilidad de métodos diagnósticos adecuados, en contraste con otras regiones donde estos recursos son limitados (Shamsi y Barton, 2023).

A nivel mundial, se observa una tendencia creciente en el consumo de pescado crudo o semicrudo, lo que podría llevar a que países con una tradición de bajo consumo de estos alimentos adopten esta práctica, aumentando así el riesgo de contraer anisakidosis (Chai et al., 2005; Golden et al., 2022a). Los consumidores pueden contribuir a disminuir dicho riesgo siempre que estén adecuadamente informados y conozcan sobre el tema, lo cual es especialmente

importante en regiones donde el consumo de pescados y mariscos es muy popular (Llarena-Reino et al., 2015; Caldeira et al., 2021; Garcia-Sanchez et al., 2024).

Sinaloa, ubicado en el noroeste de México, concentra gran parte de su población en zonas costeras o cercanas a la costa, particularmente en las ciudades de Los Mochis, Culiacán de Rosales y Mazatlán, ubicadas en el norte, centro y sur del estado, respectivamente (INEGI, 2020). Esta proximidad al mar favorece un alto consumo de pescados y mariscos, incluidos platillos elaborados con pescado crudo, como el ceviche, sushi y sashimi, ampliamente aceptados en la región (Escobar, 2020). En el presente estudio, se observó que, de acuerdo con datos de Google Trends, el interés por estos platillos ha aumentado de forma sostenida en Sinaloa durante los últimos 20 años. En este contexto, el objetivo principal de este estudio fue evaluar el nivel de conocimiento sobre la anisakiasis entre los consumidores sinaloenses.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tendencias de consumo

Para conocer la tendencia en el interés por el consumo de pescado crudo y semicrudo en México se recurrió a Google Trends (<https://trends.google.com.mx/trends/>), servicio público que visualiza la frecuencia de búsqueda de términos específicos en Internet desde 2004. Cabe señalar que los datos no representan el volumen absoluto de búsquedas, ya que se normalizan y presentan en una escala de 0 a 100. Esta herramienta ha demostrado ser un buen predictor de patrones de consumo en general y del consumo de alimentos en particular (Matias et al., 2009; Woo y Owen, 2019). En este estudio se emplearon los términos “ceviche” y “sushi” en México, abarcando el periodo de enero de 2004 a abril de 2025. Estos términos fueron seleccionados por su uso extendido entre la población y por estar directamente relacionados con el consumo de pescado crudo o semicrudo.

Encuesta

Se llevó a cabo un estudio transversal con el objetivo de evaluar el nivel de conocimiento sobre anisakiasis entre consumidores de pescados y mariscos en el estado de Sinaloa, México. La muestra estuvo conformada por 501 participantes mayores de 18 años, residentes en las regiones norte, centro y sur del estado. La recolección de datos se realizó durante el mes de abril de 2025 mediante una encuesta en línea, aplicada a través de la plataforma Google Forms y distribuida por medios digitales y redes sociales.

La encuesta constó de 16 preguntas (Cuadro 1). Las primeras siete preguntas recabaron datos sociodemográficos generales, tales como lugar de residencia, edad, sexo y nivel educativo, preservando la confidencialidad de los encuestados. Las preguntas 8 a la 16 se enfocaron en evaluar el conocimiento general sobre la anisakiasis, abordando aspectos clave como las vías de transmisión,

manifestaciones clínicas, medidas preventivas y hábitos de consumo de productos pesqueros.

Cuadro 1. Preguntas incluidas en la encuesta sobre anisakidosis y consumo de pescado y mariscos crudos.

Nº	Pregunta
1	¿Consumes pescado o mariscos?
2	¿Qué edad tienes?
3	¿En dónde vives?
4	Género
5	Nivel de estudios alcanzado
6	¿Cada cuánto tiempo comes ceviche de pescado (sierra, atún, tilapia, otros)?
7	¿Cada cuánto tiempo comes sushi o sashimi?
8	Los problemas estomacales después de consumir ceviche, sushi o sashimi son causados únicamente por bacterias
9	En el ceviche, sushi o sashimi puede haber gusanos parásitos capaces de causarnos enfermedades
10	El limón usado para “curtir” el pescado o marisco también mata a los parásitos
11	El consumo accidental de gusanos parásitos del pescado puede causar reacciones alérgicas en algunas personas
12	Lavar el pescado con agua de la llave elimina los parásitos
13	La congelación adecuada de pescados y mariscos puede prevenir enfermedades causadas por parásitos
14	Cocinar bien el pescado elimina el riesgo de contraer enfermedades causadas por gusanos parásitos
15	Si una persona ha comido pescado crudo muchas veces sin enfermarse, entonces nunca se enfermará
16	¿Has escuchado hablar sobre Anisakis?

Los datos obtenidos mediante la encuesta fueron registrados y procesados utilizando hojas de cálculo de Microsoft Excel. Para las preguntas relacionadas con el nivel de conocimiento, se empleó una codificación binaria, asignando un valor de 1 a las respuestas correctas y 0 a las incorrectas. Se calcularon las frecuencias absolutas de respuestas correctas para cada ítem, y se estimó el promedio de aciertos, el cual fue representado gráficamente en porcentaje según diferentes variables categóricas: lugar de residencia, edad, sexo y nivel educativo. Aunque el cuestionario no fue diseñado completamente a partir de estudios previos, su estructura y sistema de puntuación se basaron en encuestas aplicadas en investigaciones similares (García-Sánchez et al., 2024; Machuca et al., 2024).

Este enfoque metodológico permitió obtener una visión general del grado de conocimiento presente en la población sinaloense sobre esta zoonosis parasitaria, lo que constituye una base valiosa para el diseño de futuras estrategias de educación en salud pública.

RESULTADOS

Según los datos de Google Trends, durante los últimos 20 años se ha registrado un incremento constante en los volúmenes de búsqueda de los términos “ceviche” y “sushi” en México. En una escala normalizada de 0 a 100, el interés por el término “ceviche” aumentó de un promedio anual de 4 en 2004 a 46 en 2024 (Figura 1). Un patrón recurrente fue la aparición de picos de interés entre los meses de marzo y abril de cada año, alcanzando su punto máximo (valor 100) en abril de 2020. Entre todas las entidades federativas, Sinaloa se ubicó en cuarto lugar en cuanto al nivel de interés. En el caso del término “sushi”, el promedio anual pasó de 13 en 2004 a 79 en 2024, con el pico máximo (100) registrado en julio de 2020, y destacando Sinaloa como el estado con mayor interés (Figura 2).

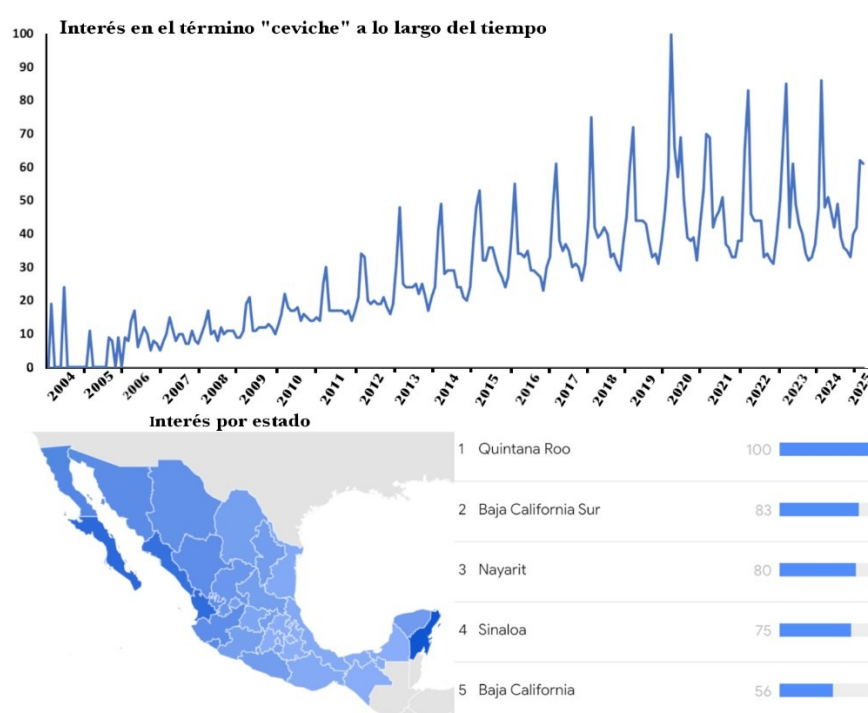


Figura 1. Tendencia del Interés público por el término “ceviche” en México desde 2004 hasta 2025. Escala de color: de azul claro (0, bajo interés) a azul intenso (100, máximo interés relativo) según Google Trends.

De los 533 participantes encuestados, 501 reportaron ser consumidores de pescados y mariscos, por lo que únicamente estos fueron considerados para completar la encuesta en su totalidad. El número de participantes de acuerdo a su lugar de residencia, edad, sexo y nivel educativo se presenta en el Cuadro 2. La mayoría consume estos alimentos una o dos veces al mes (Figura 3). Un porcentaje menor (<15%) declaró no consumirlos nunca.

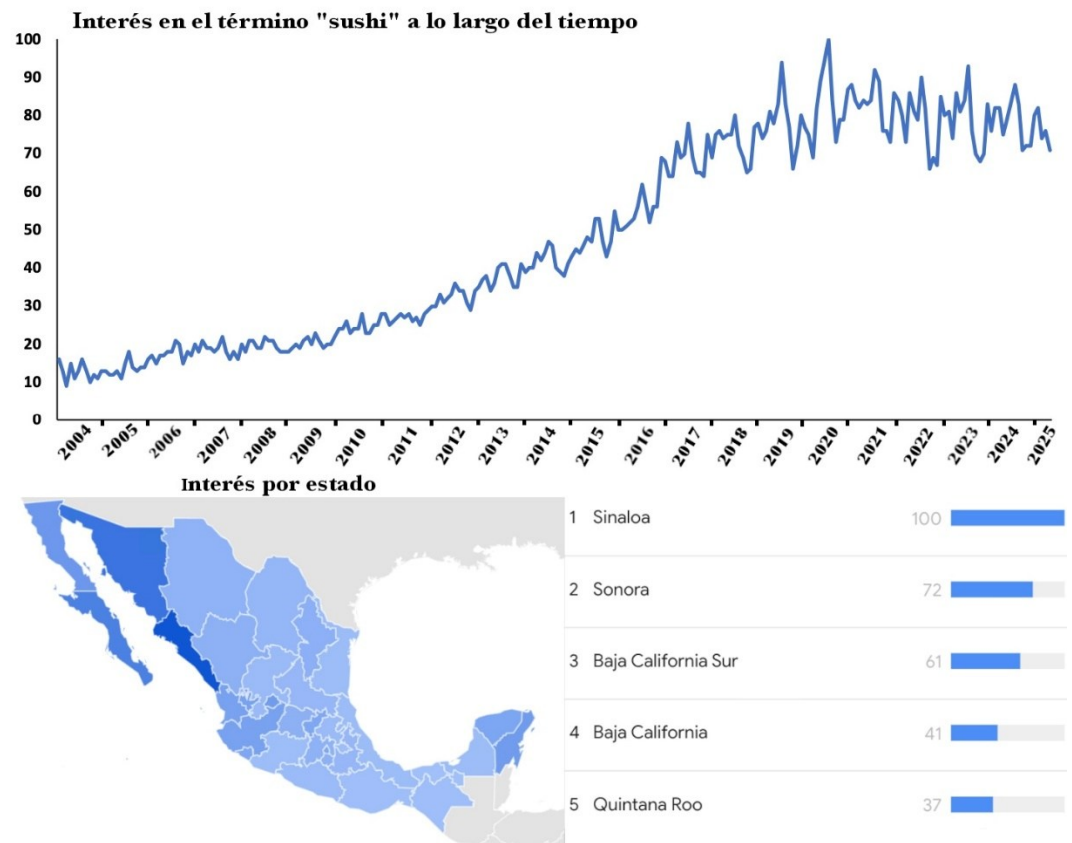


Figura 2. Tendencia del Interés público por el término “sushi” en México desde 2004 hasta 2025. Escala de color: de azul claro (0, bajo interés) a azul intenso (100, máximo interés relativo) según Google Trends.

Cuadro 2. Variables sociodemográficas de los participantes encuestados sobre anisakidosis y consumo de pescado y mariscos crudos.

Variable	Categoría	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
Sexo	Femenino	333	66.5
	Masculino	165	32.9
Edad	18–26 años	139	27.7
	27–35 años	159	31.7
	36–45 años	87	17.4
	46–54 años	60	12
	55–64 años	56	11.2
Nivel educativo	Básica	39	7.8
	Media	103	20.6
	Superior	359	71.6
Lugar de residencia	Norte de Sinaloa	217	43.3
	Centro de Sinaloa	114	22.7
	Sur de Sinaloa	170	33.9

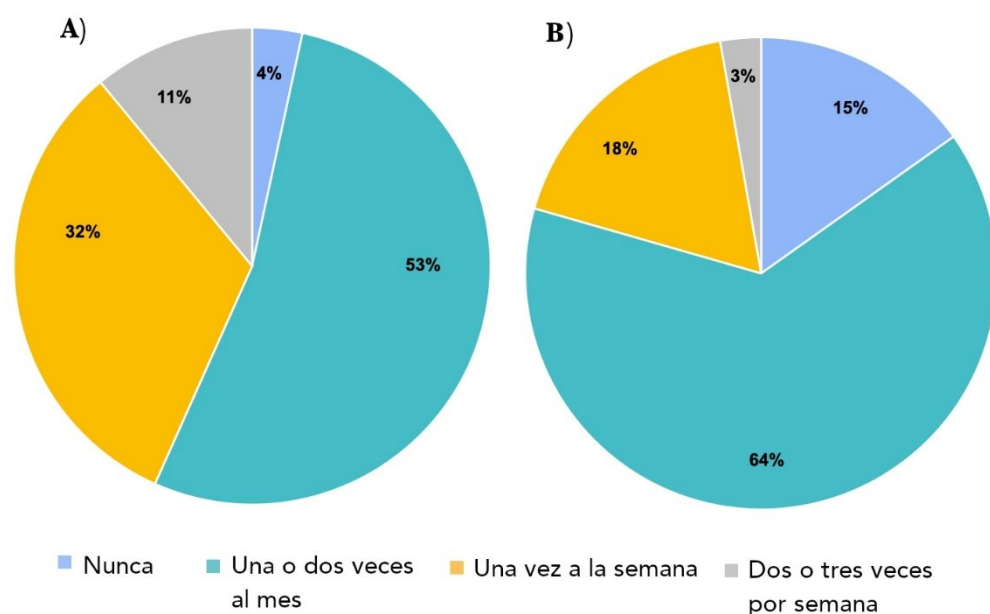


Figura 3. Frecuencia de consumo de pescados y mariscos entre consumidores en el estado de Sinaloa, México. A) Consumo de ceviche de pescado (sierra, atún, tilapia, otros); B) Consumo de sushi o sashimi.

En general, los encuestados mostraron un nivel adecuado de conocimiento (>80%) sobre el riesgo de contraer una enfermedad parasitaria, por el consumo de pescados y mariscos crudos o semicrudos. Este nivel de conocimiento fue consistente entre las distintas regiones (norte, centro y sur de Sinaloa), sexo, nivel de escolaridad y grupos de edad (Figura 4). No obstante, al analizar individualmente cada pregunta (Figura 5), se identificó un porcentaje considerable de respuestas incorrectas, lo que evidencia deficiencias puntuales en el conocimiento de aspectos clave relacionados con la anisakiasis. En particular, una proporción notable de participantes respondió incorrectamente a afirmaciones como: “Los problemas estomacales después de consumir ceviche, sushi o sashimi son causados únicamente por bacterias” (pregunta 8), “El limón usado para ‘curtir’ el pescado o marisco también mata a los parásitos” (pregunta 10), y “La congelación adecuada de pescados y mariscos puede prevenir enfermedades causadas por parásitos” (pregunta 13). Estas respuestas erróneas reflejan una comprensión limitada respecto a las medidas preventivas necesarias para evitar infecciones parasitarias, como la anisakiasis. Además, la mayoría de los encuestados (88 %) mencionó que nunca había escuchado hablar sobre *Anisakis*.

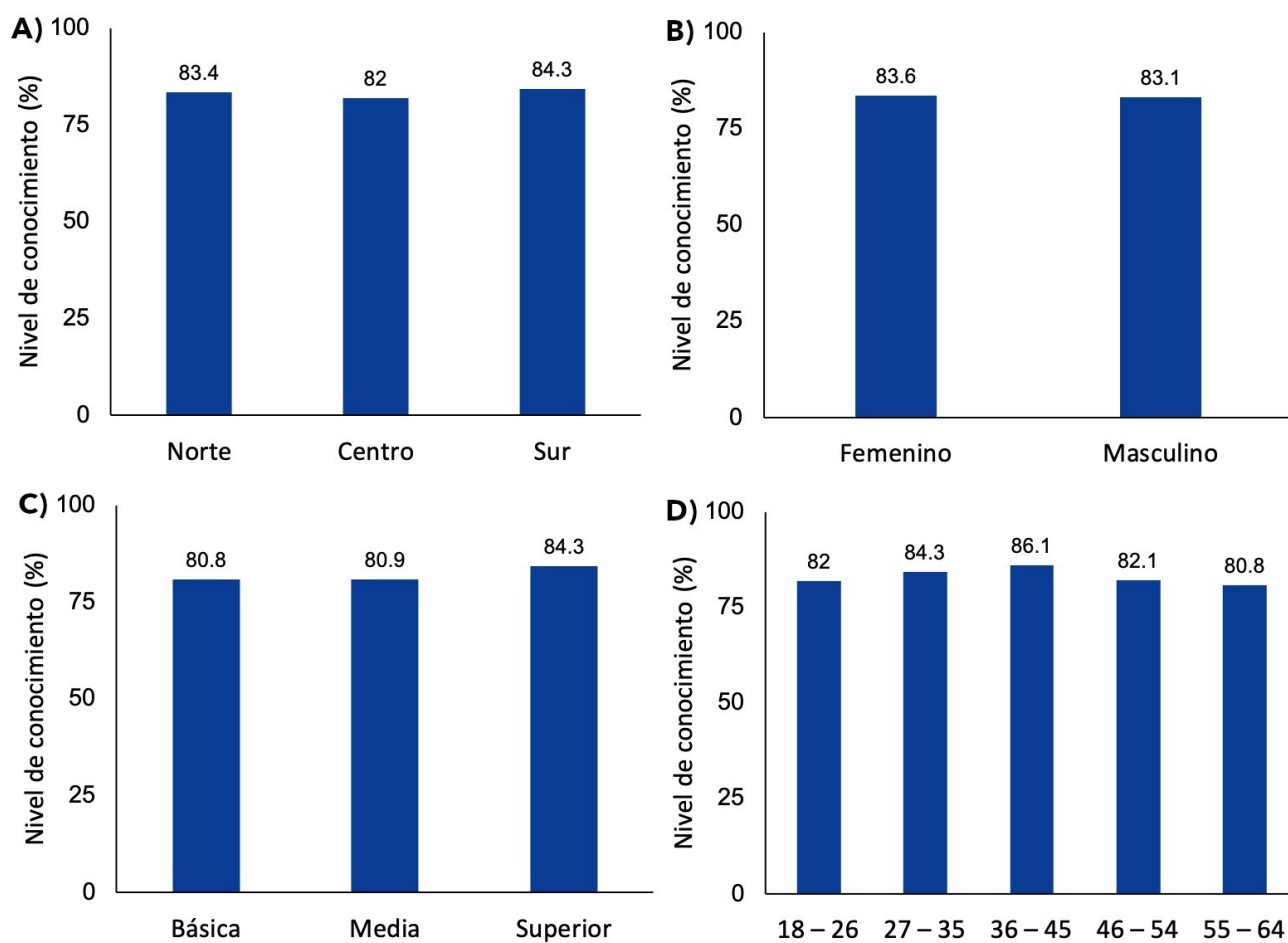


Figura 4. Nivel de conocimiento (%) de anisakiasis entre consumidores de pescados y mariscos en el estado de Sinaloa, México según variables sociodemográficas: A) Región, B) Sexo, C) Escolaridad, D) Edad (años).

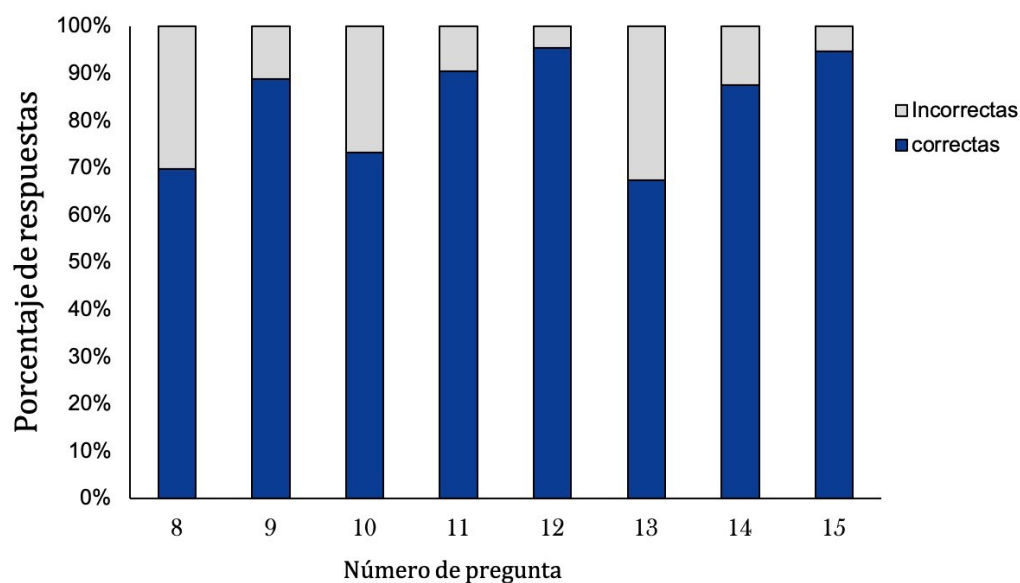


Figura 5. Porcentaje de respuestas correctas e incorrectas por pregunta de conocimiento general sobre anisakiasis.

DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que, en Sinaloa, los consumidores presentan un conocimiento general adecuado sobre el riesgo de adquirir enfermedades parasitarias asociadas al consumo de pescado crudo o semicrudo. Sin embargo, existe una brecha en el reconocimiento de *Anisakis* como agente etiológico específico. Esta falta de conocimiento no es inusual, ya que la anisakiasis es una zoonosis poco reconocida en la mayoría de los países debido a la escasez de datos epidemiológicos sólidos. Por ejemplo, en Portugal, una encuesta reveló que, si bien la mayoría de los consumidores son conscientes del riesgo de adquirir parásitos por consumir pescado crudo, pocos han oído hablar de *Anisakis* (Golden et al., 2022b). Esta carencia se atribuye, en gran medida, a la similitud de sus síntomas con los de otros trastornos gastrointestinales y a la limitada disponibilidad de métodos diagnósticos específicos en los centros de atención médica (Shamsi y Barton, 2023; Nonković et al., 2025).

Ante el aumento en el consumo de pescados y mariscos crudos, es necesario fomentar el desarrollo de investigaciones orientadas a mejorar los métodos diagnósticos disponibles, con el objetivo de lograr una identificación temprana y precisa de la anisakidosis (Nonković et al., 2025). Además, considerando que el conocimiento previo constituye un factor clave para reducir conductas de riesgo asociadas al consumo de productos marinos crudos (Ganucci-Cancellieri et al., 2023), resulta prioritario implementar campañas educativas dirigidas a la población general. Estas campañas deben enfocarse en la difusión de medidas preventivas sencillas pero eficaces, como la congelación del pescado destinado al consumo en crudo (Golden et al., 2022a). No obstante, es importante que dichas campañas se diseñen cuidadosamente para evitar generar pánico entre los consumidores, ya que esto podría tener un impacto negativo en la economía local y limitar el acceso a alimentos nutritivos (Bao et al., 2018). Sería especialmente recomendable llevarlas a cabo antes del periodo de Semana Santa (marzo-abril), cuando tradicionalmente se incrementa el consumo de pescado y mariscos.

En el futuro este estudio se debe extender más allá de Sinaloa y analizar con más detalle los datos demográficos. Esto permitiría detectar los segmentos de la población que estén en mayor riesgo.

CONCLUSIONES

El consumo frecuente de alimentos elaborados con pescado crudo o semicrudo, como ceviche, sushi y sashimi, es una práctica habitual entre los habitantes de Sinaloa. Este patrón alimentario, evidenciado en los resultados de la encuesta, coincide con el interés creciente por estos platillos observado durante las últimas dos décadas, según análisis de tendencias en Google Trends. Aunque la población encuestada presenta, en general, un nivel adecuado de conocimiento sobre los riesgos asociados al consumo de pescado y mariscos crudos o semicrudos, se identificó un desconocimiento específico respecto a aspectos relacionados con la transmisión de la anisakiasis y a la comprensión de medidas

preventivas clave. Esta carencia de información puntual, en un contexto de consumo frecuente de preparaciones potencialmente riesgosas, subraya la necesidad de desarrollar estrategias educativas dirigidas a sensibilizar a los consumidores sobre esta zoonosis emergente y a fomentar prácticas seguras en la manipulación y consumo de productos marinos.

Contribución de los autores

D.L.M.: conceptualización; metodología; análisis de datos; visualización y redacción de manuscrito. F.N.M.S.: metodología y revisión de manuscrito. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este documento.

Financiamiento

Este estudio no recibió apoyo financiero por parte de instituciones públicas o privadas.

Agradecimientos

Se agradece a la Secretaría de Innovación, Ciencia y Tecnología (SECIHTI) por la beca doctoral otorgada a Dania López Moreno.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Declaración de ética

Todos los participantes fueron adultos (mayores de 18 años) y su participación fue completamente voluntaria. El cuestionario fue anónimo y no se recopiló ninguna información que permitiera identificar a las personas encuestadas. Antes de iniciar, se les informó sobre los objetivos del estudio, y se asumió su consentimiento mediante la entrega del cuestionario contestado.

REFERENCIAS

- Bao M, Pierce GJ, Strachan NJC, Martínez C, Fernández R, Theodossiou I. 2018. Consumers' attitudes and willingness to pay for *Anisakis*-free fish in Spain. *Fisheries Research* 202, 149-160. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.06.018>
- Buchmann K, Mehrdana F. 2016. Effects of anisakid nematodes *Anisakis simplex* (s.l.), *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) and *Contracaecum osculatum* (s.l.) on fish and consumer health. *Food and Waterborne Parasitology* 4, 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.07.003>
- Caldeira AJR, Alves CPP, Santos MJ. 2021. *Anisakis* notification in fish: an assessment of the cases reported in the European Union rapid alert system for food and feed (RASFF) database. *Food Control* 124, 107913. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107913>
- Chai J-Y, Murrell KD, Lymbery AJ. 2005. Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. *International Journal for Parasitology* 35, 1233-1254. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.013>
- Chen J, Jayachandran M, Bai W, Xu B. 2022. A critical review on the health benefits of fish consumption and its bioactive constituents. *Food Chemistry* 369, 130874. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130874>
- Escobar G. 2020. Geohistoria del modelo alimenticio de Sinaloa: del maíz y la calabaza, al sushi y los mariscos. *Graffyllia, Revista de la Facultad de Filosofía y Letras*, 4(8), 35-59.
- Ganucci Cancellieri U, Amicone G, Cicero L, Milani A, Mosca O, Palomba M, Mattiucci S, Bonaiuto M. 2023. Can food safety practices and knowledge of raw fish promote perception of infection risk and safe consumption behavior intentions related to the zoonotic parasite *Anisakis*? *Sustainability*, 15(9), 7383. <https://doi.org/10.3390/su15097383>
- Garcia-Sanchez B, Masiá P, Garcia-Vazquez E, Ardura A, Dopico E. 2024. Detecting gaps in knowledge: the case of the *Anisakis* in Northwestern Spain. *Journal of Marine Science and Engineering*, 12(8), 1333. <https://doi.org/10.3390/jmse12081333>
- Golden O, Caldeira AJR, Santos MJ. 2022a. Raw fish consumption in Portugal: a survey on trends in consumption and consumer characteristics. *Food Control* 135, 108810. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108810>

- Golden O, Caldeira AJR, Rangel LF, Santos MJ. 2022b. Seafood safety and food-borne zoonoses from fish. *EFSA Journal* 2022; 20(S1): e200409. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.e200409>
- Gutiérrez M, Irigoitia M, Braicovich P, Lanfranchi, A, Canel D, Palomba M, Mattiucci S, Timi J. 2025. Genetic identification of zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) parasitizing the shortfin squid *Illex argentinus* under commercial exploitation in the Southwestern Atlantic Ocean. *International Journal of Food Microbiology*, 430, 111054. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.111054>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2020. Censo de Población y Vivienda 2020. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/programas/ccpv/2020/>
- Kassai T, Del Campillo M, Euzeby J, Gaafar S, Hiepe T, Himonas C. 1988. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Veterinary Parasitology*, 29(4), 299–326. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(88\)90148-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(88)90148-3)
- Khalili-Tilami S, Sampels S. 2018. Nutritional value of fish: lipids, proteins, vitamins, and minerals. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(2), 243–253. <https://doi.org/10.1080/23308249.2017.1399104>
- Koinari M, Karl S, Elliot A, Ryan U, Lymbery A. 2013. Identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) in marine fish hosts from Papua New Guinea. *Veterinary Parasitology*, 193(1-3), 126–133.
- Llarena-Reino M, Abollo E, Regueira M, Rodríguez H, Pascual S. 2015. Horizon scanning for management of emerging parasitic infections in fishery products. *Food Control* 49, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.005>
- Machuca Á, Alarcón J, Gallegos S. 2024. Conocimiento de anisakiasis en consumidores de pescado de la Región del Maule, Chile. *Revista chilena de infectología*, 41(6), 690–697. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182024000600159>
- Matias Y, Efron N, Shimshoni Y. 2009. On the predictability of Search Trends. Google Research. <https://research.google/blog/on-the-predictability-of-search-trends/>
- Mattiucci S, Nascetti G. 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host—parasite co-evolutionary processes. *Advances in parasitology*, 66, 47–148. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)00202-9](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00202-9)
- Nonković D, Tešić V, Šimat V, Karabuvu S, Medić A, Hrabar J. 2025. Anisakidae and anisakidosis: a public health perspective. *Pathogens*, 14, 217. <https://doi.org/10.3390/pathogens14030217>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2025. Promueve Agricultura consumo de pescados y mariscos con campaña “Sabores de Cuaresma” de Conapesca. Comunicado número 043/2025. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/promueve-agricultura-consumo-de-pescados-y-mariscos-con-campana-sabores-de-cuaresma-de-conapesca?idiom=es#:~:text=Ciudad%20de%20M%C3%A9xico%2C%2012%20de%20marzo%202025&text=%E2%80%99Tenemos%20una%20cifra%20aproximada%20de,su%20cuerpo%20sigue%20en%20formaci%C3%B3n>
- Shamsi S, Sheorey H. 2018. Seafood-borne parasitic diseases in Australia: are they rare or underdiagnosed?. *Internal medicine journal*, 48(5), 591–596. <https://doi.org/10.1111/imj.13786>
- Shamsi S. 2019. Seafood-borne parasitic diseases: a “One-Health” approach is needed. *Fishes*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.3390/fishes4010009>
- Shamsi S, Barton DP. 2023. A critical review of anisakidosis cases occurring globally. *Parasitology Research* 122, 1733–1745. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07881-9>
- Woo J, Owen AL. 2019. Forecasting private consumption with Google Trends data. *Journal of Forecasting* 38, 81–91. <https://doi.org/10.1002/for.2559>

Vigilancia genómica *in silico* de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana en cepas clínicas de *Salmonella enterica* aisladas en México

García-Aguirre Jesús Ignacio ¹, Soto-Gamboa Martín ², Garrido-Palazuelos Lennin Isaac ², Guerra-Meza Omar ³, Contreras-Soto María Belia ⁴, Aguirre-Sánchez José Roberto ⁴ ♦

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Mazatlán, Sinaloa.

² Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Departamento Académico de Ciencias de la Salud

³ Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Departamento Académico de Ciencias Naturales y Exactas

⁴ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Culiacán, Sinaloa.

♦ Correspondencia: jose.aguirre@ciad.mx

Área Temática:
Ciencias Biomédicas

Recibido: 03 de mayo 2025

Aceptado: 14 de julio 2025

Publicado: 18 de julio 2025

Cita: García-Aguirre JI, Soto-Gamboa M, Garrido-Palazuelos LI, Guerra-Meza O, Contreras-Soto MB y Aguirre-Sánchez JR- 2025. Vigilancia genómica *in silico* de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana en cepas clínicas de *Salmonella enterica* aisladas en México. Bioc Scientia 1(2): <https://doi.org/10.63622/RBS.2508>



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Resumen: *Salmonella enterica* es uno de los patógenos entéricos de mayor importancia a nivel global, debido a su capacidad para causar desde gastroenteritis hasta infecciones sistémicas graves. Esta problemática se agrava con la creciente aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos, lo que representa un reto para la salud pública. En este estudio, se emplearon herramientas bioinformáticas *in silico* para caracterizar el repertorio genético de cepas clínicas de *S. enterica* aisladas en México. Se analizaron 22 genomas cerrados disponibles en bases de datos públicas, a los cuales se les realizó confirmación taxonómica, serotipificación, anotación estructural de genes, identificación de factores de virulencia y determinantes de resistencia antimicrobiana, así como análisis filogenético. Los serotipos más prevalentes fueron Typhimurium, Newport y Enteritidis, siendo los dos primeros los que concentraron una mayor diversidad de genes asociados a resistencia y virulencia. Estos hallazgos ofrecen información relevante sobre la diversidad genómica y serotípica de *S. enterica* en el contexto clínico mexicano, y destacan el valor de las herramientas computacionales como estrategias eficaces para la vigilancia molecular de bacterias patógenas.

Palabras clave: *Salmonella*, genómica comparativa, epidemiología, bioinformática

Abstract: *Salmonella enterica* is one of the most relevant enteric pathogens worldwide due to its ability to cause diseases ranging from self-limiting gastroenteritis to severe systemic infections. This issue is further complicated by the increasing emergence of multidrug-resistant strains, posing a significant public health concern. In this study, *in silico* bioinformatics tools were employed to characterize the genetic repertoire of clinical *S. enterica* strains isolated in Mexico. A total of 22 closed genomes retrieved from public databases were analyzed. Taxonomic identity, serotype prediction, gene annotation, detection of virulence factors, and antimicrobial resistance determinants were performed, along with phylogenetic analysis. The most prevalent serotypes were Typhimurium, Newport, and Enteritidis, with the first two displaying a broader diversity of resistance and virulence-associated genes. These findings provide valuable insights into the genomic and serovar diversity of *S. enterica* in the Mexican clinical context and underscore the usefulness of computational approaches as efficient strategies for the molecular surveillance of pathogenic bacteria.

Keywords: *Salmonella*, comparative genomics, epidemiology, bioinformatics.

INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica continúa siendo uno de los principales patógenos entéricos de mayor prevalencia y relevancia a nivel mundial (EFSA, 2023; OMS, 2018). Este agente es causante de producir cuadros clínicos que van desde gastroenteritis hasta infecciones sistémicas graves. Es miembro de la familia Enterobacteriaceae y es capaz de colonizar una amplia gama de hospederos, entre los que se incluyen principalmente humanos y animales de sangre caliente (Wiedemann et al., 2015; Winfield y Groisman, 2003). Aunado a esto, se ha reportado que el género *Salmonella*, específicamente especie y subespecie *enterica* comprende más de 2,500 serotipos (Grimont et al., 2000). No obstante, también se ha observado que *S. enterica* puede sobrevivir en ambientes no hospedantes, como cuerpos acuáticos, sedimentos y superficies inertes (Aguirre-Sanchez et al., 2021). La transmisión de dicha bacteria se encuentra asociada a la ruta fecal-oral, mediante el consumo de alimentos o agua contaminada con heces fecales (Wray y Wray, 2000). Esto convierte a *Salmonella* en un agente productor de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

A nivel global, las infecciones causadas por *S. enterica* representan una carga significativa a los sistemas de salud pública, sobre todo en países subdesarrollados y en vías de desarrollo, como es el caso de México. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se producen millones de casos de salmonelosis, ocasionando hospitalizaciones e inclusive muertes, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, niños y mujeres embarazadas (CDC, 2023; WHO, 2018). En México, datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reporta casos recurrentes por *Salmonella*. Sin embargo, debido a que el número de casos reportado se basa en el cuadro clínico y no en la identificación puntual del agente etiológico, estos datos pueden subestimar su verdadera incidencia (Contreras-Soto et al., 2018). Esto resalta la necesidad de investigaciones que permitan una comprensión más detallada de factores asociados a la persistencia y patogenicidad de *S. enterica*.

En los últimos años, la emergencia y diseminación de cepas multirresistentes a antibióticos (MDR), se ha convertido en una de las principales problemáticas a nivel mundial (Billah y Rahman, 2024; Eng et al., 2015; Hur et al., 2012). Esta situación compromete la eficacia del tratamiento basado en el uso de antimicrobianos, aumentando así la mortalidad y duración de hospitalización en pacientes afectados. Este auge en la resistencia, no solo es consecuencia de su uso excesivo en la medicina humana, sino también en la aplicación dentro del área agropecuaria y producción de alimentos, favoreciendo la propagación de genes de resistencia.

Además de la resistencia exhibida por *S. enterica* (Garza-González et al., 2019; Granados et al., 2023; Reynoso et al., 2024), esta posee una amplia gama de factores de virulencia que le permiten invadir células epiteliales y evadir la respuesta inmune. Estos factores incluyen sistemas de secreción tipo III (T3SS), genes asociados a motilidad, invasión y persistencia (Ibarra y Steele-Mortimer, 2009; Marcus et al., 2000). La combinación de la resistencia a antibióticos y marcadores de viru-

lencia convierte a *S. enterica* en un microorganismo de importancia epidemiológica. En México, se ha identificado la presencia de más de 100 serotipos, siendo Enteritidis, Typhimurium, Anatum, Agona y Meleagridis, los cinco serotipos más prevalentes (Zaidi et al., 2008). Estos han sido aislados y asociados a muestras de origen ambiental, alimentos, clínicos y animales (Contreras-Soto et al., 2018).

En este contexto, los estudios basados en genómica comparativa mediante una aproximación *in silico* resultan fundamentales para comprender e identificar el repertorio genómico de las cepas de *S. enterica* circulantes en México (Gahlawat et al., 2023). Por ello, el presente estudio tiene como objetivo explorar y describir las características genómicas asociadas a la virulencia y resistencia antimicrobiana de cepas de *S. enterica* aisladas de muestras clínicas en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se descargaron los 22 genomas disponibles de *S. enterica* de origen clínico correspondientes a México del repositorio del National Center for Biotechnology Information (NCBI), específicamente del portal Pathogen Detection a marzo del 2025 (Cuadro Suplementario 1). El número de genomas respondió a la limitante en disponibilidad en base de datos públicas. El presente estudio se centró en aislados de origen clínico, ya que representan una fuente crítica para la vigilancia epidemiológica y el análisis de factores de virulencia y resistencia a antibióticos en el contexto de salud pública. Para verificar su identidad taxonómica, se realizó la tipificación multilocus por secuencias (MLST) empleando la base de datos pública de tipificación molecular PubMLST (Jolley et al., 2018), la cual se basa en comparar los alelos de los genes *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *purE*, *sucA* y *thrA*. Una vez confirmada la clasificación taxonómica, los serotipos de *S. enterica* fueron determinados mediante la versión para línea de comandos del programa *Salmonella In Silico* Typing Resource (SISTR) (Yoshida et al., 2016). Este programa predice los serotipos mediante secuencias alélicas y del coreMLST usando el algoritmo de BLAST.

La anotación estructural y funcional de los genes asociados a resistencia antimicrobiana y factores de virulencia se llevó a cabo utilizando el programa ABRicate, con las bases de datos Resfinder (Bortolaia et al., 2020) y VFDB (Liu et al., 2019), respectivamente. ABRicate es una herramienta para la detección de genes de interés de un genoma mediante su comparación con distintas bases de datos, según el objetivo. Para el análisis se establecieron como criterios de inclusión una identidad mínima del 90% y una cobertura de alineamiento del 85%.

Con el fin de inferir las relaciones filogenéticas entre los aislados, se construyó un árbol filogenético mediante el método de máxima verosimilitud (ML), basado en el alineamiento del genoma core realizado con el programa Parsnp seleccionando una referencia al azar. La visualización del alineamiento fue llevada a cabo con Gingr, y posteriormente, el alineamiento se convirtió en un archivo Multi-FASTA utilizando Harvesttools (Treangen et al., 2014). El árbol filogenético fue

generado mediante RAxML (Stamatakis, 2014), empleando un modelo de sustitución nucleotídica GTRGAMMA y un soporte estadístico de 100 réplicas bootstrap. Finalmente, la visualización y edición del árbol se realizó utilizando la herramienta Interactive Tree of Life (iTOL) (Letunic y Bork, 2019).

RESULTADOS

Del análisis de los 22 genomas cerrados de aislados clínicos de *S. enterica* reportados para México, se identificaron cinco serotipos distintos (Figura 1). El serotipo más prevalente fue Typhimurium (14/22), seguido por Newport (4/22), Enteritidis (2/22), Typhi (1/22) y Heidelberg (1/22). Estos serotipos estuvieron distribuidos en ocho tipos de secuencia (ST), siendo el ST19 (8/22) y ST213 (4/22) los más frecuentes, ambos asociados al serotipo Typhimurium.

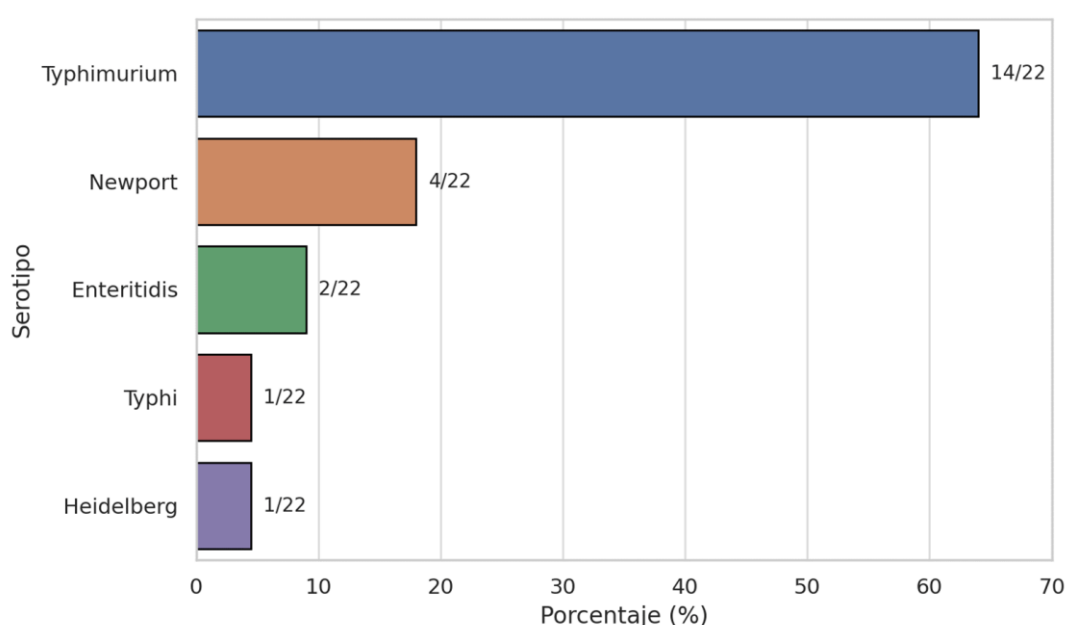


Figura 1. Frecuencia de los serotipos encontrados en los genomas clínicos.

La reconstrucción filogenética basada en el genoma core permitió identificar agrupamientos definidos correspondientes a cada serotipo detectado (Figura 2). Las principales bifurcaciones del árbol filogenético mostraron valores superiores a 85 bootstrap, lo cual respalda la robustez y confiabilidad de la topología obtenida. Esta diferenciación filogenética resalta la diversidad genética existente entre los serotipos circulantes en México.

Respecto al perfil de resistencia a antibióticos (Figura 2), se identificó la presencia de entre 1 y 13 genes por aislado, evidenciado alta variabilidad. Los serotipos Typhimurium y Newport presentaron el mayor número de genes relacionados con resistencia. Sin embargo, es importante señalar, que del total de los 14 genomas de Typhimurium, solo se logró identificar este repertorio genético en 6 genomas.

Por su parte, en el serotipo Newport, los 4 genomas analizados presentaron un repertorio genético de entre 8 y 9 genes. De forma interesante, se identificó que el único genoma perteneciente al serotipo Heidelberg, presentó 13 genes. Cabe destacar que el gen *aac(6')-laa*, relacionado con resistencia a aminoglucósidos, fue identificado en el 100% de los genomas analizados. Mismo gen que fue identificado como exclusivo en los serotipos Typhi y Enteritidis. En particular, los aislados del serotipo Typhimurium presentaron un repertorio multirresistente que incluyó los genes *aph(3')-lb*, *aph(6)-lb*, *blaCMY-2*, *floR*, *sul2* y *tet(A)*, confiriendo resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos, fenicoles, sulfonamidas y tetraciclinas, respectivamente.

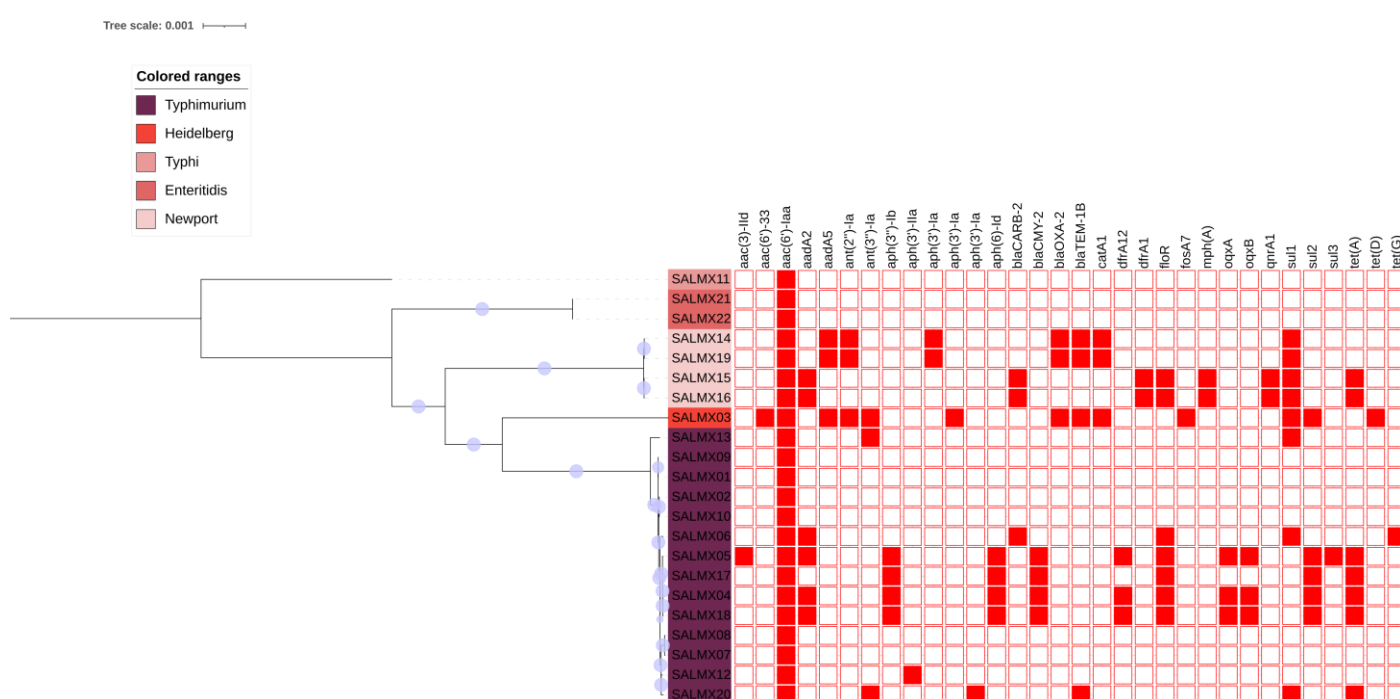


Figura 2. Árbol filogenético acoplado a la presencia/ausencia de genes de resistencia a antibióticos. Los serotipos de indican mediante el sombreado de las leyendas. En el panel lateral, el color rojo indica presencia mientras que el blanco ausencia. Se indica en los nodos mediante círculo azul un soporte estadístico mayor de 90 bootstrap.

En relación con los determinantes de virulencia, todos los genomas presentaron un amplio conjunto de genes. En la Figura 3 se ilustran aquellos genes cuya presencia fue variable entre los diferentes genomas. Sin embargo, la Tabla Suplementaria 2, enlista el repertorio total de los genes identificados. A diferencia del patrón observado en la resistencia, los genes de virulencia mostraron una distribución más conservada, consistente con las funciones esenciales para el mecanismo de patogenicidad característico de *S. enterica*. En este sentido, se identificaron genes relacionados con adhesión y formación de biopelículas. Los cuales resultan esenciales en el proceso de colonización al permitirles adherirse a las superficies. También se logró identificar genes asociados al sistema de secreción tipo III (T3SS), indispensables para formar el complejo del inyectosoma contribuyendo a la translocación

de proteínas a células del huésped, favoreciendo su invasión. Otro elemento importante que se detectó fue el complejo asociado a la captación de hierro y magnesio, necesario para la supervivencia de *S. enterica* bajo condiciones limitantes de estos iones y exposición a estrés oxidativo. Así mismo, se identificaron genes relacionados con la evasión de la respuesta inmune, confiriéndole mecanismos como evasión de fagocitosis, modulación de la respuesta inflamatoria (genes *sopABE*) y la regulación del sistema PhoP/PhoQ, indispensable para la activación de genes para la supervivencia de este patógeno, los cuales se detectaron en el 100% de los genomas.

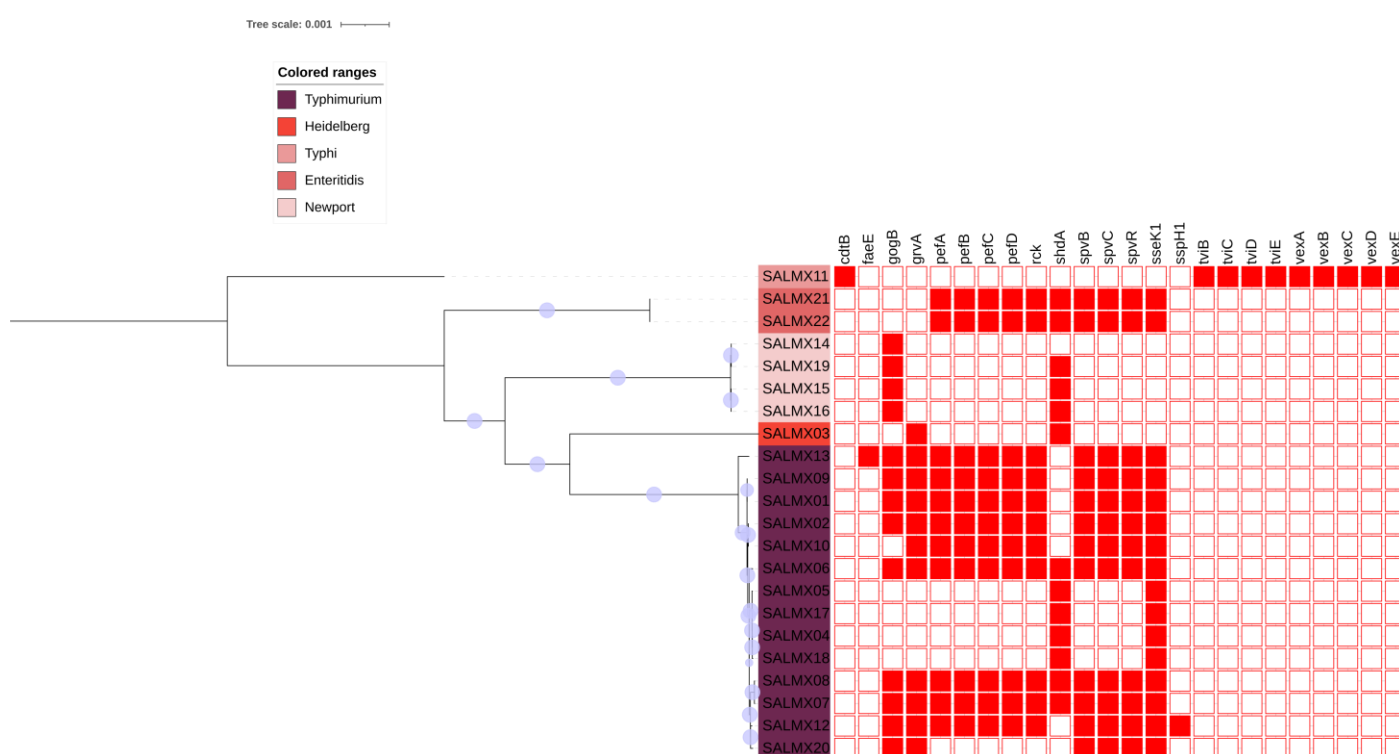


Figura 3. Árbol filogenético acoplado a la presencia/ausencia de genes de virulencia. Los serotipos de indican mediante el sombreado de las leyendas. En el panel lateral, el color rojo indica presencia mientras que el blanco ausencia. Se indica en los nodos mediante círculo azul un soporte estadístico mayor de 90 bootstrap.

Nuevamente, el serotipo Typhimurium destacó por contener el mayor número de genes de virulencia (9/14). En estos aislados se caracterizaron genes como *pefA-D*, *spvA-C*, *grvA* y *sseK1*, involucrados en la codificación de fimbrias mediadas por plásmidos y efectores del T3SS. El contar con estos elementos adicionales, podría representar un recurso importante para lograr de forma satisfactoria la colonización e invasión de *S. enterica* en el hospedero. De forma notable, el único genoma del serotipo Typhi presentó los cassettes *tvfB-E* y *vexA-E* exclusivos de este serotipo, los cuales participan en la síntesis del antígeno Vi y la modulación de la respuesta

inmunológica, respectivamente. En contraste, los genomas de Newport y Heidelberg fueron los serotipos en los que se identificaron un menor número de marcadores.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio aportan evidencia relevante sobre la diversidad genómica en término de serotipos y el potencial patogénico de cepas de *S. enterica* aisladas de casos clínicos de humanos en México. Esto destaca su relevancia como un patógeno prioritario para la salud pública. La alta prevalencia del serotipo Typhimurium (64%) coincide con lo reportado en estudios mexicanos, así como con estudios globales enfocados en la identificación molecular de los aislados, donde este serotipo es reconocido por su amplia distribución y asociación con brotes de ETA (Gutiérrez-Cogco et al., 2000; Quiroz-Santiago et al., 2009). La identificación de otros serotipos clínicamente importantes como Newport, Enteritidis y Typhi resalta la diversidad de cepas circulantes en el país, representando un reto para la vigilancia epidemiológica. Cabe destacar, que dichos serotipos coinciden con lo reportado en otras investigaciones (Contreras-Soto et al., 2018; Gómez-Baltazar et al., 2023).

Uno de los hallazgos más relevantes fue el alto contenido genético de genes de resistencia a antibióticos detectados en los aislados clínicos. La presencia de genes tales como *aac(6')-Iaa*, junto con otros como *blaCMY-2*, *sul2*, *tet(A)* y *floR* en cepas de Typhimurium, indica una amplia distribución de determinantes de resistencia. Es importante destacar que no se identificaron genes de resistencia a antibióticos de uso frecuente en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones por *S. enterica*, como ceftriaxona, azitromicina, ciprofloxacino y ampicilina. No obstante, se identificaron determinantes genéticos asociados a resistencia a antibióticos como aminoglucósidos, betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas. En este sentido, aunque en los genomas de este estudio no se hayan podido identificar genes asociados a fármacos de primera línea, hay reportes que indican la alta prevalencia genotípica/fenotípica a dichos antibióticos tanto en México como en otras partes del mundo (Zaidi et al., 2006; Perez-Montano et al., 2012; Nayarit-Ballesteros et al., 2016; Plawinska-Czarnak et al., 2022; Barrera et al., 2023; Campos-Granados et al., 2023). La presencia de resistencia a múltiples clases de antibióticos plantea la necesidad de mantener una vigilancia genómica constante (Alcaine et al., 2007; Punchihewage-Don et al., 2024).

Esta situación es particularmente alarmante dada la limitante en las opciones terapéuticas, pudiéndose traducir en hospitalizaciones prolongadas y aumento en la mortalidad, especialmente en pacientes vulnerables (CDC, 2019; Organization, 2015). Estos resultados son coherentes con lo reportado por la OMS, que señala a *Salmonella* como un patógeno prioritario por su capacidad para adquirir y diseminar resistencia a antibióticos.

Por otra parte, se observó un patrón heterogéneo en la distribución de genes de resistencia entre los distintos serotipos, siendo nuevamente Typhimurium y Newport los más representativos. Este fenómeno puede deberse a la adquisición horizontal de elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones y transposones, los cuales han sido documentados ampliamente en estos serotipos y como un mecanismo importante en la evolución y adaptación a nuevos nichos de *Salmonella* (Selander et al., 1996; Villa et al., 2019; Worley et al., 2018).

En cuanto a los determinantes de virulencia, se identificó un repertorio conservado de genes esenciales para el establecimiento y mantenimiento de la infección, lo cual es consistente con lo reportado para cepas patógenas de *S. enterica* (Johnson et al., 2018; Kortman et al., 2012; Lostroh & Lee, 2001). Estos marcadores incluyen genes asociados a la adhesión a células epiteliales y formación de biopeículas, como *fim* y *csg*, que codifican fimbrias curli, permitiendo la colonización inicial en el epitelio intestinal y persistencia bacteriana en el hospedero (Perry y Tan, 2023; Steenackers et al., 2012).

Un componente clave del proceso patogénico es el ensamblaje del T3SS, codificado por las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2. Este sistema actúa como una “jeringa molecular” que inyecta efectores bacterianos directamente al citoplasma de las células del hospedero. Esto facilita la invasión celular, así como la supervivencia intracelular (Coburn et al., 2007; Green & Mecsas, 2016). Además, se identificaron genes involucrados en la captura de metales, como *sitABCD* y *iroN*, que permiten la adquisición de manganeso y hierro, respectivamente, en condiciones limitantes de nutrientes (Cherayil, 2011).

Así mismo, se detectaron genes relacionados con la evasión del sistema inmune, incluyendo aquellos que modifican la estructura del lipopolisacárido o que inhiben la activación del inflammasoma, contribuyendo a la persistencia del patógeno en el hospedero. En conjunto, forman una red que ha sido reportada como indispensable para el desarrollo de la infección en animales y humanos (Haraga et al., 2008; Ilyas et al., 2017). Cabe destacar los genomas analizados en estudio, presentaron un repertorio completo de genes asociados a dichas funciones. Entre los más importantes destacan *rpoS*, *phoPQ* y *ssrAB*.

El hallazgo de genes de virulencia asociados a plásmidos como *spvA-C* y *pefA-D* en aislados de Typhimurium también es indicativo de una mayor capacidad para causar infecciones sistémicas, lo cual ha sido documentado en cepas responsables de cuadros clínicos graves (Dos Santos et al., 2019; Zhang et al., 2003). Esta combinación de multirresistencia y factores de virulencia plantea un escenario complejo que amerita una respuesta integradora desde la vigilancia genómica, el control sanitario de alimentos y el uso responsable de antibióticos tanto en humanos como en el sector agropecuario (VT Nair et al., 2018).

A nivel metodológico, el uso de herramientas bioinformáticas *in silico* para la caracterización genómica demostró ser una estrategia robusta, rápida y eficiente para la vigilancia molecular de patógenos (Ferrari et al., 2017), complementando

la limitada infraestructura diagnóstica disponible en muchas regiones de México. Sin embargo, es importante señalar que el análisis se basó únicamente en genomas disponibles en bases de datos públicas, lo cual puede introducir sesgos en cuanto a la representatividad geográfica y temporal.

En este sentido, futuras investigaciones deben incorporar un mayor número de aislados recientes, incluyendo fuentes alimentarias y ambientales, así como realizar estudios funcionales y experimentales que validen la expresión y actividad de los genes identificados. Asimismo, es fundamental fomentar el fortalecimiento de los sistemas de vigilancia genómica y la creación de consorcios nacionales para el monitoreo continuo de la resistencia antimicrobiana en patógenos prioritarios como *S. enterica*.

CONCLUSIONES

Salmonella enterica sigue siendo una de las principales bacterias patógenas con mayor prevalencia en México y en el mundo, responsable de causar enfermedades gastrointestinales y otros. A pesar de la baja disponibilidad de genomas cerrados y de origen clínico humano en repositorios públicos de datos como NCBI, se pudo identificar marcadores de resistencia a antibióticos y de virulencia. El presente trabajo revela una marcada predominancia del serotipo Typhimurium, el cual representó el 64% del total de los genomas analizados. Este serotipo no solo se distinguió por su prevalencia, sino por su asociación a una mayor carga genética relacionada a factores de virulencia y resistencia, lo que refuerza su papel como uno de los principales agentes etiológicos en infecciones entéricas. Así mismo, la detección de otros serotipos clínicamente relevantes como Newport, Enteritidis, Typhi y Heidelberg pone en evidencia la diversidad de cepas circulantes en el país. Estos hallazgos suponen un riesgo importante a la salud pública, ya que los aislados cuenta con los genes necesarios para poder invadir, colonizar y llevar a cabo un proceso de patogénesis en los hospederos. Esta situación se agrava debido a la multiresistencia exhibida, lo que podría complicar su tratamiento. Finalmente, exhortamos a la comunidad científica a realizar secuenciación y enriquecer la información disponible para México, con la finalidad de realizar vigilancia epidemiológica oportuna.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que la investigación se llevó a cabo sin ninguna relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como posible conflicto de intereses.

Financiamiento

Este estudio no recibió financiamiento de ninguna organización pública o privada.

Contribución de los autores

JIGA: ejecución del experimento y preparación del manuscrito. MSG: ejecución del experimento. LIGP: Análisis e interpretación de los datos, edición y revisión. OGM: Diseño del experimento, edición y revisión. MBCS: preparación del manuscrito, aprobación de la versión final del manuscrito. JRAS: conceptualización del estudio, preparación del manuscrito y aprobación de la versión final del manuscrito.

REFERENCIAS

- Aguirre-Sanchez, J. R., Ibarra-Rodriguez, J. R., Vega-Lopez, I. F., Martínez-Urtaza, J., & Chaidez-Quiroz, C. (2021). Genomic signatures of adaptation to natural settings in non-typhoidal *Salmonella enterica* Serovars Saintpaul, Thompson and Weltevreden. *Infection, Genetics and Evolution*, 90, 104771.
- Alcaine, S. D., Warnick, L. D., & Wiedmann, M. (2007). Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, 70(3), 780–790.
- Barrera, S., Vázquez-Flores, S., Needle, D., Rodríguez-Medina, N., Iglesias, D., Seigny, J. L., Gordon, L. M., Simpson, S., Thomas, W. K., & Rodulfo, H. (2023). Serovars, virulence and antimicrobial resistance genes of non-typhoidal *Salmonella* strains from dairy systems in Mexico. *Antibiotics*, 12(12), 1662.
- Billah, M. M., & Rahman, M. S. (2024). *Salmonella* in the environment: A review on ecology, antimicrobial resistance, seafood contaminations, and human health implications. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 100407.
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., & Florensa, A. F. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500.
- Campos-Granados, C. M., Sierra Gómez Pedroso, L. del C., Hernández-Pérez, C. F., Ballesteros-Nova, N. E., Rubio-Lozano, M. S., Sánchez-Zamorano, L. M., & Delgado-Suárez, E. J. (2023). Fuertes perfiles de resistencia a antibióticos en *Salmonella* spp. aislada de carne de res molida en el centro de México. *Veterinaria México OA*, 10.
- CDC. (2023). *Salmonella Homepage*. <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
- CDC, A. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. *US Department of Health and Human Services: Washington, DC, USA*, 1, 67–100.
- Cherayil, B. J. (2011). The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunologic Research*, 50(1), 1–9.
- Coburn, B., Sekirov, I., & Finlay, B. B. (2007). Type III secretion systems and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 535–549.
- Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Chaidez, C., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., & Castro-del Campo, N. (2018). Los últimos 50 años de *Salmonella* en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. *Revista Bio Ciencias*, 6, 26.
- Dos Santos, A. M. P., Ferrari, R. G., & Conte-Junior, C. A. (2019). Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. *Current Microbiology*, 76(6), 762–773.

- EFSA. (2023, May 26). *Salmonella*. <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/salmonella>
- Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293.
- Ferrari, R. G., Panzenhagen, P. H. N., & Conte-Junior, C. A. (2017). Phenotypic and genotypic eligible methods for Salmonella Typhimurium source tracking. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2587.
- Gahlawat, A., Varma, T., Kamble, P., Banerjee, A., Sandhu, H., & Garg, P. (2023). Bioinformatics: Theory and Applications. In *The Quintessence of Basic and Clinical Research and Scientific Publishing* (pp. 539–555). Springer.
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., & Arroyo-Escalante, S. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *Plos One*, 14(3), e0209865.
- Gómez-Baltazar, A., Godínez-Oviedo, A., Vázquez-Marrufo, G., Vázquez-Garcidueñas, M. S., & Hernández-Iturriaga, M. (2023). Genomic analysis of the MLST population structure and antimicrobial resistance genes associated with Salmonella enterica in Mexico. *Genome*.
- Granados, C. C., Pedroso, L. del C. S. G., Pérez, C. F. H., Nova, N. E. B., Lozano, M. S. R., Zamorano, L. M. S., & Suárez, E. D. (2023). Strong antibiotic resistance profiles in Salmonella spp. isolated from ground beef in Central Mexico. *Veterinaria México*, 10(1), 23.
- Green, E. R., & Meccas, J. (2016). Bacterial secretion systems: an overview. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 213–239.
- Grimont, P. A. D., Grimont, F., & Bouvet, P. (2000). *Taxonomy of the genus Salmonella*.
- Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., & González-Andrade, M. del C. (2000). Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México*, 42, 490–495.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53–66.
- Hur, J., Jawale, C., & Lee, J. H. (2012). Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review. *Food Research International*, 45(2), 819–830.
- Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O. (2009). Salmonella—the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular Microbiology*, 11(11), 1579–1586.
- Ilyas, B., Tsai, C. N., & Coombes, B. K. (2017). Evolution of Salmonella-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 428.
- Johnson, R., Mylona, E., & Frankel, G. (2018). Typhoidal Salmonella: Distinctive virulence factors and pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 20(9), e12939.
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3.
- Kortman, G. A. M., Boleij, A., Swinkels, D. W., & Tjalsma, H. (2012). Iron availability increases the pathogenic potential of Salmonella typhimurium and other enteric pathogens at the intestinal epithelial interface. *PloS One*, 7(1), e29968.
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D687–D692.
- Lostroh, C. P., & Lee, C. A. (2001). The Salmonella pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes and Infection*, 3(14–15), 1281–1291.

- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., & Finlay, B. B. (2000). Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, 2(2), 145–156.
- Nayarit-Ballesteros, N., Rubio-Lozano, M. S., Delgado-Suárez, E., Méndez-Medina, D., Braña-Varela, D., & Rodas-Suárez, O. (2016). Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de Salmonella spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. *Salud Pública de México*, 58, 371–377.
- OMS. (2018, February 20). *Salmonella (no tifoidea)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Organization, W. H. (2015). *Antibiotic resistance: multi-country public awareness survey*. World Health Organization.
- Perez-Montano, J. A., Gonzalez-Aguilar, D., Barba, J., Pacheco-Gallardo, C., Campos-Bravo, C. A., Garcia, S., Heredia, N. L., & Cabrera-Diaz, E. (2012). Frequency and antimicrobial resistance of Salmonella serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. *Journal of Food Protection*, 75(5), 867–873.
- Perry, E. K., & Tan, M.-W. (2023). Bacterial biofilms in the human body: Prevalence and impacts on health and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1237164.
- Plawińska-Czarnak, J., Wódz, K., Kizerwetter-Świda, M., Bogdan, J., Kwieciński, P., Nowak, T., Strzałkowska, Z., & Anusz, K. (2022). Multi-drug resistance to Salmonella spp. when isolated from raw meat products. *Antibiotics*, 11(7), 876.
- Punchihewage-Don, A. J., Ranaweera, P. N., & Parveen, S. (2024). Defense mechanisms of Salmonella against antibiotics: a review. *Frontiers in Antibiotics*, 3, 1448796.
- Quiroz-Santiago, C., Rodas-Suárez, O. R., Fernández, F. J., Quiñones-Ramírez, E. I., & Vázquez-Salinas, C. (2009). Prevalence of Salmonella in vegetables from Mexico. *Journal of Food Protection*, 72(6), 1279–1282.
- Reynoso, E. C., Delgado-Suárez, E. J., Hernández-Pérez, C. F., Chavarin-Pineda, Y., Godoy-Lozano, E. E., Fierros-Zárate, G., Aguilar-Vera, O. A., Castillo-Ramírez, S., Gómez-Pedroso, L. del C. S., & Sánchez-Zamorano, L. M. (2024). Geography, Antimicrobial Resistance, and Genomics of Salmonella enterica (Serotypes Newport and Anatum) from Meat in Mexico (2021–2023). *Microorganisms*, 12(12), 2485.
- Selander, R. K., Li, J., & Nelson, K. (1996). Evolutionary genetics of Salmonella enterica. *Escherichia Coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2, 2691–2707.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2012). Salmonella biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 502–531.
- Treangen, T. J., Ondov, B. D., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2014). The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biology*, 15(11), 524.
- Villa, T. G., Feijoo-Siota, L., Rama, J. L. R., Sánchez-Pérez, A., & Viñas, M. (2019). Horizontal Gene Transfer Between Bacteriophages and Bacteria: Antibiotic Resistances and Toxin Production. In *Horizontal Gene Transfer* (pp. 97–142). Springer.
- VT Nair, D., Venkitanarayanan, K., & Kollanoor Johny, A. (2018). Antibiotic-resistant Salmonella in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. *Foods*, 7(10), 167.
- WHO. (2018, February 20). *Salmonella (non-typhoidal)*.
- Wiedemann, A., Virlogeux-Payant, I., Chaussé, A.-M., Schikora, A., & Velge, P. (2015). Interactions of Salmonella with animals and plants. *Frontiers in Microbiology*, 5, 791.
- Winfield, M. D., & Groisman, E. A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of Salmonella and Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(7), 3687–3694.

- Worley, J., Meng, J., Allard, M. W., Brown, E. W., & Timme, R. E. (2018). *Salmonella enterica* phylogeny based on whole-genome sequencing reveals two new clades and novel patterns of horizontally acquired genetic elements. *MBio*, 9(6), 10–1128.
- Wray, C., & Wray, A. (2000). *Salmonella in domestic animals*. Cabi.
- Yoshida, C. E., Kruczkiewicz, P., Laing, C. R., Lingohr, E. J., Gannon, V. P. J., Nash, J. H. E., & Taboada, E. N. (2016). The *Salmonella* in silico typing resource (SISTR): an open web-accessible tool for rapidly typing and subtyping draft *Salmonella* genome assemblies. *PloS One*, 11(1), e0147101.
- Zaidi, M. B., Calva, J. J., Estrada-Garcia, M. T., Leon, V., Vazquez, G., Figueroa, G., Lopez, E., Contreras, J., Abbott, J., & Zhao, S. (2008). Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 429.
- Zaidi, M. B., McDermott, P. F., Fedorka-Cray, P., Leon, V., Canche, C., Hubert, S. K., Abbott, J., León, M., Zhao, S., & Headrick, M. (2006). Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw
- Zhang, S., Kingsley, R. A., Santos, R. L., Andrews-Polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsolis, R. M., Adams, L. G., & Bäumlér, A. J. (2003). Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infection and Immunity*, 71(1), 1–12.

Molecular docking, dynamic simulations, and network pharmacology approach to explore the therapeutic potential of *Zanthoxylum armatum* phytochemicals against Malaria

Khan Hamna ¹, Bibi Ayesha ¹, Amber Sanila ¹, Mukhtar Mamuna ², Ahmad Nouman ¹, Khan Haris Ahmed ¹

¹ Department of Biotechnology, University of Mianwali, Mianwali, Punjab 42200, Pakistan.

² Atta-ur-Rahman School of Applied Biosciences, National University of Sciences and Technology (NUST), H-12. 44000 Islamabad, Pakistan.

♦Corresponding author: hakhan@umw.edu.pk

Subject Area:
Biomedical Sciences

Received: May 02, 2025
Accepted: July 10, 2025
Published: July 24, 2025

Citation: Khan H, Bibi A, Amber S, Mukhtar M, Ahmad N, and Khan HA. 2025. Molecular docking, dynamic simulations, and network pharmacology approach to explore the therapeutic potential of *Zanthoxylum armatum* phytochemicals against Malaria. *Bioc Scientia* 1(2). <https://doi.org/10.63622/RBS.2507>



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Malaria continues to be a global health challenge mainly due to drug resistance that necessitates the innovative approaches in pharmaceutical development. Therefore, in the present study, we investigated the therapeutic potential of natural plant-based phytochemicals from *Zanthoxylum armatum* against malaria. Based on pharmacokinetic and ADMET properties analysis, a total of 40 compounds were identified, and these were analyzed and screened in accordance with Lipinski rule of five. The Molecular docking, dynamic simulations, and network pharmacology approach was used to validate the role of selected phytochemicals against malarial target proteins such as PfAMA-1, Pf GST, and PfDHFR. Molecular docking experiments revealed the strong interactions of the three phytochemicals: Cuminal, Sabinene, and Phellandral with the key malarial targets. Molecular dynamic (MD) simulations further confirmed the stability and flexibility of these docked complexes. Furthermore, the network pharmacology analysis identified 23 common targets of these three active phytochemicals and malaria, some of these protein targets include ALB, CXCL8, NOS2, HMOX1, MPO, TNF, IL6, and PTPRC. These proteins are mainly involved in inflammatory response and oxidative stress, the key mechanisms involved in malarial infection, so regulating these targets may prove beneficial in treating *Plasmodium falciparum*-induced malaria. These findings provide strong basis for further *in-vitro* and *in-vivo* studies to validate the role of Cuminal, Sabinene, and Phellandral as substantial drug candidates against malaria.

Keywords: Malaria, *Zanthoxylum armatum*, *Plasmodium falciparum*, Molecular docking, MD simulations, Network pharmacology.

Resumen: La malaria sigue siendo un desafío de salud global principalmente debido al aumento de la resistencia a los medicamentos existentes, lo que resalta la necesidad de enfoques innovadores en el desarrollo de fármacos. Por lo tanto, el presente estudio investiga el potencial terapéutico de los fitoquímicos de origen vegetal de *Zanthoxylum armatum* como agentes antipalúdicos. Basado en el análisis de propiedades farmacocinéticas y ADMET, se identificaron y evaluaron un total de 40 compuestos de acuerdo con la regla de cinco de Lipinski. Se utilizó el acoplamiento molecular, las simulaciones dinámicas y el enfoque de farmacología de red para validar el papel de los fitoquímicos seleccionados contra proteínas diana del paludismo como PfAMA-1, Pf GST y PfDHFR. Los experimentos de acoplamiento molecular revelaron las fuertes interacciones de los tres fitoquímicos; Cuminal, sabineno y phelantral con los objetivos clave de la malaria. Las simulaciones de dinámica molecular (MD) confirmaron además la estabilidad y flexibilidad de estos complejos acoplados. Además, el análisis de farmacología de redes identificó 23 objetivos comunes de estos tres fitocompuestos activos y la malaria, algunos de estos objetivos proteicos incluyen ALB, CXCL8, NOS2, HMOX1, MPO, TNF, IL6 y PTPRC. Estas proteínas están principalmente involucradas en la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo, los mecanismos clave involucrados en la infección por malaria, por lo que regular estos objetivos puede resultar beneficioso en el tratamiento de la malaria inducida por *Plasmodium falciparum*. Estos hallazgos proporcionan una base sólida para estudios adicionales *in vitro* e *in vivo* que validen el papel del Cuminal, sabineno y phelantral como candidatos a fármacos sustanciales contra la malaria.

Palabras clave: Malaria, *Zanthoxylum armatum*, *Plasmodium falciparum*, Acoplamiento molecular, Simulación de dinámica molecular, Farmacología de red.

INTRODUCTION

Malaria affects 219 million people worldwide, leading to 435,000 deaths annually (Citaristi, 2022). The highest number of malarial cases has been reported in Africa and certain Asian countries and the prevalence of the disease is increasing since 2015 (PAH, 2017a; PAH, 2017b; Basu and Sahi, 2017). *Plasmodium*, the causative agent of malaria, affects humans and accumulates malarial pigment in the form of an insoluble haemoglobin metabolite (Miller *et al.*, 1994; Phillips y Pasvol, 1992). These parasites can be found in various vertebrates, including red blood cells and human tissues. The deadliest and highly pathogenic form of *Plasmodium* is known as *Plasmodium falciparum* which causes malaria in humans (Prugnolle *et al.*, 2011; Daxon, 2019; Ogony, 2021). The main symptoms include chills, fever, and headaches and these symptoms arise primarily due to the destruction of erythrocytes (Tahita *et al.*, 2013; Greenwood, 2019; Fikadu and Ashenafi, 2023).

The mortality rate due to malaria has decreased due to the increased antimalarial drugs that is now safe, efficient, and cost-effective (Warrel *et al.*, 2017). Drugs mainly include quinine, chloroquine, pyrimethamine, sulfonamides, sulfones, and artemisinin derivatives. Two of the commonly used drugs artesunate and sulfadoxine mainly perform their antimalarial action via inhibiting protozoal glutathione S-transferase (GST) and dihydrofolate reductase (DHFR). However, the malaria parasite rapidly modifies itself, thus causing antimicrobial resistance and difficulties in the development of efficient vaccines and drugs (Narwal *et al.*, 2024). Therefore, scientists are striving hard to develop alternative, safer and more cost-effective treatment options against malaria.

Plant-based compounds such as flavonoids, terpenoids, alkaloids, tannins, steroids, resins, phenolic compounds, and other metabolites are frequently used in research related to drug development due to their antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, and anticancer properties (Guadie *et al.*, 2020; Malami *et al.*, 2022). *Zanthoxylum armatum* DC., also known as Indian prickly ash or Nepal pepper, belongs to the Rutaceae family (Sharma *et al.*, 2021). The species typically inhabits valleys and thickets mountains, wastelands, and forests. In traditional systems of medical treatment, *Z. armatum* tree bark, fruits, and seeds were widely used as carminatives, stomach, and anthelmintics, and the dried fruit served as a spice (Barkatullah *et al.*, 2014). Fruit and seeds were also used to treat dyspepsia and fever with an aromatic tonic useful for dental problems, and their ointment is used to treat infestations (Iqbal and Hamayun, 2004). The extract of *Z. armatum* has effective anti-skin sensitivity, loculicidal, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities (Peana *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2008).

Therefore, the present study has been conducted to assess the inhibitory capabilities of 40 phytochemicals that include terpenoids, flavonoids, alkaloids, carbonyls, and coumarins, all sourced from *Z. armatum*. Three proteins / antigens were selected as a target against compounds based on *Z. armatum* and these include *P.*

falciparum glutathione S-transferase (Pf GST), *P. falciparum* dihydrofolate reductase (PfDHFR), and *P. falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1). Pf GST acts as a peroxidase, and it is mainly overexpressed in chloroquine resistance strains. Therefore, it can act as a potential target for drugs that can be used in combination with chloroquine to effectively treat malaria. PfDHFR is mainly responsible for DNA and folate synthesis and various other metabolic pathways in the malarial parasite therefore, its inhibition may lead to suppression of the growth of plasmodium (Shamshad et al., 2022). Furthermore, PfAMA-1 is a type 1 integral membrane protein that consists of 3 domains and is involved in the entry of the parasite into the hepatocytes of the host to evoke the immune response (Obonyo, 2022). Therefore, its binding to cell surface receptors can be inhibited to prevent the entry of this pathogenic antigen inside cells.

In the present study, a pharmacokinetic analysis was performed to assess the drug-like properties and toxic potential of these phytochemicals. Molecular docking was carried out to identify the interactions between these compounds and target proteins from *P. falciparum* involved in the pathogenesis of malaria. The stability of the docked complexes was confirmed through molecular dynamic simulations and the network pharmacology approach was used to further anticipate the toxicity, classification, and bioactivity of the selected phytochemicals.

MATERIALS AND METHODS

Selection of Ligands and Receptors (accessed in April 2024)

The molecular structures of the 40 *Z. armatum*-based compounds (Ahmad, Misra and Gupta, 1993; Tiwary et al., 2007; Dhami et al., 2018) and 2 commonly used antimalarial drugs sulfadoxine (Francis et al., 2020) and artesunate (Khanal, 2021) were obtained from PubChem in SDF format and converted to PDB files using Biovia Discovery Studio v2021 software (ter Kuile et al., 2007; Phuyal et al., 2019). The necessary charges like water molecules that were removed and hydrogen atoms were added were incorporated to prepare the ligands and then saved in PDBQT format for additional analysis and computational assessments. The names, molecular weight, formulas, Pubchem IDs, and structures of the selected ligands are provided in the Supplementary Table 1. Three of the proteins were selected as targets against the 40 *Z. armatum*-based compounds, including Pf GST (PDB ID: 1OKT), Pf DHFR (PDB ID: 7F3Y), and Pf AMA-1 (PDB ID: 1Z40) and their 3D structures were obtained from RCSB PDB.

Subsequently, using Discovery Studio software for protein 3D structure refinements, the ligands and other small molecules or atoms were eliminated from the receptors. Further refinements were made by removing water molecules, adding polar hydrogen atoms, and assigning charges. The final refined receptor structure was saved in PDBQT format, for docking experiments (Figure 1). The canonical SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) notations for each compound were retrieved from the PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) Analysis

The Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) analysis program (accessed in April 2025) was used to predict the biological properties, pharmacological characteristics, drug-likeness, potential side effects, and possible mode of action of the selected constituents. These predictions are made based on the structural and active relationships observed with established chemical entities (Khan et al., 2017). PASS Online (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>), which offers probability of activity (Pa) and inactivity (Pi) for a broad range of pharmacological effects, was used to forecast the possible biological activities of a few chosen phytochemicals. Activities were only deemed noteworthy if their Pa was more than 0.7. Lipinski's Rule of Five, Veber's Rule, and pharmacokinetic properties such as gastrointestinal absorption, blood-brain barrier permeability, P-glycoprotein substrate/inhibitor status, and CYP inhibition profile were assessed using SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (accessed in June 2024). ADMET-related metrics and toxicity evaluations were further analyzed through ProTox-II (https://tox-new.charite.de/protox_II) (accessed in July 2024), respectively. Each of these tools was chosen for its ability to accurately predict certain parameters that PASS alone does not offer.

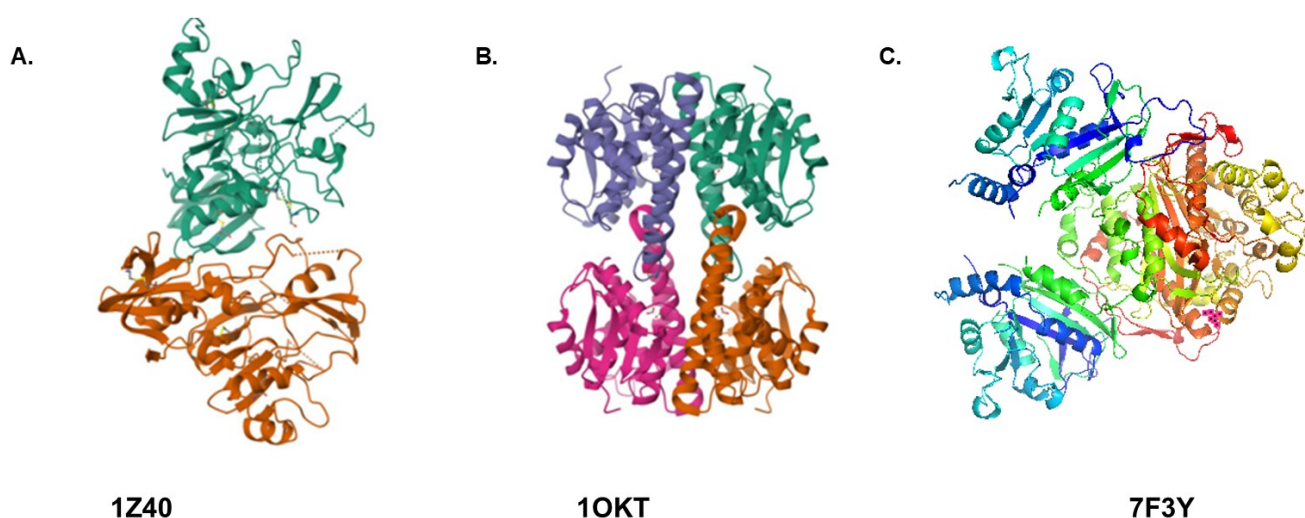


Figure 1. Representation of the 3-Dimensional structure of Malarial receptor proteins at the cell surface. **A.** *Pf* Anti-Malarial Antigen1(*Pf* AMA-1), **B.** *Pf* Glutathione S-Transferase (*Pf* GST), **C.** *Pf* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (*Pf* DHFR-TS).

Lipinski's Rule of Five (Drug Likeness Analysis)

The pharmacokinetic properties of the selected compounds such as absorption, distribution, excretion, and metabolism were evaluated using Lipinski's rule of five using Molinspirationv2021, (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) (accessed on May 2024). The determination of Lipinski's rule of five was based on certain predefined criteria, including the logarithm of the partition coefficient between *n*-octanol and water ($\log P \leq 5$), molecular weight ($MW \leq 500$), the number

of hydrogen bond donors ($\text{NOHNH} \leq 5$), hydrogen bond acceptor sites ($\text{NON} \leq 10$), topological polar surface area ($\text{TPSA} \leq 140 \text{ \AA}^2$), and the number of rotatable bonds (≤ 10). It is important to note that, to maintain bioavailability, an orally active drug should not exceed a single Lipinski violation (Pollastri, 2010). Drug likeness was also evaluated based on the rules of Ghoshe, Veber, Egen, and Muegge (Arunkumar et al., 2018). The drug-like potential of a compound is the assessment of oral bioavailability and ADMET properties (Kumari et al., 2019). According to Muegge's rule, certain ranges of H-bond donors and acceptors can be used to suggest drug-like effects, the Egen rule is a method for predicting oral bioavailability using molecular polar surface area ($\text{PSA} \times 131 \times 2$) and $\text{Log P} \times 5.88$, the Ghosh's rule-based approach that emphasizes on molecular weight ($\text{MW} < 480$), Log P (1-3), and atom count (20-70) and in Veber's Rule, 10 rotatable bonds and 140 polar surface areas (PSA) are recommended to maximize oral bioavailability (Ndombera et al., 2019). Additional filters were employed to improve prediction accuracy. Veber's Rule highlights the significance of molecular flexibility and polarity, suggesting a maximum of 10 rotatable bonds and a polar surface area (PSA) of no more than $140 \text{ \AA}^2$. Ghose's Rule highlights ideal physicochemical characteristics, indicating a molecular weight range of 160–480 Da, LogP from -0.4 to 5.6, molar refractivity between 40 and 130, and a total atom count between 20 and 70. Egan's filter employs $\text{PSA} \leq 131 \text{ \AA}^2$ and $\text{LogP} \leq 5.88$ to anticipate membrane permeability. Muegge's Rule combines several parameters such as MW (200–600), LogP (-2 to 5), H-bond donors (≤ 5), H-bond acceptors (≤ 10), and rotatable bonds (≤ 15) to recognize drug-like entities. Through the incorporation of these guidelines, compounds were evaluated to confirm advantageous pharmacokinetic properties and a high likelihood of success as orally active therapeutics.

Bioactivity Score Prediction

The bioactivity score indicates the likelihood that the studied complex could act as a potential drug (accessed on June 2024). The bioactivity score of phytochemicals against malarial target proteins was determined by a computational tool called Molinspiration version 2021.13. The structures were prepared through different options, and their physiochemical features and pharmacokinetic descriptors were calculated. The software indicates these 3 parameters; active, moderately active and inactive that if the score is higher than 0.0, the compound is active; if it is between -0.5 and 0.0, it is moderately active; and if it is less than -0.5, it is inactive (Jindal and Rani, 2023).

Toxicity Risk Assessment

The study provides an assessment of the anticipated adverse effects of a pharmaceutical compound on human health (Barile, 1996). The Protox-II server was used to evaluate the toxicological properties of phytochemicals found in *Z. armatum*, including aspects such as hepatotoxicity, cytotoxicity, carcinogenicity, mutagenicity, and tumorigenicity. Toxicity categorizations were established in align-

ment with the criteria of the Global Harmonized System (GHS) criteria for the classification and labelling of chemical compounds. The LD50 classes of the active compounds were also evaluated. The LD50 value is the dose of a drug or bioactive compound that kills 50% of the test substances (Banerjee et al., 2018).

Pharmacokinetic Activity Prediction

Using the online tool Swiss-ADME, predictive modelling was employed to assess the absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) of all phytochemical compounds and antimalarial drugs under investigation. The ADMET analysis focusses on blood-brain barrier (BBB) permeability, tissue distribution, gastrointestinal absorption, P-glycoprotein (P-gp) substrate, metabolic effects as an inhibitor of CYP3A4, and fluidity pertinent to plasma membrane absorption (Muhammed et al., 2021). PKCSM was used to evaluate the properties of pharmacokinetics (https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction_single/).

Molecular Docking (accessed in August 2024)

The ligands were docked with receptors using AutoDock version 1.5.6. (Huey et al., 2012). AutoDock vina was used to automatically calculate the grid values. In this research, the Grid box size was 40×40×40 (x, y and the z) and spacing was 0.375 for 3 receptors. Docking was performed using the Lamarckian Genetic Algorithm with an exhaustiveness value of 8 and a maximum of 9 binding modes. The energy range was set to 4 kcal/mol, and the number of evaluations was adjusted to the default settings of AutoDock Vina. For PfAMA-1 (PDB ID:1Z40), the center of the grid box was set at the position 11.657, 12.407, and 63.734 for x, y, and z, respectively. For PfGST (PDB ID: 1OKT) the center was set at the position 50.718, 42.107, and -8.602 for the x, y and z axes, respectively. For PfDHFR (PDB ID: 7F3Y) the grid center was set at 1.265, -1.860, and -23.712 for x, y, and z, respectively. The configuration file containing Grid box values for each ligand was obtained and saved in txt. format. The output was obtained by generating a command or code and saved in PDBQT format. The results showed the binding affinity of ligand to the receptor that was Gibbs free energy in kcal mol⁻¹. The highest negative value was considered as the highest binding affinity for receptor proteins. For the above 50 values, the best fit was selected. All profiles were displayed in Discovery Studio and a 2D output image showing the interaction of the ligand with the receptor's amino acids was obtained (Vong et al., 2022).

Molecular Dynamic Simulations (accessed in June 2025)

Molecular dynamic simulations were performed to study the interactions and movements of docked complexes using the accelerated central processing unit (CPU) platform via GROMACS software (van der Spoel et al., 2005). The system was prepared by charm 36-jul 2022. ff. The docked complexes were separated using Chimera into protein and ligand. For proteins, the additional dock prep with library was done by Dunbrack 2010 rotamers, and for PfDHFR-TS and PfGST protein complexes, the Richardson rotamer library was used. For the analysis of the

PfAMA-1 protein and the prepared ligand, GROMACS files were used from the Swiss Institute of Bioinformatics web server were used (Zoete et al., 2011). The resulting input files were downloaded as GROMACS files. The initial position of the particle was assigned using GROMACS '.gro' files, while the topologies were added in interactions between particles. Long range electrostatic interactions were implemented using particle mesh Ewald method, with cutoff distance of 1.2 nm for van der Waals interactions. The equilibrium was continued in an isothermal-isobaric ensemble maintaining a temperature of 300K for a 100 ns duration. The simulations were executed in the MD integrator with a 2fs time step. For trajectory analysis, MD analysis packages were used to compute the root mean square fluctuation (RMSF), radius of gyration (Rg), and root mean square deviation (RMSD) of both the protein and protein-ligand complexes. These parameters showed deviations and stability of the protein and ligand complexes in the simulation. These dynamics were conducted in GROMACS.

Network Pharmacology Approach (accessed in September 2024)

Screening of the Potential Targets of Selected Compounds

The data of potential targets of active compounds were retrieved from Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) by entering the canonical SMILES and specifying the species as homo sapiens. However, malarial targets were downloaded from GeneCard (<http://www.genecards.org/>) and DesGenet (<http://www.disgenet.org/>). The targets of these databases were merged, and repetitions were removed. The common names of the targets were also searched from UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>). The mutual targets of the selected compounds and the malaria were achieved, and Venn diagram was constructed using the bioinformatics tool (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>) (Tabassum et al., 2022).

Construction of Compound Target Network

Cytoscape V3.10.1 was used (<https://cytoscape.org/>) to build the compound-targets network to study the interactions among active compounds within the intricate biological system. In this network, the nodes represent the chemical constituents and targets, while the edges represent their interactions. The network analyzer function was employed to assess the basic characteristics of the network. Subsequently, the network was filtered based on the "degree," which indicates the number of connected nodes linked to a specific network node as a node attribute (Ram et al., 2023).

Prediction of Protein–Protein Interaction Network and Hub Genes

The STRING database (<https://stringdb.org/>) was used to evaluate the protein-protein interaction of 340 common genes, with the organism specified as "*Homo*

sapiens". Cytoscape V3.10.1 was utilized to visualize the protein-protein interaction network. Identification of hub genes and nodes with elevated degrees within the network was carried out using the CytoHubba plugin (Tao et al., 2013).

Construction of target–compound–pathway network

The DAVID database (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) provided the data for the analysis of the top hub genes, and a network was created to examine the mechanism within these pathways (Tabassum et al., 2022).

Gene Ontology and KEGG Pathway Analysis

The DAVID functional gene annotation resource database (<http://david.ncifcrf.gov/>) was used to conduct Gene Ontology and KEGG pathway analyses for the "*Homo sapiens*". It categorized gene functions into biological processes (BP), cellular components (CC), and molecular functions (MF) using Gene Ontology analysis, as well as performing enrichment pathway analysis for KEGG pathways. To visualize the results, top 20 GO annotations (BP, CC, and the MF) and KEGG pathways were selected using a cutoff method with a probability score below 5×10^{-2} . The bars and lollipop plots were created using Shiny GO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) for the selected annotations and pathways (Pomaznoy et al., 2018).

RESULTS

Lipinski's Rule of Five (Drug Likeness Analysis)

This analysis provided the phytochemical properties of 40 phytoconstituents of *Z. armatum* (Shah et al., 2024). Tambuletin exhibited more than 3 violations while Lupeol, α -Amyrins, Nerol, *allo*-Aromadenderene, (*E*)-Nerolidol and β -caryophyllene showed 1 violation. The remaining compounds did not show any violations of Lipinski's rule (Supplementary Table 2). An ideal compound should not contain more than one violation. The results of the Ghoshe, Veber, Egen, and Muegge rules are provided in the (Supplementary Table 3).

Bioactivity Score Prediction

Prediction of the bioactivity score showed that the score is higher than 0.0, the compound is active; if it is between -0.5 and 0.0, it is moderately active; and if it is less than -0.5, it is inactive. Cuminal (-0.44), Sabinene (-0.33), and Phellandral (-0.04) are important moderately active ion channel modulators, while Phellandral also revealed the potential to act as inactive nuclear receptor ligand (-1.50) and a moderately active enzyme inhibitor (-0.27). Lupeol is an active GCPR ligand (0.27), nuclear receptor inhibitor (0.85), protease inhibitor (0.15), and enzyme inhibitor (0.52) but is moderately active as a kinase inhibitor (-0.42). α -Amyrins and Tambuletin are active GCPR ligands (0.22, 0.10), nuclear (0.79, 0.16), protease

(0.19, 0.24), and enzyme inhibitors (0.60, 0.36), but moderately active ion channel modulators (-0.02, -0.04) and kinase inhibitors (-0.41, -0.18). The α -Terpinene is an active ion channel modulator (0.24), nuclear receptor inhibitor (0.24), protease inhibitor (0.52), enzyme inhibitor (0.11) and kinase inhibitor (0.29) but an inactive GCPR ligand (-0.96). Pyrimethamine and sulfadoxine are inactive nuclear-receptor ligands (-0.62). Details of all other phytochemicals are presented in (Table 1).

Table 1. Bioactivity Score prediction of phytochemicals of *Z. armatum*.

Phytoconstituents	GPCR ligand	Ion channel modulator	Kinase inhibitor	Nuclear receptor ligand	Protease inhibitor	Enzyme Inhibitor
α -Fenchol	-0.56	-0.46	-1.71	-0.80	-0.67	-0.59
α -Terpinene	-0.96	0.24	0.29	0.24	0.52	0.11
α -Thujene	-0.86	-0.37	-1.73	-0.86	-0.82	-0.48
α -Thujone	-0.75	-0.50	-1.63	-1.08	-0.64	-0.53
α -pinene	-0.48	-0.43	-1.50	-0.62	-0.85	-0.34
α -Terpineol	-0.51	0.15	-1.45	-0.02	-0.78	0.14
β -Terpineol	-0.63	0.23	-1.60	-0.21	-0.92	-0.07
Camphor	-0.79	-0.56	-2.12	-1.21	-0.95	-0.52
Citral	-0.86	-0.25	-0.29	-0.42	-0.57	0.02
Citronellol	-0.81	-0.24	-1.16	-0.61	-0.83	-0.12
Citronellal	-0.83	-0.08	-1.30	-0.61	-0.50	-0.03
1'8-cineole	-0.93	0.01	-1.60	-1.07	-0.90	-0.15
Geraniol	-0.60	0.07	-1.32	-0.20	-1.03	0.28
γ -terpinene	-0.90	-0.24	-1.37	-0.33	-1.55	-0.07
Limonene	-0.91	-0.27	-2.01	-0.34	-1.38	-0.21
Linalool	-0.73	0.07	-1.26	-0.06	-0.94	0.07
Nerol	-0.60	0.07	-1.32	-0.20	-1.03	0.28
P-cymene	-1.18	-0.61	-1.40	-1.21	-1.42	-0.78
Piperitone	-0.99	-0.60	-2.12	-0.57	-0.96	-0.08
Sabinene	-1.15	-0.33	-1.79	-0.69	-0.78	-0.60
Tagetonol	-0.76	-0.13	-1.75	-0.28	-0.47	0.01
Terpinen-4-ol	-0.56	-0.04	-1.68	-0.20	-0.92	0.06
(Z)-linalool oxide	-0.67	-0.31	-0.95	-0.34	-0.93	0.12
allo-Aromadendrene	-0.67	-0.47	-0.98	-0.21	-0.67	-0.30
(E)-nerolidol	-0.17	0.21	-0.64	0.42	-0.43	0.39
α -Amyrins	0.22	-0.02	-0.41	0.79	0.19	0.60
lupeol	0.27	0.11	-0.42	0.85	0.15	0.52
Cis-ocimene	-0.98	-0.08	-1.26	-0.49	-1.24	0.06
Cuminal	-1.15	-0.44	-1.22	-0.86	-1.48	-0.64
Cinamaldehyde	-1.15	-0.44	-1.22	-0.86	-1.48	-0.64
Phellandral	-0.77	-0.07	-1.50	-0.36	-0.97	-0.27
2-tridecanone	-0.54	-0.18	-1.02	-0.41	-0.56	-0.07
Umbelliferon	-1.22	-0.72	-1.30	-0.92	-1.30	-0.35
Bergapten	-0.16	-0.20	-0.45	-0.03	-0.28	-0.35
3,5-diacetylTambulin	-0.21	-0.15	-0.16	-0.09	-0.32	0.14
Kaempferol	-0.10	-0.21	0.21	0.32	-0.27	0.26
Tambulin	-0.18	-0.16	0.11	0.10	-0.27	0.17
Tambuletin	0.10	-0.04	-0.18	0.16	0.24	0.36
Artesunate	0.08	0.04	-0.20	0.35	0.15	0.31
Sulfadoxine	0.26	-0.21	0.16	-0.62	-0.18	0.10

Pharmacokinetic Properties

The pharmacokinetic assessment of potential compounds includes essential factors that evaluate their performance in the human body. Gastrointestinal (GI) absorption signifies the likelihood of oral bioavailability, and strong GI absorption enhances the effectiveness of oral delivery. Blood-brain barrier (BBB) permeability indicates a compound's capacity to reach the central nervous system, which is vital for medications aimed at neurological disorders. The classification of a compound as a P-glycoprotein (P-gp) substrate dictates whether it can be expelled from cells, which may influence its absorption and distribution. Furthermore, the inhibition of cytochrome enzymes specifically CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4 can affect the metabolism of other medications, raising potential concerns regarding drug-drug interactions and toxicity. The skin permeability coefficient (Log Kp) also sheds light on the likelihood of transdermal absorption, with more negative values signifying reduced permeability. Collectively, these factors offer a thorough insight into a compound's ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) profile, critical for evaluating its drug-likeness and therapeutic potential.

The results revealed that β -caryophyllene 0.733, Lupeol 0.72, Tambulin, Tambuletin 0.7, Kaempferol 0.7, and 3,5-Diacetyltumbulin 0.7 were unable to cross the blood-brain barrier (BBB), while the remaining phytochemicals showed permeability to the BBB. Tambuletin showed positive responses against P-gp substrate and the remaining compounds exhibited negative results. Most of the substances were expected to inhibit the various classes of cytochromes (CYP450, CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4) for continuous plasma concentrations and increased bioavailability (Table 2). Among these results Tambuletin show positive response to p-gp substrate and show only favorable BBB permeability but lack p-gp substrate activity, making them strong candidate for further *in vivo* evaluation.

Toxicity Assessment Analysis

Using the Protox-II server the drug-likeness and toxicity potential of different ligands were estimated. The criteria for parameters are; High risk values is any probability > 0.8 in mutagenicity, hepatotoxicity, immunotoxicity, cytotoxicity, or carcinogenicity and LD50 < 300 mg/kg (Class I–III). Moderately risk probability includes 0.6-0.8 and LD50 between 300-200mg/kg (Class IV). Low risk includes <0.6 and LD >2000mg/kg (Class V–VI). 10 compounds; α -Fenchol (0.96), α -Terpineol (0.96), (Z)-Linalool oxide (0.96), *allo*-Aromadendrene (0.96), β -Caryophyllene (0.96), α -Amyrins (0.98), 3,5-Diacetyltambuletin (0.90), Tambulin (0.98) and Tambuletin (0.87) were proven highly immunotoxic and Lupeol (0.57) was slightly immunotoxic. (Z)-linalool oxide (0.69), *allo*-Aromadendrene (0.69), β -Caryophyllene (0.69) were slightly hepatotoxic and Cinnamic aldehyde (0.72) and Bergapten (0.75) were mutagenic. Tambuletin was slightly cytotoxic (0.50) while Bergapten (0.84) showed carcinogenic properties and Umbelliferon (0.64) and P-

Cymene (0.64) were also slightly carcinogenic. Sulfadoxine was also slightly carcinogenic (0.52) (Table 3).

Table 2. Pharmacokinetics properties of phytochemicals of *Z. armatum*

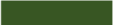
Phytoconstituents	GI absorption	BBB permeant	P-gp substrate	CYP1A2 inhibitor	CYP2C19 inhibitor	CYP2C9 inhibitor	CYP2D6 inhibitor	CYP3A4 inhibitor	Log Kp
α-Fenchol	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-4.99 cm/s
α-Terpinene	Low	Yes	No	No	No	No	No	No	-4.11 cm/s
α-Thujene	Low	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.11 cm/s
α-Thujone	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.62 cm/s
α-pinene	Low	Yes	No	No	No	Yes	No	No	-3.95 cm/s
α-Terpineol	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-4.83 cm/s
β-Terpineol	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.45 cm/s
Camphor	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.67 cm/s
Citral	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.08 cm/s
Citronellol	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-4.52 cm/s
Citronellal	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-4.88 cm/s
1'8-cineole	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.30 cm/s
Geraniol	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-4.11cm/s
γ-terpinene	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-4.70 cm/s
Limonene	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-3.94 cm/s
Linalool	Low	Yes	No	No	No	Yes	No	No	-3.89 cm/s
Nerol	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.13cm/s
P-cymene	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-4.71cm/s
Piperitone	Low	Yes	No	No	No	No	Yes	No	-4.12 cm/s
Sabinene	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.71cm/s
Tagetonol	Low	Yes	No	No	No	No	No	No	-4.94 cm/s
Terpinen-4-ol	Low	Yes	No	No	No	No	No	No	-3.94 cm/s

(Z)-linalool oxide	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.61 cm/s
allo-Aromadendrene	Low	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	No	-4.20 cm/s
(E)-nerolidol	Low	No	No	No	Yes	Yes	No	No	-4.44 cm/s
α-Amyrins	High	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No	-4.23 cm/s
lupeol	Low	no	no	no	no	no	no	no	-2.51 cm/s
Cis-ocimene	Low	No	No	No	No	No	No	No	-1.90 cm/s
Cuminal	High	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	-5.17 cm/s
Cinmaldehyde	High	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	-6.32 cm/s
Phellanderol	High	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	-5.81 cm/s
2-tridecanone	High	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	No	-5.17 cm/s
Umbelliferone	High	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	-5.87 cm/s
Bargaptin	High	Yes	No	Yes	No	No	No	No	-5.26 cm/s
3,5-diacetylTamulin	High	Yes	No	Yes	No	No	No	No	-5.52 cm/s
Kaempferol	High	Yes	No	Yes	No	No	No	No	-5.76 cm/s
Tambulin	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.32 cm/s
Tambuletin	High	Yes	No	Yes	No	No	No	No	-3.84 cm/s
Artesunate	High	No	No	No	No	No	No	No	-7.31
Sulfadoxine	High	Yes	No	No	No	No	No	No	-5.07 cm/s

Table 3. LD50 values and toxicity potential of phytochemicals of *Z. armatum*.

Ligands	LD50 potential	Toxicity class	Mutagenicity	Hepatotoxicity	Immunotoxicity	Cytotoxicity	Carcinogenicity
α -Fenchol	1190 mg/kg	Class 4	0.97	0.69	0.96	0.93	0.62
α -Terpinene	1680 mg/kg	Class 4	0.85	0.78	0.95	0.85	0.75
α -Thujene	5000 mg/kg	Class 5	0.78	0.86	0.98	0.73	0.55
α -Thujone	500 mg/kg	Class 4	0.86	0.76	0.99	0.67	0.62
α -Pinene	3700 mg/kg	Class 5	0.93	0.86	0.99	0.75	0.60
α -Terpineol	1190 mg/kg	Class 4	0.97	0.69	0.96	0.93	0.62
β -Terpineol	2000 mg/kg	Class 4	0.9	0.75	0.98	0.89	0.75
Citral	500 mg/kg	Class 4	0.98	0.69	0.99	0.82	0.88
Camphor	775 mg/kg	Class 4	0.94	0.72	0.96	0.61	0.68
Citronellal	2420 mg/kg	Class 5	0.99	0.70	0.99	0.82	0.83
Citronellol	3450 mg/kg	Class 5	0.96	0.84	0.99	0.86	0.65
1,8-cineole	2480 mg/kg	Class 5	0.96	0.86	0.99	0.75	0.68
Cis-ocimene	113 mg/kg	Class 3	0.90	0.83	0.99	0.75	0.51
Geraniol	2100 mg/kg	Class 5	0.97	0.79	0.99	0.85	0.76
γ -terpinene	2500 mg/kg	Class 5	0.92	0.83	0.98	0.82	0.60
Limonene	4400mg/kg	Class 5	0.97	0.76	0.95	0.82	0.65
Linalool	2200mg/kg	Class 5	0.95	0.76	0.99	0.82	0.64
Nerol	2100mg/kg	Class 5	0.97	0.79	0.99	0.85	0.76
P-cymene	3 mg/kg	Class 1	0.98	0.87	0.99	0.89	0.67
Piperitone	2450 mg/kg	Class 5	0.93	0.64	0.92	0.87	0.79
Sabinene	5000 mg/kg	Class 5	0.82	0.81	0.51	0.71	0.59
Tagetonol	2500 mg/kg	Class 5	0.87	0.68	0.99	0.83	0.54
Terpinen-4-ol	1016 mg/kg	Class 4	0.83	0.80	0.99	0.88	0.72S

(Z)-linalool oxide	1190 mg/kg	Class 4	0.97	0.69	0.96	0.93	0.62
allo-Aromadendrene	1190 mg/kg	Class 4	0.97	0.69	0.96	0.93	0.62
β-caryophyllene	1190 mg/kg	Class 4	0.97	0.69	0.96	0.93	0.62
(E)-nerolidol	5000 mg/kg	Class 5	0.91	0.81	0.99	0.81	0.65
α-Amyrins	70000 mg/kg	Class 6	0.92	0.75	0.98	0.95	0.63
lupeol	1190 mg/kg	Class 4	0.95	0.91	0.57	0.97	0.63
Cuminal	1320 mg/kg	Class 4	0.97	0.71	0.96	0.89	0.52
Cinamaldehyde	1850 mg/kg	Class 4	0.72	0.70	0.98	0.92	0.71
Phellandral	2300 mg/kg	Class 5	0.93	0.66	0.97	0.82	0.77
2-Tridecanone	5000 mg/kg	Class 5	0.97	0.69	0.99	0.73	0.63
Umbelliferon	10000 mg/kg	Class 6	0.83	0.68	0.97	0.68	0.64
Bergapten	8100 mg/kg	Class 6	0.75	0.79	0.83	0.85	0.84
3,5-diacetylTambulin	5000 mg/kg	Class 5	0.68	0.73	0.90	0.76	0.54
Kaempferol	3919 mg/kg	Class 5	0.52	0.68	0.96	0.98	0.72
Tambuletin	5000 mg/kg	Class 5	0.77	0.83	0.98	0.50	0.93
Tambulin	3919 mg/kg	Class 5	0.77	0.70	0.87	0.66	0.63
Artesunate	1000 mg/kg	Class 4	0.63	0.76	0.87	0.87	0.65
Sulfadoxine	5200 mg/kg	Class 6	0.72	0.50	0.99	0.93	0.52

	Strongly non-toxic
	Less non-toxic
	Less toxic
	Strongly toxic

Analysis of LD50 values revealed that α -Amyrins shows 70000mg/kg and class VI, Bergapten and Umbelliferon have high LD50 values (8100 and 10000 mg/kg) therefore, belong to class 6 that is nontoxic, Sabinene have 5000mg/kg and Phellandral have 2300mg/kg are categorized in class 5. Cuminal is placed in class 4 that could be harmful if swallowed have value of 1850mg/kg and P-Cymene belongs to class 1 have value 3mg/kg that is highly toxic. The details of all the compounds are presented in Table 3.

Based on pharmacokinetics analysis, various compounds that showed more than one Lipinski's violations, less bioactivity score and toxic potential were filtered out and the remaining compounds were selected for the molecular docking studies. The schematic representation of the study is shown in graphical abstract.

Molecular Docking

After the initial analysis, 21 phytochemicals were selected for further analysis and docked with 3 target proteins involved in the pathogenesis of malaria with the help of AutoDock vina v1.5.6. PfAMA-1 (1Z40) showed the highest binding affinities with Cuminal (-5.9Kcal/mol), Pf GST (1OKT) exhibited the highest binding interaction with Sabinene (-7.1 Kcal/mol), while PfDHFR (7F3Y) showed the highest binding affinities with Phellandral (-5.5 Kcal/mol) (Tables 4, 5 and 6; Figures 2 and 3).

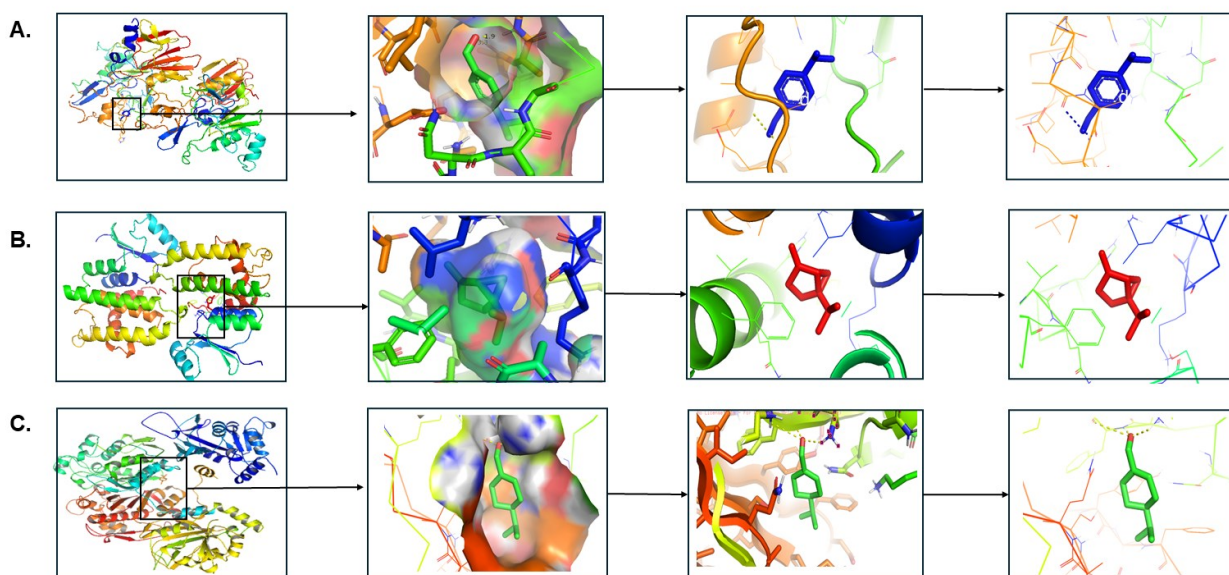


Figure 2. Different interactive docked poses of the selected phytochemical from *Z. armatum*. **A.** Pf Anti-Malarial Antigen1(Pf AMA1) with Cuminal, **B.** Pf Glutathione S-Transferase (Pf GST) with Sabinene **C.** Pf dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (Pf DHFR-TS) with Phellandral.

Cuminal shows 3 amino acid interaction GLU350 (Conventional hydrogen bonding), PRO350 (Pi-Alkyl) And GLU365 (Pi-Anion). Sabinene shows an interaction with ALA164, LEU18, VAL103, HIS107, PHE100, LYS15 (Conventional

hydrogen bonding). Phellandral shows interactions with PHE499, TYR497(both with Pi-Alkyl) and PHE354 (Conventional hydrogen bonding). Sulfadoxine and Artesunate was used as standard drugs, sulfadoxine show no interaction with PfAMA-1 (1Z40) and PfGST (1OKT) but with Pf-Dihydrofolate reductase (7F3Y) as LYS353, GLN542 (both are conventional hydrogen bonding), LYS502, TYR497, SER504, ASN340, LYS359 (Pi-Anion). Artesunate show binding affinity with PfAMA-1 (1Z40) is -9.0 kcal/mol as PRO330, ARG128, SER392, LYS351, SER347, LYS395, TYR397, with Pf GST (1OKT) is -7.8 kcal/mol and interactions are ALA12, TYR211, VAL210, PHE10, LEU10, ALA41, PHE42, *ASP11* and with Pf-Dihydrofolate reductase (7F3Y) is -7.0 kcal/mol with interactions are PHE354, PHE499, LYS502, SER504, LYS302. It shows conventional hydrogen bonding, Pi-Anion and Pi-Alkyl, carbon hydrogen bonding and alkyl bonding. It only shows only unfavorable donor donor interaction with PfAMA-1 (1Z40). The docking poses of all the other phytochemicals are shown in tables 4, 5 and 6.

Table 4. Binding affinities of PfAMA-1 (1Z40) with selected phytochemicals from *Z. armatum*

Ligands	Binding Affinities Kcal/mol	Receptor protein	Interacting Amino acids residues
α -Terpinene	-5.4	PfAMA-1	PRO350, GLU365
α -pinene	-5.5	PfAMA-1	LYS364, LYS391, ARG389, ARG143, TYR390, LEU380
β -Terpineol	-5.6	PfAMA-1	PRO381, LEU380, ASP134, LYS391, ARG143, TYR390
Citral	-5.0	PfAMA-1	ILE332, TYR397, LYS351, LEU340, PHE329, PRO330
Citronellol	-4.6	PfAMA-1	SER345, LYS351, LEU340, PHE329, PRO330
Citronellal	-4.6	PfAMA-1	LYS364, ARG143, LEU380, ILE363, TYR360, ARG389, TYR390, LYS391
1'8-cineole	-5.6	PfAMA-1	ARG143, LYS364, LEU380, ARG389, TYR390
Cis-ocimene	-4.8	PfAMA-1	LEU380, ARG143, LYS364, ARG389, TYR390, LYS391
Geraniol	-4.8	PfAMA-1	LEU380, ARG143, LYS364, LYS391, TYR390
γ - terpinene	-5.6	PfAMA-1	GLU365, LEU357
Limonene	-5.1	PfAMA-1	LEU380, ARG143, LYS391, TYR390, ARG389
Linalool	-4.8	PfAMA-1	PRO330, LYS351, PHE329, LEU340, TYR397, LEU344
Nerol	-4.7	PfAMA-1	PHE329, PRO330, LYS351, LEU340, SER347
Piperitone	-5.4	PfAMA-1	ARG143, LYS391, LYS364, TYR390, LEU380
Sabinene	-5.6	PfAMA-1	LYS364, ARG143, LYS391, TYR390, ARG389
Tagetonol	-4.8	PfAMA-1	PRO330, LEU340, LEU344, TYR397, GLU336, ILE332
(<i>E</i>)-nerolidol	-5.7	PfAMA-1	LEU340, PHE329, PRO330, PRO350, LYS391
Cuminal	-5.9	PfAMA-1	PRO350, GLU354, GLU365
Phellandral	-5.5	PfAMA-1	LUE357, PRO330
2-tridecanone	-4.5	PfAMA-1	PRO330, TYR397, LEU340, LYS351
Sulfadoxine	-3.8	PfAMA-1	No interaction
Artesunate	-9.0	PfAMA-1	PHE354, PHE499, LYS502, SER504, LYS302

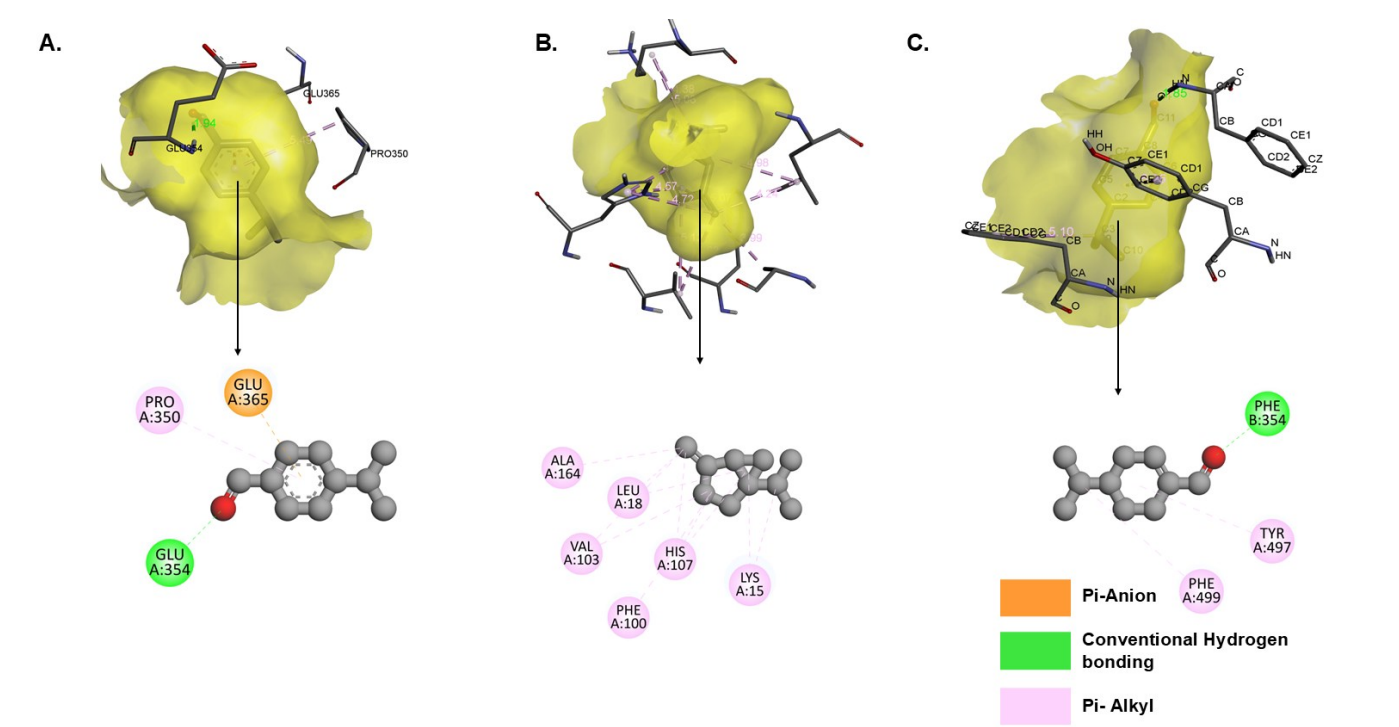


Figure 3. Molecular docking representations showing the interaction of selected phytochemicals from *Z. armatum* with key *Plasmodium falciparum* receptor proteins involved in malaria pathogenesis. **A.** Pf Anti-Malarial Antigen1(Pf AMA-1) with Cuminal, **B.** Pf Glutathione S-Transferase (Pf GST) with Sabinene **C.** Pf dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (Pf DHFR-TS) with Phellandral. These docked complexes highlight the potential of *Z. armatum* phytoconstituents as anti-malarial agents through multi-target inhibition.

Table 5. Docking analysis of Pf GST with selected phytochemicals of *Z. armatum*.

Ligand	Protein (10KT)	Binding affinity Kcal/mol	Amino acids residues interaction
1,8-cineole	Pf GST	-6.3	TYR211, ALA12, ALA41, PHE42, PHE10, LEU115
2-tridecanone	Pf GST	-4.8	PHE10, TYR211, LEU215, ALA12, PHE42, ALA41
α -Terpinene	Pf GST	-6.3	HIS107, PHE116, LYS15, GLN104, LEU118
α -Pinene	Pf GST	-6.8	VAL76, VAL103, LEU18, PHE100, HIS107
β -Terpineol	Pf GST	-6.0	HIS107, LYS15, PHE116, PHE100, LEU18
Cis-ocimene	Pf GST	-6.1	VAL103, VAL76, HIS107, TYR108, PHE116, PHE100, LEU18, LYS15
Citral	Pf GST	-5.3	PHE10, PHE42, LEU115, LYS175, TYR211, ALA12, TYR176
Citronellal	Pf GST	-5.6	LYS15, PHE176, HIS107
Citronellol	Pf GST	-5.0	PH10, PHE42, ALA12, ALA41, TYR176, TYR211, LEU115
Cuminal	Pf GST	-6.3	PHE45, GLN18
(E)-nerolidol	Pf GST	-6.9	TYE108, LYS15, PHE116, PHE100, HIS160, ALA164, LEU18, VAL103, HIS107
γ -terpinene	Pf GST	-6.4	PHE116, PHE100, GLN104, LEU18, LYS15
Geraniol	Pf GST	-5.8	TYR108, PHE116, HIS 107, LYS15, PHE 100
Limonene	Pf GST	-6.3	HIS107, LEU18, PHE116, PHE100, VAL76, LYS 15

Linalool	<i>Pf</i> GST	-5.4	TYR211, LEU215, TYR211, ASN 111, LYS175, PHE110
Nerol	<i>Pf</i> GST	-6.1	PHE100, PHE116, TYR108, HIS107, LYS15, GLY14(UNFAVORABLE ACCEPTOR-ACCEPTOR)
Phellandral	<i>Pf</i> GST	-6.3	PHE100, LYS15, LEU18, GLN104
Piperitone	<i>Pf</i> GST	-6.5	LYS15, LUE18, PHE116
Sabinene	<i>Pf</i> GST	-7.1	ASN 111, PHE110, LYS175
Tagetonol	<i>Pf</i> GST	-5.1	ASN111, TYR21, PHE110
Artesunate	<i>Pf</i> GST	-7.8	ALA12, TYR211, VAL210, PHE10, LEU10, ALA41, PHE42, ASP11(UNFAVORABLE ACCEPTOR-ACCEPTOR)
Sulfadoxine	<i>Pf</i> GST	-4.7	No interaction

Table 6. Docking analysis of *Pf*-DHFR with selected phytochemicals of *Z. armatum*.

Ligand	Binding affinities kcal/mol	Receptor (7F3Y)	Interactions
1,8-cineole	-5.3	<i>Pf</i> -DHFR	ALA541, LYS353, ASN340, TYR497, PHE499
2-Tridecanone	-3.6	<i>Pf</i> -DHFR	ALA541, LYS502, SER504
α-Terpinene	-5.2	<i>Pf</i> -DHFR	LYS353, TYR497, LYS502, ALA541
α-Pinene	-5.2	<i>Pf</i> -DHFR	LYS353, TYR497, LYS502, ALA541
β-Terpineol	-4.5	<i>Pf</i> -DHFR	PHE499, PHE353, LYS 353, TYR497, LYS502, ALA541
Cis-ocimene	-5.4	<i>Pf</i> -DHFR	ALA541, LYS502, TYR497
Citral	-4.5	<i>Pf</i> -DHFR	ALA541, LYS502
Citronellal	-4.4	<i>Pf</i> -DHFR	ALA541, LYS502, PHE354, LYS353, GLN542, TYR497, PHE499
Citronellol	-4.2	<i>Pf</i> -DHFR	LYS353, TYR497, ALA541, LYS502
Cuminal	-5.3	<i>Pf</i> -DHFR	ASN340, PHE499, GLN542, LYS353, PHE354
(E)-nerolidol	-5.0	<i>Pf</i> -DHFR	PHE499, LYS502, LYS353, GLN542, SER504, TYR497, ALA541
γ-terpinene	-5.2	<i>Pf</i> -DHFR	LYS353, PHE499, ASN340
Geraniol	-4.5	<i>Pf</i> -DHFR	LYS353, TYR497, PHE499, LYS502
Limonene	-5.2	<i>Pf</i> -DHFR	ALA541, TYR497, LYS502, PHE499, LYS353
Linalool	-4.3	<i>Pf</i> -DHFR	ALA541, TYR497, LYS502, PHE499, LYS353, PHE354
Nerol	-4.4	<i>Pf</i> -DHFR	TYR497, PHE499, LYS502
Phellandral	-5.5	<i>Pf</i> -DHFR	PHE354, PHE499, TYR457
Piperitone	-5.4	<i>Pf</i> -DHFR	LYS502, ALA541, TYR497, SER504, LYS353
Sabinene	-5.0	<i>Pf</i> -DHFR	LYS353, TYR497, PHE499
Tagetonol	-5.0	<i>Pf</i> -DHFR	TYR497, LYS353, ALA514
Sulfadoxine	-6.4	<i>Pf</i> -DHFR	LYS353, GLN542, LYS502, TYR497, SER504, ASN340, LYS359, LYS353
Artesunate	-7.0	<i>Pf</i> -DHFR	PHE354, SER504, LYS302, LYS 502, PHE499

Molecular Dynamic Simulations

The structural flexibility of the best docked complexes (highest binding affinities) was evaluated by GROMACS. On the basis of the results, the variation of Rg is caused by protein-ligand interactions of their binding sites. Rg is Radius of Gyration that describes protein compactness and stability in MD simulation. The Rg plots evaluate the protein structure's compactness over time. In the Sabinene–PfGST complex, the Rg remains consistently between approximately 2.555 and 2.565 nm, indicating that the protein maintains its structural integrity and stable tertiary conformation (Figure 5B). Likewise, the Cuminal complex exhibits minor variations, showing no significant signs of unfolding or collapse in the protein (Figure 4B). On the other hand, the Phellandral complex shows a gradual decline in Rg values from initial measurements to a stable range of 3.28–3.32 nm, suggesting that the protein becomes more compact following ligand binding (Figure 6B). This compaction signifies improved stability upon the formation of the complex.

The RMSD graphs for the three ligands Cuminal, Sabinene, and Phellandral demonstrate overall structural stability throughout the 50 ns MD simulation. The Sabinene–Pf GST complex displays the most stable pattern, with RMSD values slightly varying between 0.25 and 0.35 nm, indicating consistent ligand binding without significant conformational alterations (Figure 5A). Pf AMA-1 Cuminal's RMSD shows a comparable trend, achieving stability around 0.3–0.5 nm after some initial minor fluctuations (Figure 4A). The Phellandral–Pf DHFR complex experiences an initial increase in RMSD during the first 5 ns but subsequently stabilizes between 0.6 and 0.7 nm (Figure 6A), suggesting the system has reached equilibrium and that binding is thermodynamically favorable across all complexes.

SASA measurements offer insight into how much protein surface is accessible to the solvent. In the Sabinene complex, the SASA values hover around 230–235 nm², indicating that there has been no notable unfolding or exposure of hydrophobic areas (Figure 5C). A similar pattern is seen in the Cuminal–Pf AMA-1 complex, where stable SASA values demonstrate structural integrity and minimal changes in conformation (Figure 4C). Conversely, the Phellandral–Pf DHFR complex exhibits a downward trend in SASA over time, suggesting a decrease in solvent-accessible surface area due to enhanced compactness and stabilization of the protein structure (Figure 6C).

The RMSF analysis assesses the variability of individual amino acid residues. For all three complexes, minimal fluctuations are noted across most residues (<0.3 nm), especially in the regions of the active site, suggesting robust stabilization induced by the ligands. Somewhat increased fluctuations are confined to the terminal and loop regions, which is commonly observed in such simulations. The stability observed in the core and binding-site residues of the Cuminal, Sabinene, and Phellandral complexes supports their effective interaction and potential as promising bioactive antimalarial agents targeting Pf GST. The highest peak was observed for Cuminal at 350–400 residue index at 0.34 nm (Figure 4D). For sabinene it was from

0 -50 at 37nm (Figure 5D). For Phellandral it was observed at 600 residue index at 0.75nm (Figure 6D).

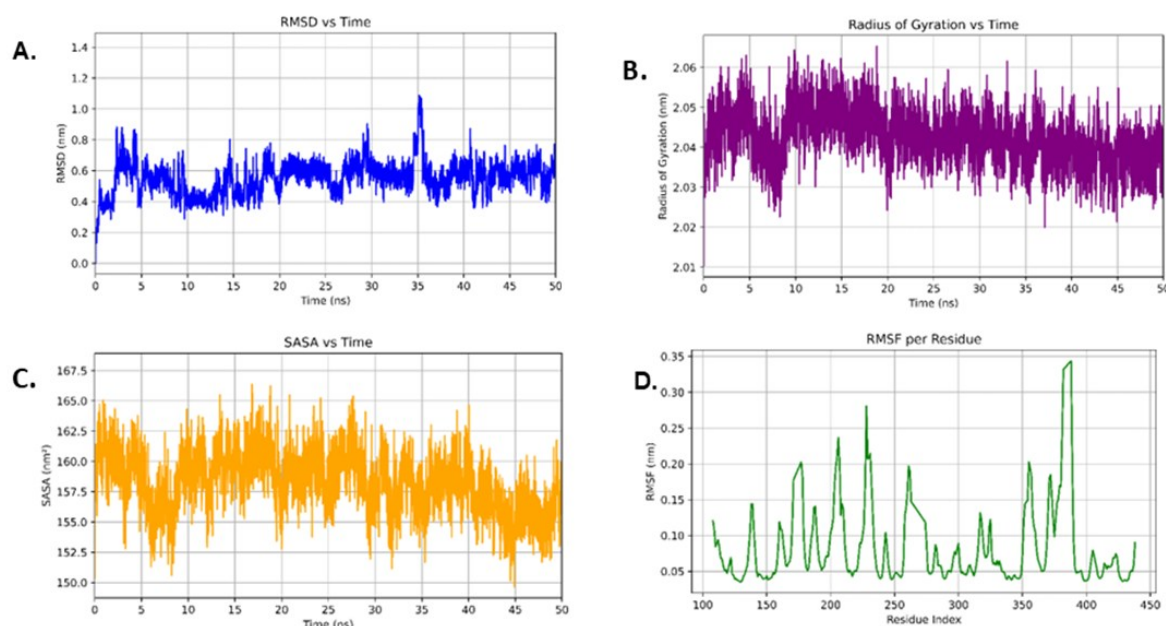


Figure 4. Molecular dynamics simulation analysis of the Cuminal-PfAMA1 complex. **A.** RMSD (Root Mean Square Deviation) vs Time plot indicates the overall stability of the protein-ligand complex across the 50 ns simulation, showing relatively stable fluctuations within an acceptable range. **B.** Radius of Gyration vs Time assesses the compactness of the protein structure, demonstrating minor variations and maintaining structural integrity. **C.** SASA (Solvent Accessible Surface Area) vs Time reveals slight fluctuations in the protein's surface exposure to solvent, suggesting consistent folding behaviour. **D.** RMSF (Root Mean Square Fluctuation) per Residue identifies flexible regions in the PfAMA-1 protein, with higher peaks corresponding to terminal or loop regions). Together, these results confirm the dynamic stability and structural compatibility of Cuminal with PfAMA-1

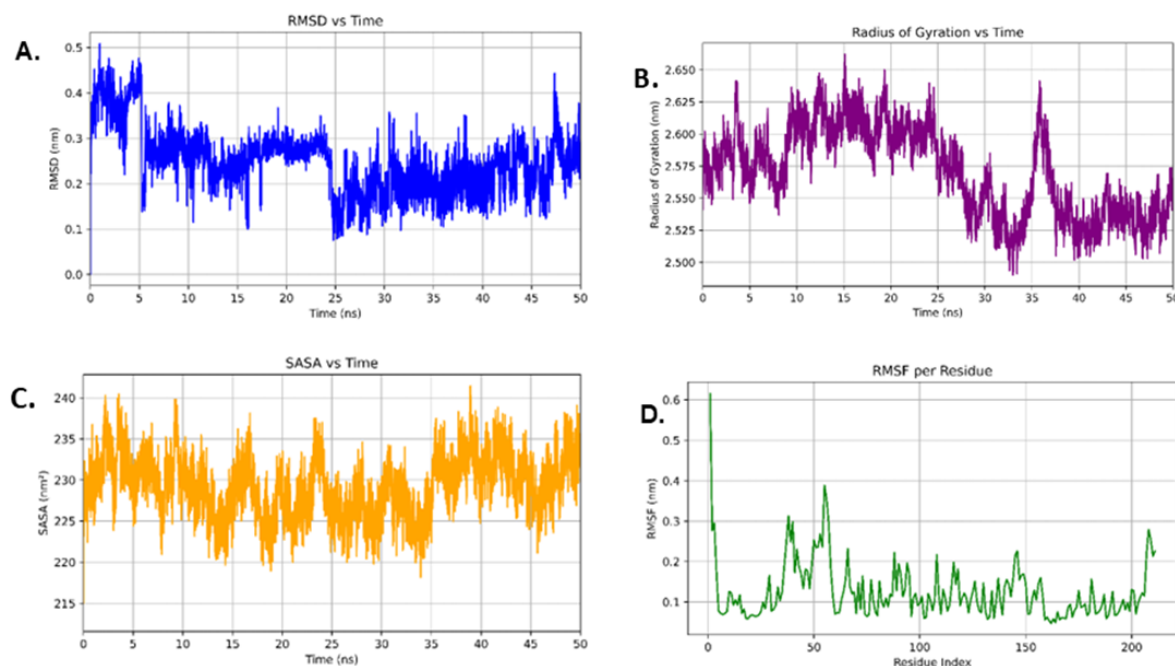


Figure 5. Molecular dynamics simulation analysis of the Sabinene-PfGST complex. **A.** RMSD vs Time plot demonstrates the structural stability of the protein-ligand complex, with consistent fluctuations indicating a relatively stable interaction over the 50 ns simulation. **B.** Radius of Gyration vs Time reflects the compactness of the protein, indicating moderate conformational changes but overall maintenance of structural integrity. **C.** SASA vs Time reveals fluctuations in solvent-accessible surface area, signifying stable surface exposure over time. **D.** RMSF per Residue highlights residue-level flexibility, with higher peaks suggesting more dynamic regions, possibly at terminal loops or active sites. These results collectively suggest a stable binding of Sabinene to PfGST, with acceptable dynamic behavior throughout the simulation.

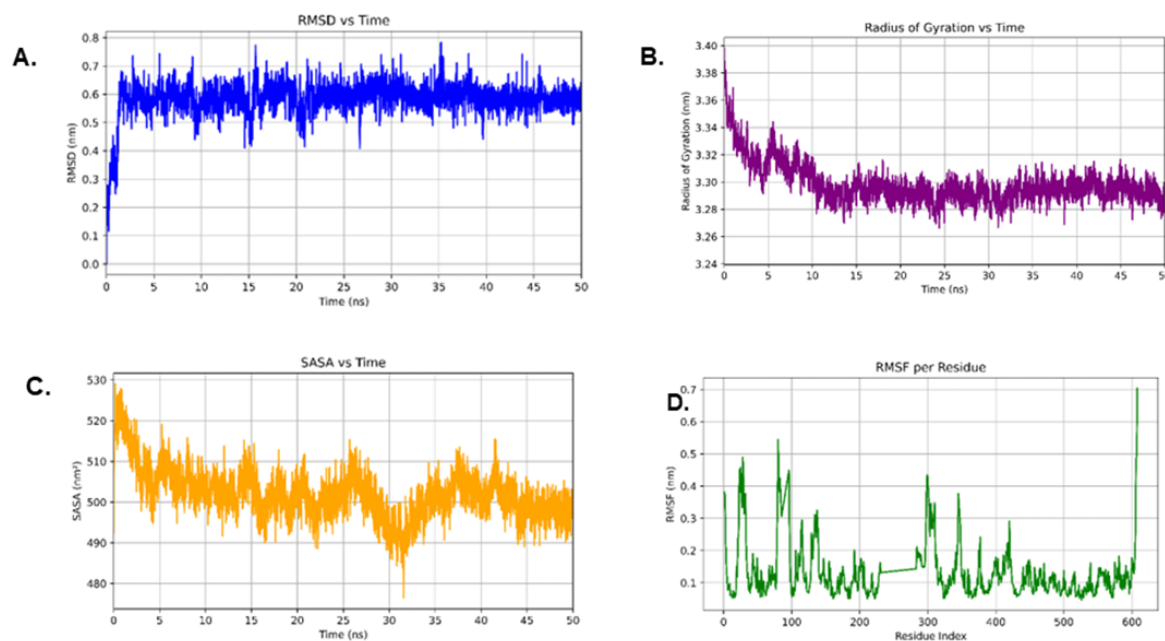


Figure 6. Molecular dynamics simulation analysis of the Phellandral-PfDHFR-TS complex. **A.** RMSD vs Time plot shows the backbone stability of the protein-ligand complex, with the RMSD stabilizing around 0.4–0.6 nm after initial fluctuations, indicating conformational stability. **B.** Radius of Gyration vs Time indicates compactness of the protein structure, showing a steady decline and plateau, reflecting structural tightening upon ligand binding. **C.** SASA vs Time represents the solvent-accessible surface area, which remains consistent with moderate fluctuations, implying stable solvent exposure. **D.** RMSF per Residue depicts the flexibility of individual residues, with minor peaks indicating local flexibility in

terminal or loop regions. These parameters collectively suggest that Phellandral maintains a stable interaction with PfDHFR-TS throughout the simulation.

Network Pharmacology

Identification of Potential Targets Through Network Pharmacology Analysis

Network pharmacology is a multidisciplinary approach that explores the interactions of biological systems, drugs and diseases to provide a holistic view of drug action and identify potential therapeutic effects (Hopkins, 2007). We have found 5383 potential malaria targets from Gene card and DesGenet and, after elimination and integration, 240 were selected. Swiss target database revealed 99 malarial targets of the 3 selected phytochemicals (Cuminal, Sabinene, and Phellandral). On removal of duplicates and the addition of malarial-associated targets 23 common targets were found, that represent probable overlap between compounds and the disease targets (Supplementary table 7). These shared proteins were considered as potential targets of the chosen plant-based molecules against malaria (Figure 7A). A protein-protein interaction network identified the connections between various proteins within a cell that are crucial for insight into cellular functions and disease mechanisms (Wang et al., 2022; 2023).

Compound Target Network Interactions

The compound-target network was constructed using Cytoscape to analyze the interaction between the 3 active compounds and their potential targets (Figure B7). The interaction analysis showed that one active ingredient can affect multiple targets, while the same target may interact with more than one active compound. This reflects the multi-target and multi-components effects of the phytochemicals for the treatment of malaria.

Construction of Protein–Protein Interaction (PPI) Network and Hub Genes

The Protein–protein-Interaction network of 23 common target genes was constructed using STRING database (Figure 7C). After visualizing the PPI network in Cytoscape, 185 nodes with 300 edges were found (Figure 7D). The CytoHubba plugin was employed to identify hub genes and among the 12 available methods the degree method was chosen to identify the top ranked hub genes. The following genes, MPO, TNF, IL6, ALB, HMOX1, GSR, NOS2, IDO1, CXCL8, and PTPRC have emerged as the top-ranked genes due to their significantly high values. After the identification of the first stage node genes, Cuminal was found effective against ALB, MPO, PTPRC, CXCL8, NOS2, HMOX1 and GSR.

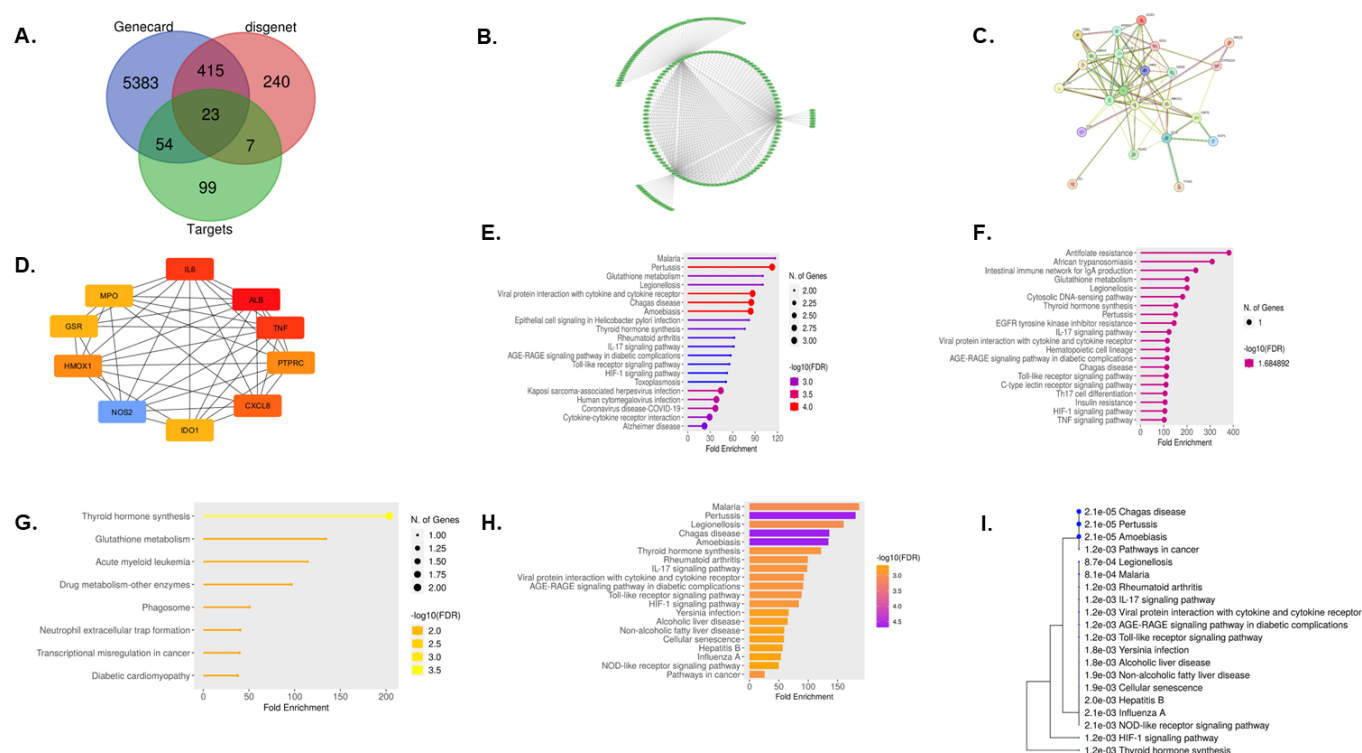


Figure 7. **A.** The diagrammatic representation of Venn diagram of target genes and 3 Drug targets from Genecards, DisGenet and Swisstar prediction data. **B.** The Cytoscape analysis representing compound target pathway network of related targets and genes. **C.** String Database representing protein-protein interactions of compound target. **D.** The top 10 hub genes from CytoHubba plugin of Cytoscape analysis. **E.** David Database represents Gene ontology plots of biological process of top 10 hub genes from Cytoscape analysis. **F.** David Database represents Gene ontology plots of Cellular Components of top 10 hub genes from Cytoscape analysis. **G.** David Database represents Gene ontology plots Molecular function of top 10 hub genes from Cytoscape analysis. **H.** Enrichment analyses of targeted genes including KEGG pathways. **I.** Enrichment analysis of targeted genes clustering between pathways.

Gene Ontology and Pathway Enrichment Analysis

Gene Ontology is a structured and standardized system used to categorize and describe the functions of genes and their products (Zhou et al., 2017) to identify the molecular mechanisms of active compounds, GO annotations and analysis of the KEGG pathway were carried out on a set of 99 targets associated with malaria. The GO analysis recognized various biological processes (BP) (Figure 7E), which include the regulation of malaria disease, the transport system, the positive regulation of cell communication, the positive regulation of signaling pathways, the regulation of programmed cell death and blood circulation; two cellular components (CC) (Figure 7F), including extracellular exosomes, membrane raft and one molecular function (MF) (Figure 7G) such as cytokine activity. The cutoff value of $P < 0.05$ was applied to select top 20 GO annotations (BP, CC, MF) and lollipop plots were drawn.

KEGG analysis predicted eight pathways associated with significant fold enrichment values and false discovery rate, such as malaria, pertussis and Chagas disease, indicating a strong involvement of these pathways in infectious diseases; other pathways include thyroid hormone synthesis, IL-17, and the AGE-RAGE signaling pathway involved in diabetic complications, metabolic regulations, and immune response (Figure 7H). A hierarchical clustering tree was constructed to

A.

Yersinia infection
with cytokine and chemokine receptor disease
Alcoholic liver disease
Pathways in cancer
Hepatitis B
Legionnaires disease
HIF-1 signaling pathway
Pertussis
Influenza A
IL-17 signaling pathway
NOD-like receptor signaling pathway
Toll-like receptor signaling pathway
Cellular senescence
Amoebiasis
Malaria
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications
Viral protein interaction with cytokine and chemokine receptor disease

B.

IL-17 signaling pathway
IL-17 receptor
IL-17A
IL-17F
IL-17RA
IL-17RB
IL-17RC
IL-17RD
IL-17RE
IL-17RF
IL-17RG
IL-17RH
IL-17RI
IL-17RII
IL-17RIII
IL-17RIV
IL-17RV
IL-17RW
IL-17RX
IL-17RY
IL-17RZ
IL-17RA1
IL-17RA2
IL-17RA3
IL-17RA4
IL-17RA5
IL-17RA6
IL-17RA7
IL-17RA8
IL-17RA9
IL-17RA10
IL-17RA11
IL-17RA12
IL-17RA13
IL-17RA14
IL-17RA15
IL-17RA16
IL-17RA17
IL-17RA18
IL-17RA19
IL-17RA20
IL-17RA21
IL-17RA22
IL-17RA23
IL-17RA24
IL-17RA25
IL-17RA26
IL-17RA27
IL-17RA28
IL-17RA29
IL-17RA30
IL-17RA31
IL-17RA32
IL-17RA33
IL-17RA34
IL-17RA35
IL-17RA36
IL-17RA37
IL-17RA38
IL-17RA39
IL-17RA40
IL-17RA41
IL-17RA42
IL-17RA43
IL-17RA44
IL-17RA45
IL-17RA46
IL-17RA47
IL-17RA48
IL-17RA49
IL-17RA50
IL-17RA51
IL-17RA52
IL-17RA53
IL-17RA54
IL-17RA55
IL-17RA56
IL-17RA57
IL-17RA58
IL-17RA59
IL-17RA60
IL-17RA61
IL-17RA62
IL-17RA63
IL-17RA64
IL-17RA65
IL-17RA66
IL-17RA67
IL-17RA68
IL-17RA69
IL-17RA70
IL-17RA71
IL-17RA72
IL-17RA73
IL-17RA74
IL-17RA75
IL-17RA76
IL-17RA77
IL-17RA78
IL-17RA79
IL-17RA80
IL-17RA81
IL-17RA82
IL-17RA83
IL-17RA84
IL-17RA85
IL-17RA86
IL-17RA87
IL-17RA88
IL-17RA89
IL-17RA90
IL-17RA91
IL-17RA92
IL-17RA93
IL-17RA94
IL-17RA95
IL-17RA96
IL-17RA97
IL-17RA98
IL-17RA99
IL-17RA100
IL-17RA101
IL-17RA102
IL-17RA103
IL-17RA104
IL-17RA105
IL-17RA106
IL-17RA107
IL-17RA108
IL-17RA109
IL-17RA110
IL-17RA111
IL-17RA112
IL-17RA113
IL-17RA114
IL-17RA115
IL-17RA116
IL-17RA117
IL-17RA118
IL-17RA119
IL-17RA120
IL-17RA121
IL-17RA122
IL-17RA123
IL-17RA124
IL-17RA125
IL-17RA126
IL-17RA127
IL-17RA128
IL-17RA129
IL-17RA130
IL-17RA131
IL-17RA132
IL-17RA133
IL-17RA134
IL-17RA135
IL-17RA136
IL-17RA137
IL-17RA138
IL-17RA139
IL-17RA140
IL-17RA141
IL-17RA142
IL-17RA143
IL-17RA144
IL-17RA145
IL-17RA146
IL-17RA147
IL-17RA148
IL-17RA149
IL-17RA150
IL-17RA151
IL-17RA152
IL-17RA153
IL-17RA154
IL-17RA155
IL-17RA156
IL-17RA157
IL-17RA158
IL-17RA159
IL-17RA160
IL-17RA161
IL-17RA162
IL-17RA163
IL-17RA164
IL-17RA165
IL-17RA166
IL-17RA167
IL-17RA168
IL-17RA169
IL-17RA170
IL-17RA171
IL-17RA172
IL-17RA173
IL-17RA174
IL-17RA175
IL-17RA176
IL-17RA177
IL-17RA178
IL-17RA179
IL-17RA180
IL-17RA181
IL-17RA182
IL-17RA183
IL-17RA184
IL-17RA185
IL-17RA186
IL-17RA187
IL-17RA188
IL-17RA189
IL-17RA190
IL-17RA191
IL-17RA192
IL-17RA193
IL-17RA194
IL-17RA195
IL-17RA196
IL-17RA197
IL-17RA198
IL-17RA199
IL-17RA200
IL-17RA201
IL-17RA202
IL-17RA203
IL-17RA204
IL-17RA205
IL-17RA206
IL-17RA207
IL-17RA208
IL-17RA209
IL-17RA210
IL-17RA211
IL-17RA212
IL-17RA213
IL-17RA214
IL-17RA215
IL-17RA216
IL-17RA217
IL-17RA218
IL-17RA219
IL-17RA220
IL-17RA221
IL-17RA222
IL-17RA223
IL-17RA224
IL-17RA225
IL-17RA226
IL-17RA227
IL-17RA228
IL-17RA229
IL-17RA230
IL-17RA231
IL-17RA232
IL-17RA233
IL-17RA234
IL-17RA235
IL-17RA236
IL-17RA237
IL-17RA238
IL-17RA239
IL-17RA240
IL-17RA241
IL-17RA242
IL-17RA243
IL-17RA244
IL-17RA245
IL-17RA246
IL-17RA247
IL-17RA248
IL-17RA249
IL-17RA250
IL-17RA251
IL-17RA252
IL-17RA253
IL-17RA254
IL-17RA255
IL-17RA256
IL-17RA257
IL-17RA258
IL-17RA259
IL-17RA260
IL-17RA261
IL-17RA262
IL-17RA263
IL-17RA264
IL-17RA265
IL-17RA266
IL-17RA267
IL-17RA268
IL-17RA269
IL-17RA270
IL-17RA271
IL-17RA272
IL-17RA273
IL-17RA274
IL-17RA275
IL-17RA276
IL-17RA277
IL-17RA278
IL-17RA279
IL-17RA280
IL-17RA281
IL-17RA282
IL-17RA283
IL-17RA284
IL-17RA285
IL-17RA286
IL-17RA287
IL-17RA288
IL-17RA289
IL-17RA290
IL-17RA291
IL-17RA292
IL-17RA293
IL-17RA294
IL-17RA295
IL-17RA296
IL-17RA297
IL-17RA298
IL-17RA299
IL-17RA300
IL-17RA301
IL-17RA302
IL-17RA303
IL-17RA304
IL-17RA305
IL-17RA306
IL-17RA307
IL-17RA308
IL-17RA309
IL-17RA310
IL-17RA311
IL-17RA312
IL-17RA313
IL-17RA314
IL-17RA315
IL-17RA316
IL-17RA317
IL-17RA318
IL-17RA319
IL-17RA320
IL-17RA321
IL-17RA322
IL-17RA323
IL-17RA324
IL-17RA325
IL-17RA326
IL-17RA327
IL-17RA328
IL-17RA329
IL-17RA330
IL-17RA331
IL-17RA332
IL-17RA333
IL-17RA334
IL-17RA335
IL-17RA336
IL-17RA337
IL-17RA338
IL-17RA339
IL-17RA340
IL-17RA341
IL-17RA342
IL-17RA343
IL-17RA344
IL-17RA345
IL-17RA346
IL-17RA347
IL-17RA348
IL-17RA349
IL-17RA350
IL-17RA351
IL-17RA352
IL-17RA353
IL-17RA354
IL-17RA355
IL-17RA356
IL-17RA357
IL-17RA358
IL-17RA359
IL-17RA360
IL-17RA361
IL-17RA362
IL-17RA363
IL-17RA364
IL-17RA365
IL-17RA366
IL-17RA367
IL-17RA368
IL-17RA369
IL-17RA370
IL-17RA371
IL-17RA372
IL-17RA373
IL-17RA374
IL-17RA375
IL-17RA376
IL-17RA377
IL-17RA378
IL-17RA379
IL-17RA380
IL-17RA381
IL-17RA382
IL-17RA383
IL-

Figure 8. Enrichment analyses of targeted genes including **A.** signaling pathways and **B.** pathways interaction network

Malaria continues to be a significant global health concern, with *P. falciparum* responsible for 90% of infections and showing resistance to numerous existing medications (Muregi et al., 2011) (Kamaraj et al., 2023). Artemisinin-based combination therapies (ACTs) serve as the main treatment, merging rapidly acting ART derivatives with longer-acting partner medications. Investigating traditional medicinal plants presents a hopeful option to address the increasing issue of drug resistance (Eastman and Fidock, 2009). The combination of indigenous knowledge with rigorous scientific inquiry can pave the way for the development of novel and effective anti-malarial interventions. *Z. armatum* DC possesses a range of biological activities, including antibacterial, antifungal, antiviral, anthelmintic, cytotoxic, anti-inflammatory, mosquito larvicidal, hepatoprotective, antinociceptive, immunomodulatory, antioxidant, and cardiovascular effects (Mukthar and Kalsi, 2018). Therefore, the present study explored the protective effects of 40 phytochemicals from *Z. armatum* against malaria via molecular docking, molecular dynamic simulations and network pharmacology analysis. We have identified three important compounds (Cuminal, Sabinene and Phellandral) in *Z. armatum* with strong anti-malarial potential by inhibiting the activity of essential proteins involved in the pathogenesis of malaria. The 40 bioactive compounds were initially

screened using Lipinski's rule of five and only one compound (Tambuletin) showed three Lipinski violations while all the other compounds adhered to the rule. According to Lipinski's rule of five, Cuminal exhibited highest binding free energy that is an indicative of its excellent bioavailability and better function when taken orally as it will be able to cross the cell membrane (Singh and Verma, 2013).

Cuminal had the most favorable binding energy among the phytochemicals that were evaluated, suggesting a robust and long-lasting interaction with the target malarial proteins. This implies that Cuminal might have strong inhibitory effects, which would make it a viable medication option. In addition to having a higher binding affinity than other substances, Cuminal completely complied with Lipinski's Rule of Five, which indicates high oral bioavailability. Compounds with several Lipinski violations, such as Tambuletin, were deemed less appropriate for oral administration because of the possibility of poor permeability or absorption. Since their advantageous pharmacokinetic characteristics increase the likelihood of a successful medication development process, substances with zero or few violations were given priority. This criterion was crucial in reducing the number of potential candidates for additional molecular docking and pharmacokinetics prediction.

Prediction of the toxic potential of possible drug candidates is one of the most crucial elements in contemporary drug discovery. The toxicity analysis revealed that the LD50 values of the studied compounds ranged from 3 mg/kg (class 4 toxicity) to 70000 mg/kg (class 6 toxicity) (Ruiz et al., 2012). The α -Amyrins showed the highest LD50 value that indicated its low toxicity potential; however, it is proven highly immunotoxic. Cuminal, Sabinene and Phellandral showed nontoxic or mildly toxic effects whereas sulfadoxine exhibited slightly carcinogenic potential prompting serious safety concerns that resulted in its removal from further consideration. Following this toxicity assessment, only compounds categorized as non-toxic or mildly toxic were selected, culminating in the identification of 21 compounds for advanced molecular docking studies.

The results of molecular docking analysis revealed the strong binding of Pf AMA-1 (1Z40) with Cuminal (-5.9kcal/mol), Pf GST(1OKT) with Sabinene (-7.1 kcal/mol), and Pf DHFR with Phellandral (-5.5 kcal/mol). In addition to the binding energy, the interacting amino acid residues of the target protein and the hydrogen bond energy play an important role in determining the effect of selected ligand on the protein target. Cuminal has been investigated to interact with 3 amino acid residues of the malarial antigen PfAMA-1, Sabinene to interact with 6 amino acid residues of Pf GST, and Phellandral interacts with 3 amino acids of the Pf DHFR which shows increased specificity and stability of molecular structures. The standard drug, sulfadoxine, did not demonstrate an interaction with Pf AMA-1 (1Z40) and Pf GST (1OKT) (Tables 4, 5 and 6) (Jha et al., 2010). Cuminal exhibits strong affinity and stability through interactions involving hydrogen bonding, Pi-alkyl, and Pi-anion, reinforcing its potential for further drug development. The numerous

hydrogen bonds of sabinene suggest favorable binding alignment and the possibility of significant inhibitory effects. The mixed bonding types of Phellandral indicate a level of moderate stability and specificity at the active site. Although sulfadoxine did not demonstrate significant binding to PfAMA-1 or PfGST in our docking study, it was used as a reference drug due to its established clinical use against *P. falciparum*. This further confirms the accuracy of the docking conducted in your research. The main target is dihydropteroate synthase (DHPS), involved in the folate synthesis pathway, rather than the proteins investigated in this study. Consequently, the lack of significant interactions with AMA-1 or GST does not undermine its role as a comparator; instead, it emphasizes the uniqueness of our target-based methodology. Artesunate, exhibiting robust binding affinities with all three targets and varied interactions, acts as a positive control, verifying that the proteins you selected are appropriate and that the docking approach effectively identifies significant interactions. In summary, these findings advocate for the potential repositioning or development of Cuminal, Sabinene, and Phellandral as innovative inhibitors, while underscoring the importance of multi-target binding in improving antimalarial effectiveness and decreasing the risk of resistance.

Molecular dynamics simulation studies are frequently used as a rational approach in predictive studies of potential ligand–receptor interactions to aid the process of drug design and development (Salmaso and Moro, 2018). A molecular dynamics simulation via GROMACS was performed and the RMSF, RMSD, and Rg values were measured to assess the stability and flexibility of docked complexes such as Cuminal and PfAMA-1, Sabinene and Pf GST, and Phellandral and Pf DHFR. All the three ligands showed small deviations in the binding energies which reveals the stable interactions. Sabinene shows the lowest deviations, suggesting a very strong and stable interaction, while the RMSD analysis validate structural consistency across all complexes. Phellandral notably causes a little compaction, which may contribute to increased structural rigidity, according to the Radius of Gyration (Rg) profiles, which indicate that ligand binding is not affecting the protein's overall folding. Likewise, the decreasing SASA for Phellandral suggests a tighter packing and less flexibility, whereas the constant SASA values for Cuminal and Sabinene show sustained solvent exposure. The RMSF data further show that, as a result of ligand-induced stability of key residues, fluctuations are mostly limited to the terminal and loop regions, with little movement seen near the active sites. These results collectively imply that all three ligands preserve the structural integrity of 3 proteins while producing complexes that are dynamically stable and energetically favorable, supporting their possible function in blocking parasite detoxification processes.

The main objective of this research was to create and evaluate potential compounds derived from *Z. armatum* that could imitate or enhance the therapeutic mechanisms of artemisinin, potentially aiming for the same pathways or producing multi-target effects. The isolated compounds from *Z. armatum* were assessed based

on their anticipated binding affinities, their ability to produce reactive oxygen species, and their interaction with crucial proteins involved in parasite metabolism and survival. These identified compounds might work similarly to artemisinin by inducing oxidative stress in the parasite or complement artemisinin by targeting other essential pathways for the parasite's survival, thus creating a synergistic effect in combined therapies (Omari et al., 2021).

One of the phytochemicals proven to be effective in our study was Cuminal. It is also known as Cuminaldehyde (CA) that regulates the formation of genes involved in synaptic plasticity and neurotrophic factors and thus modulates the process of memory and learning and causes neuroprotective effects (Omari et al., 2021). CA (25–100 mg/kg) helps to reduce inflammation by decreasing the serum concentration of IL-1 β and TNF- α in chronic constriction injury (CCI)-induced neuropathy (Koohsari et al., 2020). Recently, it has been implicated in the treatment of diabetes by affecting insulin levels, however, further research is warranted to identify its role in diabetes and other disorders such as malaria (Duraismy et al., 2022).

Another important bioactive compound that has been shown to be effective against malaria in our study is Sabinene, which is known to reduce muscle atrophy by affecting the ROS-facilitated MAPK/MuRF-1 signaling pathway (Ryu et al., 2019). Sabinene treatment also decreased reactive oxygen species (ROS) and attenuated the levels of different antioxidant enzymes such as lipid peroxidase, GST and catalase in yeast cells (Sharma et al., 2019). As plasmodial GST is an important target of antimalarial drugs and in our study Sabinene also showed a stable interaction with Pf GST, so it may act as a promising agent for the treatment of malaria, however, further *in vivo* and clinical studies are required to validate its role in the treatment of malaria.

In the same study, exposure to Sabinene prevented the angiogenesis (Sharma et al., 2019). As angiogenesis is an important hallmark of cancer, it is postulated that Sabinene may cause beneficial effects in preventing cancer by inhibiting angiogenesis.

The essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* is known to possess Phellandral and Cuminal in reasonable concentrations (1.4–4.7%) and this oil has been shown to be beneficial in preventing the growth of phytopathogenic fungi, so it is possible that Phellandral may act as an antifungal agent (Barra et al., 2010). Our results showed the inhibitory potential of Phellandral against Pf DHFR; however, the literature is scarce regarding the role of this very compound in disease treatment and prevention; therefore, it may serve as a novel research target for the management of malaria and other pathogenic conditions.

These phytochemicals target various important proteins that play a crucial role in malaria and these proteins are identified via network pharmacology method. The identified proteins are required for the normal functioning of the malarial parasite. According to the network pharmacology approach, Cuminal target proteins involve ALB, PTPRC, CXCL8, NOS2, HMOX1, MPO, and GSR, Sabinene targets for the

Sabinene include MPO, TNF, IDO1, and NOS2, whereas Phellandral mainly through MPO, IL6, PTPRC and NOS2. All compounds target nitric oxide synthase (NOS2) and myeloperoxidase (MPO). NOS2 modulated nitric oxide (NO) and NO helps fight against malarial parasite (Levesque et al., 2010) by producing oxidative stress and inhibiting its growth, and it also activates the immune system to produce pro-inflammatory cytokines and clear the parasite. However, increased production of NO can cause damaging effects in the host and cause ROS production, leading to oxidative stress and inflammation in the host; therefore, an intricate balance in NO production of NO is required to combat pathogens (Kotepui et al., 2023). The phytochemicals selected in this study can prevent the NOS2 thus regulating the production of NO in the event of malaria.

MPO is mainly produced by monocytes and is neutrophils and involved in ROS production; however, its exact role in malaria is still unknown. Increased levels of MPO are observed in malarial patients with increased parasitemia, and regional/altitudinal differences were observed between Santa, Bambili, and Bamenda (Ngum et al., 2023).

CONCLUSION

The present study explored the therapeutic potential of 40 natural bioactive compounds of *Z. armatum* against the *P. falciparum*. Molecular docking showed the stable complexes of three phytoconstituents such as Cuminal, Sabinene, and Phellandral against PfAMA-1, Pf GST, and Pf DHFR, respectively, which reveals their potential in mitigating malaria. Molecular dynamic simulations and network pharmacology analysis further confirmed the role of Cuminal, Sabinene, and Phellandral in inhibiting antigen and enzymes crucial for the pathogenesis of *P. falciparum*. Our study provides a strong basis for further *in vitro* and *in vivo* experimentation to validate the potential of these bioactive compounds in the treatment of malaria alone or in combination with available treatment options.

REFERENCES

- Ahmad, A., Misra, L. N., and Gupta, M. M. 1993. Hydroxyalk-(4Z)-enoic acids and volatile components from the seeds of *Zanthoxylum armatum*. *Journal of Natural Products* 56(4), 456-460.
- Aminake, M. N., Mahajan, A., Kumar, V., Hans, R., Wiesner, L., Taylor, D., de Kock, C., Grobler, A., Smith, P. J., and Kirschner, M. 2012. Synthesis and evaluation of hybrid drugs for a potential HIV/AIDS-malaria combination therapy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(16), 5277–5289. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.06.045>
- Arunkumar, S., Ramalakshmi, N., Banu Priya, S., Hemalatha, B., Mani Megalai, P., Padma, K., and Jayashree, S. (2018). In silico design, docking, and synthesis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Drug Invention Today*, 10(1), 1–5.
- Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., and Angioni, A. 2010. Chemical variability, antifungal and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oil from Sardinia. *Natural Product Communications*, 5(2), 329–335. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500232SCIRP+1SCIRP+1>
- Barile, F. A. 1996. Drug toxicity assessment. En *In vitro* methods in pharmaceutical research (pp. 33–50). Academic Press.
- Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., and Preissner, R. 2018. ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W257–W263. <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>

- Basu, S., and Sahi, P. K. 2017. Malaria: An update. *The Indian Journal of Pediatrics*, 84(7), 521–528. <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2332-2>
- Barkatullah, M. I., Jelani, G., and Ahmad, I. 2014. Leaf, stem bark and fruit anatomy of *Zanthoxylum armatum* DC. (Rutaceae). *Pakistan Journal of Botany*, 46(4), 1343–1349.
- Citaristi, I. (2022). World Health Organization—WHO. En *The Europa Directory of International Organizations 2022* (pp. 380–395). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781003292548-79>
- Daxon, B. 2019. Severe perioperative hypoxemic respiratory failure. En *A48. Critical Care Case Reports: Causes and Complications of Acute Respiratory Failure*. American Thoracic Society. <https://www.atsjournals.org/doi/book/10.1164/ajrcem-conference.2019.A48atsjournals.org>
- Duraisamy, K., Leelavinothan, P., Ellappan, P., Balaji, T. D. S., Rajagopal, P., Jayaraman, S., and Babu, S. 2022. Cuminaldehyde ameliorates hyperglycemia in diabetic mice. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 14(4), 24. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1404024ResearchGate+1PubMed+1>
- Dhami, A., Palariya, D., Singh, A., Kumar, R., Prakash, O., Kumar, R., and Pant, A. 2018. Chemical composition, antioxidant, *in vitro* anti-inflammatory and antibacterial activity of seeds essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC. Collected from two different altitudes of Kumaun region, Uttarakhand. *Int. J. Chem. Stud.*, 6(6), 363–370.
- Eastman, R. T., and Fidock, D. A. 2009. Artemisinin-based combination therapies: A vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nature Reviews Microbiology*, 7(12), 864–874. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2239OUCI+1Nature+1>
- Fikadu, M., and Ashenafi, E. 2023. Malaria: An overview. *Infection and Drug Resistance*, 16, 3339–3347. <https://doi.org/10.2147/IDR.S408382>
- Francis, J. A., Shalauddin, M., Ridzwan, N. F. W., Mohamad, S. B., Basirun, W. J., and Tayyab, S. 2020. Interaction mechanism of an antimalarial drug, sulfadoxine with human serum albumin. *Spectroscopy Letters*, 53(5), 391–405.
- Greenwood, B. (1997). The epidemiology of malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91(7), 763–769. <https://doi.org/10.1080/00034983.1997.11813211PubMed>
- Guadie, M., Molla, E., Mekonnen, M., and Cerdà, A. 2020. Effects of soil bund and stone-faced soil bund on soil physicochemical properties and crop yield under rain-fed conditions of Northwest Ethiopia. *Land*, 9(1), 13. <https://doi.org/10.3390/land9010013>
- Hopkins, A. L. (2007). Network pharmacology. *Nature Biotechnology*, 25(10), 1110–1111. <https://doi.org/10.1038/nbt1007-1110PubMed+3discovery.dundee.ac.uk+3Nature+3>
- Huey, R., Morris, G. M., and Forli, S. 2012. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A tutorial. The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory.
- Iqbal, I., and Hamayun, M. 2004. Studies on the traditional uses of plants of Malam Jabba valley, District Swat, Pakistan. *Ethnobotanical Leaflets*, 2004(1), 15.
- Jha, P. K., Sknepnek, R., Guerrero-García, G. I., and Olvera de la Cruz, M. 2010. A graphics processing unit implementation of Coulomb interaction in molecular dynamics. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(10), 3058–3065. <https://doi.org/10.1021/ct100260z>
- Jindal, D., and Rani, V. 2023. In silico studies of phytoconstituents from *Piper longum* and *Ocimum sanctum* as ACE2 and TMRSS2 inhibitors: Strategies to combat COVID-19. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(6), 2618–2635. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04294-7>
- Kumari, R., Mishra, R. C., Yadav, S., and Yadav, J. P. 2019. Exploring molecular docking studies of alanine racemase inhibitors from *Elettaria cardamomum*. *Current Enzyme Inhibition*, 15(2), 91–102. <https://doi.org/10.2174/1573408015666190619120643OUCI>
- Khan, A., Rahman, M., and Islam, M. (2008). Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of amblyone isolated from *Amorphophallus campanulatus*. *Indian Journal of Pharmacology*, 40(1), 41–44. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.40487>
- Khan, T., Dixit, S., Ahmad, R., Raza, S., Azad, I., Joshi, S., and Khan, A. R. (2017). Molecular docking, PASS analysis, bioactivity score prediction, synthesis, characterization and biological activity evaluation of a functionalized 2-butanone thiosemicarbazone ligand and its complexes. *Journal of Chemical Biology*, 10(3), 91–104. <https://doi.org/10.1007/s12154-017-0167-ySpringerLink>
- Koohsari, S., Sheikholeslami, M. A., Parvardeh, S., Ghafghazi, S., Samadi, S., Poul, Y. K., Pouriran, R., and Amiri, S. 2020. Antinociceptive and antineuropathic effects of Cuminaldehyde, the major constituent of *Cuminum cyminum* seeds: Possible mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 255, 112786. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112786>
- Khanal, P. (2021). Antimalarial and anticancer properties of artesunate and other artemisinins: current development. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 152, 387–400.
- Kotepui, K. U., Mahittikorn, A., Wilairatana, P., Masangkay, F. R., and Kotepui, M. 2023. Association between *Plasmodium* infection and nitric oxide levels: A systematic review and meta-analysis. *Antioxidants*, 12(10), 1868. <https://doi.org/10.3390/antiox12101868media.malariaworld.org+2MDPI+2tm.mahidol.ac.th+2>
- Kamaraj, C., Ragavendran, C., Prem, P., Naveen Kumar, S., Ali, A., Kazmi, A., Ullah, A., Chandra Satish Kumar, R., Khan, S. U., and Luna-Arias, J. P. 2023. Exploring the therapeutic potential of traditional antimalarial and antidengue plants: A mechanistic perspective. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2023, 1860084. <https://doi.org/10.1155/2023/1860084>

- Levesque, M. C., Hobbs, M. R., O'Loughlin, C. W., Chancellor, J. A., Chen, Y., Tkachuk, A. N., Booth, J., Patch, K. B., Allgood, S., Pole, A. R., Fernandez, C. A., Mwaikambo, E. D., Mutabingwa, T. K., Fried, M., Sorensen, B., Duffy, P. E., Granger, D. L., Anstey, N. M., and Weinberg, J. B. 2010. Malaria severity and human nitric oxide synthase type 2 (NOS2) promoter haplotypes. *Human Genetics*, 127(2), 163–182. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0753-3>
- Malami, I., Jagaba, N. M., Abubakar, I. B., Muhammad, A., Alhassan, A. M., Waziri, P. M., Yahaya, I. Z. Y., Mshelia, H. E., and Mathias, S. N. 2020. Integration of medicinal plants into the traditional system of medicine for the treatment of cancer in Sokoto State, Nigeria. *Heliyon*, 6(3), e03501. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03501>
- Muhammed, D., Adebiyi, Y. H., Odey, B. O., Alawode, R. A., Lawal, A., Okunlola, B. M., Ibrahim, J., and Berinyuy, E. B. 2021. *Dennettia tripetala* (pepper fruit): A review of its ethno-medicinal use, phyto-constituents, and biological properties. *GSC Advanced Research and Reviews*, 6(3), 35–43. <https://doi.org/10.30574/gscarr.2021.6.3.0089>
- Muregi, F. W., Kirira, P. G., and Ishih, A. 2011. Novel rational drug design strategies with potential to revolutionize malaria chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry*, 18(1), 113–143. <https://doi.org/10.2174/092986711793979742>
- Mukhtar, H. M., and Kalsi, V. 2018. A review on medicinal properties of *Zanthoxylum armatum* DC. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(5), 2131–2138. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2018.00395.5>
- Miller, L. H., Good, M. F., and Milon, G. 1994. Malaria pathogenesis. *Science*, 264(5167), 1878–1883. <https://doi.org/10.1126/science.8009217>
- Narwal, S., Dhanda, T., Sharma, P., Sharma, V., Dhankhar, S., Garg, N., Ghosh, N. S., and Rani, N. 2024. Current therapeutic strategies for Chagas disease. *Anti-Infective Agents*, 22(1), 20–30. <https://doi.org/10.2174/2211352519666221228120031>
- Najmi, A., Javed, S. A., Al Bratty, M., and Alhazmi, H. A. 2022. Modern approaches in the discovery and development of plant-based natural products and their analogues as potential therapeutic agents. *Molecules*, 27(1), 349. <https://doi.org/10.3390/molecules27010349>
- Ndombera, F., Maiyoh, G., and Tuei, V. 2019. Pharmacokinetic, physicochemical and medicinal properties of N-glycoside anti-cancer agent more potent than 2-deoxy-D-glucose in lung cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370(3), 1–10
- Ngum, N. H., Fakeh, N. B., Lem, A. E., and Mahamat, O. 2023. Prevalence of malaria and associated clinical manifestations and myeloperoxidase amongst populations living in different altitudes of Mezam division, North West Region, Cameroon. *Malaria Journal*, 22, 20. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04438-6PMC+1>
- Obonyo, D. O. 2022. Antibody-mediated natural killer cell function against *Plasmodium falciparum* [Tesis doctoral, Open University (Reino Unido)].
- Ogony, J. O. 2021. Correlates and incidence of *Plasmodium falciparum* among HIV infected and HIV non-infected children below 5 years in Kisumu County, Kenya [Tesis de maestría, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology].
- Omari, Z., Sasaki, K., Sabti, M., Bejaoui, M., Hafidi, A., Gadhi, C., and Isoda, H. 2021. Dietary administration of cuminaldehyde induces neuroprotective and learning and memory enhancement effects in aging mice. *Aging (Albany NY)*, 13(2), 1671–1685. <https://doi.org/10.18632/aging.202516>
- Pan American Health Organization. 2017a. Epidemiological alert: Increase in cases of malaria. PAHO/WHO. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-feb-15-phe-epi-alert-malaria.pdf>
- Pan American Health Organization (PAH). 2017b. Epidemiological alert: Increase in cases of malaria. PAHO/WHO. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-feb-15-phe-epi-alert-malaria.pdf>
- Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., and Moretti, M. D. L. 2002. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, 9(8), 721–726. <https://doi.org/10.1078/094471102321621322>
- Pollastri, M. P. 2010. Overview on the Rule of Five. *Current Protocols in Pharmacology*, 49, 9.12.1–9.12.18. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0912s49>
- Pomaznoy, M., Ha, B., and Peters, B. 2018. GOnet: A tool for interactive Gene Ontology analysis. *BMC Bioinformatics*, 19, 470. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2533-3tools.dice-database.org+6PubMed+6ResearchGate+6>
- Phillips, R. E., and Pasvol, G. (1992). Anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. *Baillière's Clinical Haematology*, 5(2), 315–330. [https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(11\)80022-3](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(11)80022-3)
- Phuyal, N., Jha, P. K., Raturi, P. P., and Rajbhandary, S. 2019. *Zanthoxylum armatum* DC.: Current knowledge, gaps and opportunities in Nepal. *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 326–341. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.035>
- Prugnolle, F., Durand, P., Ollomo, B., Duval, L., Arieu, F., Arnathau, C., Gonzalez, J.-P., Leroy, E., and Renaud, F. 2011. A fresh look at the origin of *Plasmodium falciparum*, the most malignant malaria agent. *PLoS Pathogens*, 7(2), e1001283. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001283>
- Ram, S., More-Adate, P., Tagalpallewar, A. A., Pawar, A. T., Nagar, S., and Baheti, A. M. 2023. An *in-silico* investigation and network pharmacology-based approach to explore the anti-breast-cancer potential of *Tectaria coadunata* (Wall.) C. Chr. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2252091>
- Ruiz, P., Begliutti, G., Tincher, T., Wheeler, J., and Mumtaz, M. 2012. Prediction of acute mammalian toxicity using QSAR methods: A case study of sulfur mustard and its breakdown products. *Molecules*, 17(8), 8982–9001. <https://doi.org/10.3390/molecules17088982>

- Ryu, Y., Lee, D., Jung, S. H., Lee, K.-J., Jin, H., Kim, S. J., Lee, H. M., Kim, B., and Won, K.-J. 2019. Sabinene prevents skeletal muscle atrophy by inhibiting the MAPK–MuRF-1 pathway in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4955. <https://doi.org/10.3390/ijms20194955>
- Salmaso, V., and Moro, S. (2018). Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand–protein recognition process: An overview. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 923. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
- Singh, S. S., Gupta, A., and Verma, A. 2013. Molecular properties and bioactivity score of the *Aloe vera* antioxidant compounds—in order to lead finding. CAB Abstracts.
- Sharma, S., Sharma, A., and Gupta, U. 2021. Molecular docking studies on the anti-fungal activity of *Allium sativum* (garlic) against mucormycosis (black fungus) by BIOVIA Discovery Studio Visualizer 21.1.0.0. *Annals of Antivirals and Antiretrovirals*, 5(1), 28–32.
- Sharma, S., Gupta, J., Prabhakar, P. K., Gupta, P., Solanki, P., and Rajput, A. 2019. Phytochemical repurposing of natural molecule: Sabinene for identification of novel therapeutic benefits using in silico and *in vitro* approaches. *Assay and Drug Development Technologies*, 17(8), 339–351. <https://doi.org/10.1089/adt.2019.939>
- Shamshad, H., Bakri, R., and Mirza, A. Z. 2022. Dihydrofolate reductase, thymidylate synthase, and serine hydroxymethyltransferase: Successful targets against some infectious diseases. *Molecular Biology Reports*, 49(9), 6659–6691. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07768-3>
- Shah, S. S., Ahmed, S., Zhou, B., and Shi, L. 2024. A review on pharmacological activities and phytochemical constituents of *Zanthoxylum armatum* DC. *Natural Product Research*, 1–20.
- Tahita, M. C., Tinto, H., Menten, J., Ouedraogo, J.-B., Guiguemdé, R. T., van Geertruyden, J. P., Erhart, A., and D'Alessandro, U. 201. Clinical signs and symptoms cannot reliably predict *Plasmodium falciparum* malaria infection in pregnant women living in an area of high seasonal transmission. *Malaria Journal*, 12, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-164>
- Tabassum, S., Khalid, H. R., Haq, W. u., Aslam, S., Alshammari, A., Alharbi, M., Riaz Rajoka, M. S., Khurshid, M., and Ashfaq, U. A. 2022. Implementation of system pharmacology and molecular docking approaches to explore active compounds and mechanism of *Ocimum sanctum* against tuberculosis. *Processes*, 10(2), 298. <https://doi.org/10.3390/pr10020298MDPI>
- Tao, W., Xu, X., Wang, X., Li, B., Wang, Y., Li, Y., and Yang, L. 2013. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal Radix Curcumae formula for application to cardiovascular disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.09.051>
- ter Kuile, F. O., van Eijk, A. M., and Filler, S. J. 2007. Effect of sulfadoxine-pyrimethamine resistance on the efficacy of intermittent preventive therapy for malaria control during pregnancy: A systematic review. *JAMA*, 297(23), 2603–2616. <https://doi.org/10.1001/jama.297.23.2603>
- Tiwary, M., Naik, S., Tewary, D. K., Mittal, P., and Yadav, S. 2007. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors. *Journal of vector borne diseases*, 44(3), 198.
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., and Berendsen, H. J. C. 2005. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1701–1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
- Vong, A. D.-Y., Hwang, S.-S., Chee, X. W. Z., and Sim, E. U.-H. 2022. Computational ligand–receptor docking simulation of piperine with apoptosis-associated factors. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 10(1), 38–44. <https://doi.org/10.7324/JABB.2021.100105>
- Wang, J., Uddin, M. N., Wang, R., Gong, Y.-H., and Wu, Y. 2022. Comprehensive analysis and validation of novel immune and vascular remodeling related genes signature associated with drug interactions in pulmonary arterial hypertension. *Frontiers in Genetics*, 13, 922213. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.922213>
- Wang, S., Wu, R., Lu, J., Jiang, Y., Huang, T., and Cai, Y. D. 2022. Protein–protein interaction networks as miners of biological discovery. *Proteomics*, 22(15–16), e2100190. <https://doi.org/10.1002/pmic.202100190>
- Warrell, D. A., Watkins, W. M., and Winstanley, P. A. 2017. Treatment and prevention of malaria. En *Essential Malariology* (4th ed., pp. 268–312). CRC Press.
- Zoete, V., Cuendet, M. A., Grosdidier, A., and Michielin, O. 2011. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 32(11), 2359–2368. <https://doi.org/10.1002/jcc.21816>
- Zhou, T., Yao, J., and Liu, Z. 2017. Gene ontology, enrichment analysis, and pathway analysis. En Z. Liu (Ed.), *Bioinformatics in aquaculture: Principles and methods* (pp. 150–168). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118782392>

Producción de enzimas proteolíticas a partir de microorganismos halófilos aislados de suelos salinos del sur de Sonora

Aguirre-Félix Azalea Fernanda¹, Martínez-Pérez Raúl Balam¹✉, Villa-Lerma Alma Guadalupe¹✉, Rodríguez-Ramírez Roberto¹✉, Plascencia-Jatomea Rigoberto²✉, Figueroa-López Alejandro Miguel³✉

¹ Instituto Tecnológico de Sonora Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Ciudad Obregón, Sonora

² Instituto Tecnológico de Sonora. Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente. Ciudad Obregón, Sonora

³ Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis Departamento de Ciencias Naturales y Exactas. Los Mochis, Sinaloa, México.

✉ Correspondencia: alma.villa@itson.edu.mx

Área Temática:
Ciencias Ambientales

Recibido: 24 de mayo, 2025

Aceptado: 16 de julio, 2025

Publicado: 28 de julio, 2025

Cita: Aguirre-Félix AF, Martínez-Pérez RB, Villa-Lerma AG, Rodríguez-Ramírez R, Plascencia-Jatomea R, y Figueroa-López AM. 2025. Producción de enzimas proteolíticas a partir de microorganismos halófilos aislados de suelos salinos del sur de Sonora. *Bioc Scientia* 1(2). <https://doi.org/10.63622/RBS.2509>



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Resumen: Los halófilos son microorganismos que se encuentran creciendo en ambientes con elevadas concentraciones de sal. En los últimos años se ha mostrado un creciente interés en el estudio de estos microorganismos por su gran potencial biotecnológico, principalmente en la obtención de enzimas de importancia en la industria. Las muestras analizadas fueron tomadas en puntos aleatorios de la costa de la Bahía de Santa Barbara, Sonora, México. Se identificó el crecimiento de 287 colonias en los medios de cultivo utilizados (agar marino 1217 y ATCC 2185) a concentraciones de NaCl de 0.5, 2 y 4 M, 35 colonias presentaron halo de hidrólisis en medio marino 0.5 M, 7 colonias en medio marino 1217 2 M y 4 colonias en medio ATCC 2185 2 M NaCl, todos enriquecidos con 2 % de leche descremada como inductor de la actividad proteolítica. Asimismo, se seleccionaron cinco cepas (5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11) en función de los mayores diámetros del halo de hidrólisis presentado en el medio con inductor. La determinación de la concentración de proteínas indicó que la cepa 5.3.8 presentaba la concentración más alta iniciando con 144.4555 µg/mL. Por otro lado, la mayor actividad proteolítica se identificó a partir de las 144 horas del proceso fermentativo, siendo la cepa 5.3.3 la que mostró la mayor actividad. Específicamente se encontraron actividades enzimáticas de: 0.2875, 0.0402, 0.2201, 0.2323 y 0.2035 U/mL para las cepas 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11. Estos resultados sugieren la presencia de cepas halófilas leves aisladas de suelos salinos con capacidad de producir proteasas con potencial biotecnológico.

Palabras clave: Halófilos, fermentación, enzimas, actividad proteolítica

Abstract: Halophiles are microorganisms that inhabit environments with high salt concentrations. In recent years, there has been growing interest in studying these microorganisms due to their biotechnological potential, particularly in the production of enzymes with industrial relevance. Samples were collected at Bahía de Santa Barbara, Sonora, Mexico. A total of 287 colonies were grown on Marine agar 1217 and ATCC 2185 agar at NaCl concentrations of 0.5, 2 and 4 M, 35 colonies showed hydrolysis halos on 0.5 M marine medium, 7 on 2 M marine medium, and 4 on 2 M ATCC 2185 medium, all of them supplemented with 2% skim milk as a proteolytic activity inducer. Five strains (5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8, and 4.2.11) were selected based on the size of the diameter of the hydrolysis halo observed on the inducer-containing medium. Protein concentration analysis indicated that strain 5.3.8 exhibited the highest concentration (144.46 µg/mL) since the beginning of fermentation. Proteolytic activity was detected specifically after 144 hours of fermentation, where strain 5.3.3 was the one showing the highest proteolytic activity. Enzymatic activity levels were 0.2875, 0.0402, 0.2201, 0.2323, and 0.2035 U/mL for strains 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8, and 4.2.11, respectively. These results suggest that slightly halophilic strains from saline soils were isolated representing a promising source of proteolytic enzymes with biotechnological potential.

Keywords: Halophiles, fermentation, enzymes, proteolytic activity

INTRODUCCIÓN

Se conoce como organismos extremófilos a aquellos cuya característica es la de poder desarrollarse en ambientes con condiciones extremas de temperatura, pH, salinidad, etc (Reang et al., 2024; Fahmy y El-Deeb, 2023). Dentro de este grupo se encuentran los halófilos, los cuales son microorganismos con la capacidad de desarrollarse en entornos con altas concentraciones de sal (Ruginescu et al., 2020) tales como suelos salinos, lagos salados, agua de mar, entre otros (Hardin y Simpson, 2018).

Los microorganismos halófilos pueden clasificarse según su requerimiento de cloruro de sodio (NaCl) en 3 grandes grupos: halófilos leves, que crecen óptimamente en concentraciones de 0.2-0.85 M (1-5 %) de NaCl, halófilos moderados, cuyo crecimiento óptimo ocurre entre 0.85-3.4 M (5-20 %) NaCl y halófilos extremos que se desarrollan en concentraciones de 3.4-5.1 M (20-30 %) NaCl (Abs Samad et al., 2017). Sin embargo, algunos autores han propuesto clasificaciones intermedias como, por ejemplo, Harding y Simpson (2018) quienes sugieren la categoría de halófilos limítrofes extremos (*borderline extreme halophiles*), que se caracterizan por desarrollarse en concentraciones de sal entre 1.5-4.0 M (9-24 %).

Se han identificado diversos microorganismos representativos de los tres dominios (Bacteria, Archaea y Eukarya) que pueden encontrarse en cada uno de los grupos de halófilos categorizados (Ruginescu et al., 2020). Entre las bacterias halófilas extremas destacan géneros como *Salinibacter* y *Bacillus*. En el caso de eucariotas, se han documentado especies de algas verdes como *Dunaliella*, así como diversas levaduras y hongos. Dentro de estos últimos se incluyen *Hortaea werneckii* y *Aureobasidium pullulans*, además de especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*. También se han registrado hongos filamentosos como *Wallemia ichthyophaga*, junto con protozoarios halófilos como *Halocafeteria seosinensis* (Ruginescu et al., 2020; Revankar et al., 2024; Chung et al., 2021).

La capacidad de los microorganismos halófilos para sobrevivir en condiciones hipersalinas se atribuye a una serie de adaptaciones fisiológicas, entre las que destacan dos estrategias principales: el uso de solutos compatibles y la acumulación de cloruro de potasio (KCl) en el citoplasma. El primer mecanismo implica la acumulación de grandes concentraciones de solutos orgánicos compatibles en el citoplasma, como la betaína para proporcionar un equilibrio osmótico a la célula, excluyendo lo más posible las sales del citoplasma (Deole y Hoff, 2020). Por otro lado, el segundo mecanismo involucra la acumulación intracelular de KCl tanto o más que las concentraciones de NaCl del medio para mantener un equilibrio osmótico. Si bien, esta última adaptación requiere un gasto energético moderado para la célula, supuso un cambio evolutivo de los microorganismos a nivel proteoma por las altas concentraciones de KCl, confinándolos así a hábitats hipersalinos (Reang et al., 2024).

Estas adaptaciones no solo permiten la supervivencia de los microorganismos halófilos, sino que también influyen en su metabolismo, incluyendo la producción

de enzimas funcionales bajo condiciones extremas. Debido a ello, estos microorganismos extremófilos producen enzimas de gran interés conocidas como haloenzimas, las cuales poseen la capacidad de soportar condiciones desfavorables tales como altas concentraciones de sal, pH alcalinos extremos y temperaturas elevadas, en comparación con las enzimas mesófilas (Reang *et al.*, 2024). Entre ellas, destacan las proteasas, enzimas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos, mostrando gran estabilidad incluso frente estas condiciones adversas (Raval *et al.*, 2015; Abd Samad *et al.*, 2017). Estas propiedades las convierten en herramientas de gran valor para procesos como la producción de detergentes, curtido de cuero, procesamiento de alimentos y la producción de hidrolizados de interés (Wang *et al.*, 2009; Sarwa *et al.*, 2024).

Dada su importancia industrial, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones sobre la obtención de enzimas proteolíticas a partir de microorganismos halófilos extremos (Khoshnevis *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2021; Benmebarek y Kharroub, 2023). Sin embargo, la producción a gran escala de este tipo de enzimas aún presenta limitaciones en comparación con otras extremoenzimas, principalmente debido a desafíos como la corrosión de los equipos ocasionada por las altas concentraciones salinas requeridas durante los cultivos (Mesbah, 2022).

En este contexto, y considerando la necesidad de identificar cepas nativas con potencial enzimático, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la producción de enzimas proteolíticas a partir de microorganismos halófilos aislados de suelos salinos del sur de Sonora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra

Las muestras de suelo fueron tomadas en puntos aleatorios de la costa de la Bahía de Santa Barbara, Sonora, México, con coordenadas: 26° 41' 8" N, 109° 36' 3" W. Posteriormente se transportaron al laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología enzimática del Instituto Tecnológico de Sonora en refrigeración y se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento.

Aislamiento y cultivo

El aislamiento de los microorganismos halófilos se llevó a cabo a partir de diluciones seriadas de siete muestras de suelo. Para ello se prepararon tubos de ensayo con 9 mL de soluciones salinas a concentraciones de 0.5, 2 y 4 M de NaCl, previamente esterilizadas. Se sembraron 100 µL de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) en placas de Agar Marino 1217 que contenía: 0.0016 g de nitrato amónico, 0.022 g ácido bórico, 0.008 g fosfato disódico, 0.08 g bromuro de potasio, 0.16 g bicarbonato sódico, 0.0024 g fluoruro de sodio, 3.24 g sulfato de sodio, 1 g de extracto de levadura, 5 g peptona, 1.8 g cloruro cálcico, 8.8 g cloruro magnésico anhidro, 0.55 g cloruro potásico, 19.4 g cloruro sódico, 0.004 g silicato sódico, 0.034

g cloruro de estroncio, 0.1 g citrato férrico, de acuerdo a la ficha técnica de Conda-lab (2020) y 15 g de agar bacteriológico por litro, ajustando a pH 7.4 con NaOH 1 M; y medio ATCC 2185 que contenía: 234 g NaCl, 20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g de citrato trisódico, 2 g KCl, 5 g de triptona, 3 g de extracto de levadura, 15 g de agar bacteriológico por litro; y 1 mL de solución traza (conteniendo: 6.6 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.7 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3.9 mg $\text{Fe}(\text{NO}_3)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.7 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ por mL), ajustando a pH 6.5 con NaOH 1 M, ambos preparados con las mismas concentraciones de NaCl (0.5, 2 y 4 M), según Martín del Campo *et al.* (2015). Posteriormente se incubaron a 40 °C, durante 72 horas.

Aquellas colonias que mostraron un crecimiento considerable se sembraron por picadura en agar marino 1217 y ATCC 2185, adicionado con 0.5, 2 y 4 M de NaCl y enriquecidos con leche descremada al 2 % (Difco™) como inductor de la actividad proteolítica para posteriormente evaluar los halos de inhibición desarrollados en el medio de cultivo enriquecido, seleccionando las 5 cepas con mayores halos de hidrólisis.

Fermentación en medio líquido

Se llevó a cabo una fermentación en medio líquido utilizando las cepas seleccionadas. En donde se utilizó un volumen total de 50 ml con 5% de inóculo, el medio de cultivo empleado fue Medio Marino 1217 con 0.5 M de NaCl. La fermentación se realizó durante 144 horas a 40 °C, bajo agitación constante a 180 rpm en un incubador orbital.

Se tomaron muestras cada 24 horas, las cuales se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C para separar el sobrenadante, el cual fue utilizado posteriormente para la determinación de la actividad proteolítica y la concentración de proteínas.

Determinación de proteínas

Se determinó la cantidad de proteína presente a lo largo de la fermentación mediante el método de Bradford (1976), utilizando como estándar una curva patrón de BSA (2.5-15.0 µg/mL; $R^2 > 0.99$).

Determinación de actividad proteolítica

La actividad enzimática se determinó de acuerdo a la metodología de Camacho *et al.*, (2023) y Martínez-Pérez *et al.*, (2019), utilizando como indicador rojo fenol 0.35 mM. La absorbancia fue leída a 558 nm en un espectrofotómetro UV-VIS MultiSkan Go (Thermo Scientific™, Estados Unidos), realizando la medición de la absorbancia cada 30 segundos por 15 minutos, utilizando una curva patrón preparada con HCl disuelto en buffer libre de sustrato (0.2-0.7 mM; $R^2 > 0.99$). Así mismo se utilizó la ecuación 1 para la cuantificación proteolítica:

$$\frac{U}{mL} = \frac{Rm - Rb \cdot 120 \cdot FD}{Rs \cdot 20}$$

Dónde:

Rm= Pendiente de reacción de la muestra en ABS/min,

Rb= Pendiente de reacción del blanco en ABS/min,

Rs= Pendiente de la curva estándar en ABS/min,

FD= Factor de dilución de la muestra,

Siendo 120 µL el volumen de reacción y 20 µL el volumen de la muestra empleado.

RESULTADOS

Mediante el uso de dos medios diferentes (agar marino 1217 y ATCC 2185) se lograron purificar 287 cepas con condiciones de requerimiento diferentes de NaCl (0.5, 2 y 4 M). Sin embargo, para posteriores ensayos, solo se consideraron aquellas colonias cuya coloración, forma y textura fuesen distintas, ya que la caracterización morfológica de distintas colonias refleja diferencias fenotípicas, lo que provee de información acerca de la diversidad microbiana en las muestras, por lo tanto, con esto se pretendía maximizar la probabilidad de trabajar con microorganismos distintos (Sousa *et al.*, 2013). De esta manera, se conservaron 85 colonias en medio marino 1217 0.5 M NaCl, 38 en medio marino 1217 2 M NaCl, 3 colonias en medio ATCC 2185 con 4 M de NaCl y 31 en medio ATCC 2185 2 M de NaCl, cabe mencionar que no se encontró crecimiento en el medio marino con 4 M de NaCl, lo cual sugiere la presencia de únicamente microorganismos halófilos ligeros y moderados.

Se identificaron 35/85 colonias con la capacidad de producir exoenzimas proteolíticas en medio marino con 0.5 M NaCl, 7/38 colonias en medio marino con 2 M de NaCl y 4/31 colonias en medio ATCC 2185 con 2 M de NaCl, los cuales fueron enriquecido con 2% de leche descremada como inductor para detectar la síntesis de proteasas extracelulares. De acuerdo con Tennalli *et al.*, (2024), la formación de un halo de hidrólisis cristalino alrededor de las colonias se interpreta como evidencia de la actividad proteolítica. Con base en el diámetro del halo de hidrólisis fueron seleccionadas 5 cepas: 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11 (Figura 1 y Archivo Complementario).

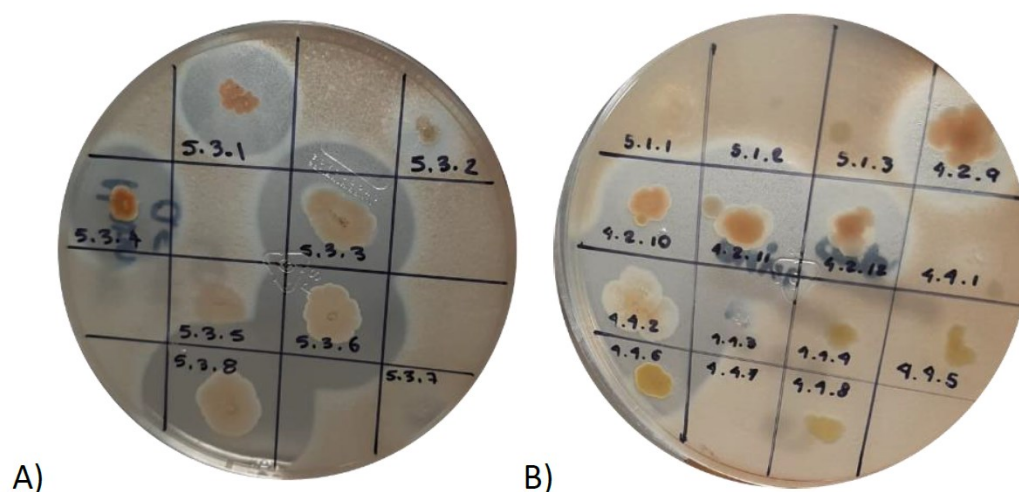


Figura 1. Crecimiento microbiano de **A.** cepas 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y **B.** 4.2.11 medio marino 0.5 M NaCl enriquecido con leche descremada 2 %. La aparición del halo de hidrólisis (cristalino) alrededor de las cepas en el medio con inductor, indica la degradación de la caseína en péptidos y aminoácidos solubles, evidenciando la síntesis de enzimas proteolíticas extracelulares.

Previo la fermentación líquida se prepararon inóculos con las cepas seleccionadas las cuales fueron monitoreadas mediante la densidad óptica tras 24 horas de incubación a 40 °C y 180 rpm, en medio marino 1217 0.5 M (Archivo complementario).

La concentración de proteínas presentó una disminución progresiva a lo largo del tiempo, durante la fermentación con medio marino 1217 0.5 M a 40 °C y 180 rpm en todas las cepas evaluadas. Al inicio de la fermentación, la cepa 5.3.8 mostró la concentración más alta (144.4555 µg/mL), mientras que la 5.3.3 presentó las concentraciones más bajas en el tiempo 0 h (110.6348 µg/mL). Al final de la fermentación las cepas 5.3.3 y 5.3.4 presentaron las menores concentraciones de proteína (52.5594 y 43.4963 µg/mL) respectivamente (Figura 2).

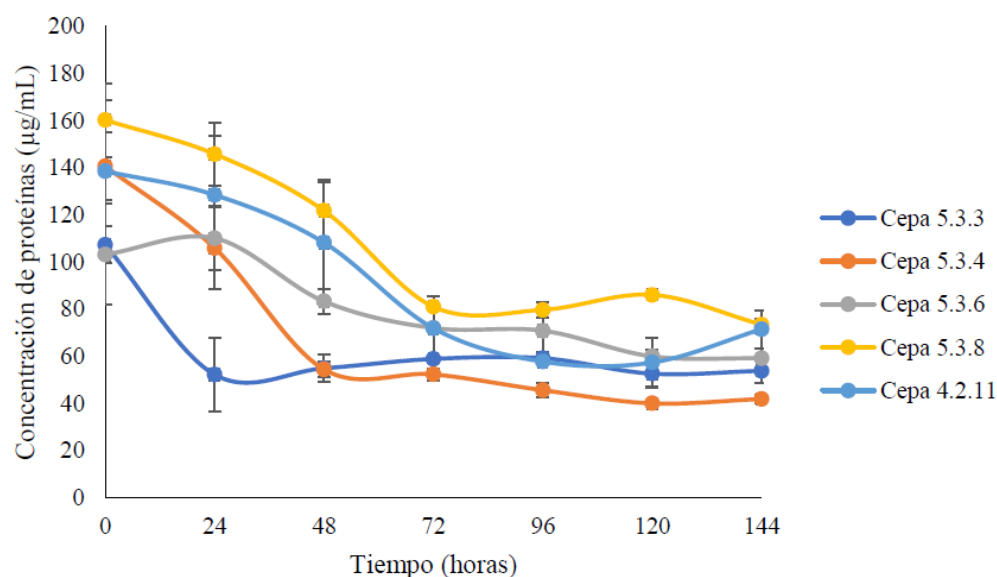


Figura 2. Determinaciones de la concentración de proteína en fermentación líquida en medio marino 1217 0.5 M de NaCl a 180 rpm y 40 °C.

Durante las primeras horas de fermentación no fue posible identificar actividad proteolítica, sino hasta las 120 horas, sin embargo, la actividad proteolítica máxima se presentó a las 144 horas. En la Figura 3 se observa la cinética de hidrólisis de caseína, utilizando extractos enzimáticos de las cepas incubadas (5.3.3, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11), siendo la cepa 5.3.6 la que presentó la actividad relativa más alta con respecto a las demás evaluadas.

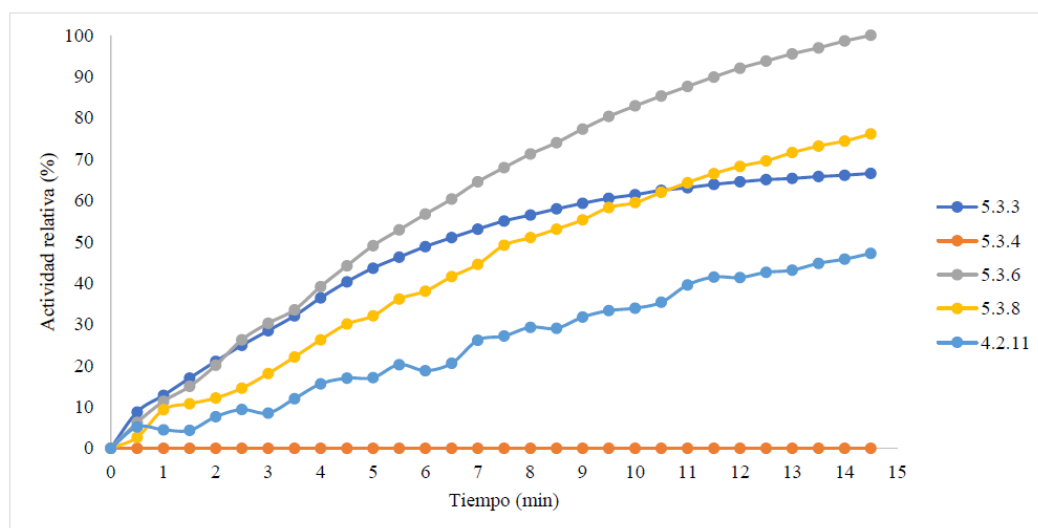


Figura 3. Actividad proteolítica relativa de las cinco cepas seleccionadas durante 15 minutos de incubación. Los valores fueron normalizados tomando como 100 % la actividad máxima observada en todas las muestras. La cinética se evaluó por

espectrofotometría a 558 nm, utilizando caseína como sustrato proteico. Las curvas muestran el comportamiento enzimático de cada cepa bajo condiciones idénticas de cultivo y reacción: medio marino 1217 0.5 M de NaCl, 180 rpm y 40 °C.

En contraste, en la cepa 5.3.4 no se registró actividad proteolítica, evidenciado por la planitud de la curva presentada, lo cual es indicativo de una nula actividad proteolítica. Por otro lado, la actividad enzimática calculada a las 144 horas fue de: 0.2875, 0.0402, 0.2201, 0.2323 y 0.2035 U/mL para las cepas 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11, respectivamente (Figura 4).

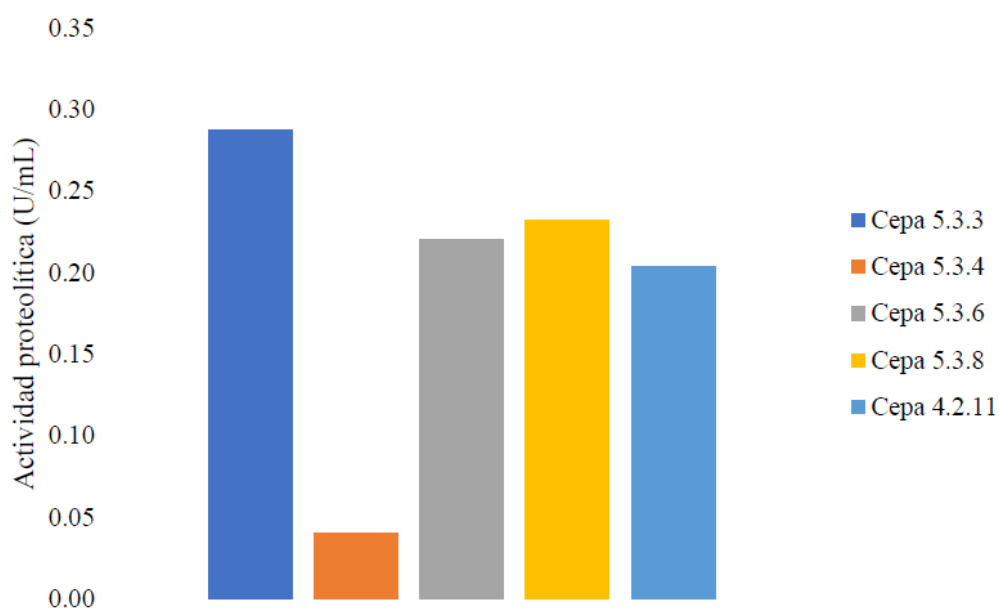


Figura 4. Actividad de las cepas evaluadas a las 144 horas, durante la fermentación líquida en medio marino 1217 0.5 M a 180 rpm y 40 °C.

DISCUSIÓN

La identificación de las colonias productoras de enzimas proteolíticas fue mediante la aparición de un halo cristalino alrededor de éstas, en el medio enriquecido al 2% con leche descremada, confirmando así la presencia de actividad proteolítica extracelular (Santos y Villalta, 2015). La principal proteína presente en la leche es la caseína y esta se encuentra en suspensión coloidal, de manera que, aporta turbidez al medio. En particular, la secreción de enzimas proteasas extracelulares permite la hidrólisis de la caseína en péptidos solubles, reduciendo la turbidez del medio y generando un halo cristalino alrededor de las colonias. Este halo es un indicador visual de la actividad proteolítica y confirma la capacidad de los microorganismos de producir enzimas proteasas extracelulares (Fitriyanto *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2019; Chung *et al.*, 2021)

La concentración de proteínas de las muestras durante la fermentación fue en decremento desde las 0 h hasta las 144 h. Este comportamiento sugiere que los

microorganismos cultivados secretaron enzimas proteolíticas para aprovechar las proteínas de la leche descremada utilizada como inductor. Se ha documentado que medios de cultivo enriquecidos con leche descremada induce la síntesis de proteasas que hidrolizan la proteína presente del medio (caseína), lo que explica la disminución progresiva en la concentración proteica durante la fermentación, pues la proteína es degradada a péptidos y aminoácidos (Lario et al., 2020; Kamath et al., 2010).

A las 144 horas de fermentación hubo evidencia de una mayor actividad proteolítica en las cepas 5.3.3, 5.3.4, 5.3.6, 5.3.8 y 4.2.11, con respecto a las 120 horas. En particular, la cepa 5.3.3 mostró mayor actividad (0.2875 U/mL). Pero en contraste, no se detectó actividad proteolítica en el sobrenadante del cultivo líquido de la cepa 5.3.4., sin embargo, ésta si presentó halo de hidrólisis al sembrarse en agar medio marino 0.5 M con leche descremada, lo que indica que si había producción enzimática extracelular (proteasas). Lo anterior sugiere que la cepa es capaz de sintetizar proteasas, pero la secreción de estas enzimas puede depender de las condiciones propias del medio, como la concentración de salinidad, el pH, la temperatura o incluso la agitación (Saini et al., 2023). Si bien, la actividad absoluta cuantificada reflejó que la cepa 5.3.3 produjo una mayor concentración enzimática, existe una discrepancia entre la actividad relativa presentada en la cinética, pues, la cepa 5.3.6 mostró una mayor eficiencia sostenida en la hidrólisis de caseína, a lo largo del tiempo. Resultados similares fueron descritos por Martínez-Pérez et al., (2020), quienes evaluaron la producción de proteasa extracelular en cepas halófilas, usando caseína como sustrato. En su estudio, se observó variabilidad en la cinética de hidrólisis y del cual se sugiere que estas diferencias se deben principalmente a la eficiencia catalítica específica de las enzimas y su afinidad por el sustrato, pero también reflejan la diversidad metabólica microbiana halófila.

Del total de cepas evaluadas (287), solo el 53.65 %logró crecer en los medios marino (0.5 M y 2 M de NaCl) y medio ATCC (2 M de NaCl), y un menor porcentaje de las cepas se identificaron con actividad proteolítica (46/287 cepas o 16.0278 %), evidenciada por la formación de los halos de hidrólisis. Algunos estudios han demostrado que ambientes salinos como los suelos costeros, albergan una gran diversidad de microorganismos halófilos (Drissi-Kaitouni et al., 2020; Irshad et al., 2014). En particular, se han identificado distintos géneros, de los cuales destacan *Bacillus*, *Halomonas*, *Halobacillus*, *Shewanella*, *Salinivibrio*, entre otros, y de los cuales muchos presentan la capacidad de sintetizar enzimas hidrolíticas de interés industrial, como las proteasas. No obstante, se ha observado que dicha diversidad microbiana tiende a disminuir conforme aumenta la concentración de sal en los medios, encontrándose más cepas aisladas en medios con concentraciones bajas a moderadas (3-9 %) de NaCl y solo unas pocas en concentraciones por encima del 20 % de NaCl (Irshad et al., 2014).

Asimismo, aunque algunas cepas aisladas en el estudio no mostraron actividad enzimática proteolítica, los valores obtenidos fueron significativamente menores en

comparación con otros estudios. Por ejemplo, Alnahdi (2012) registró actividades entre 55 y 243 U/mL, mientras que en este caso la actividad máxima la presentó la cepa 5.3.3 con 0.2875 U/mL a las 144 horas, no obstante, las condiciones de temperatura y agitación (28 °C, 180 rpm) fueron distintas a la del presente estudio, lo que puede explicar la diferencia entre las actividades enzimáticas obtenidas en ambos casos. Por otro lado, Ghasemi et al., (2011), reportaron actividad enzimática proteolítica en un rango similar a las encontradas en este estudio, siendo entre 0.01 y 0.43 U/mL bajo condiciones de 37 °C y 150 rpm. Si bien estos últimos se acercan más a las concentraciones obtenidas, se evidencia que la actividad enzimática detectada no solo se atribuye a la diversidad microbiológica entre las cepas en sí, sino también de si las condiciones del entorno son o no favorables para la síntesis de enzimas proteolíticas Rolfe et al., (2012).

En ambientes hipersalinos, por lo general, se presenta baja disponibilidad de nutrientes simples como el nitrógeno y carbono. Por lo que la producción de proteasas extracelulares por parte de los microorganismos halófilos representa una estrategia adaptativa para la obtención de nutrientes. Estas enzimas permiten no solo la degradación de proteínas presentes en el entorno en péptidos y aminoácidos (Hong et al., 2023; Mokashe et al., 2018), sino que además pueden conferir una ventaja competitiva frente a otros microorganismos al tener la capacidad de lisar células que coexisten en el entorno, utilizando como nutrientes los restos celulares (Hong et al., 2023).

Estructuralmente hablando, las proteasas halófilas poseen adaptaciones específicas que aseguran su función bajo condiciones extremas. Estas incluyen: mayor número de residuos de aminoácidos ácidos en la superficie de la enzima, parches hidrofóbicos de menor tamaño y puentes salinos entre los residuos ácidos-básicos, lo que permite mantener una capa de hidratación funcional sobre ésta, pero además se ha demostrado que amplían su versatilidad y adaptación en términos de resistencia a pH alcalinos y temperaturas elevadas bajo estrés osmótico (Edbeib et al., 2016), incluso evitando la desnaturalización en presencia de agentes desnaturalizantes (Sinha y Khare, 2014).

Por lo anterior, la actividad proteolítica observada en las cepas evaluadas no solo refleja su capacidad enzimática, sino también su grado de adaptación a las condiciones impuestas del proceso fermentativo (medio de cultivo, salinidad, pH, temperatura y agitación). La ausencia de actividad enzimática en el medio líquido por parte de la cepa 5.3.4 podría deberse a que requiere condiciones distintas en la fermentación o que no se alcanzaron concentraciones suficientes para ser cuantificada por el ensayo. Asimismo, como señalan Mokashe et al., (2018), muchas enzimas halófilas muestran diferencias significativas de expresión y síntesis entre condiciones de cultivo en medios sólidos y líquidos, lo cual explica que se haya identificado un halo de hidrólisis en la cepa 5.3.4 sembrada en agar medio marino 0.5 M con inductor, pero no se haya logrado cuantificar actividad enzimática en el medio líquido.

CONCLUSIONES

Las cepas halófilas aisladas de suelos salinos fueron capaces de producir enzimas proteolíticas bajo las condiciones de cultivo utilizadas en el presente trabajo de investigación. El contenido de proteína en el medio de cultivo presentó un comportamiento descendiente, lo que indicó el consumo de la proteína presente en el sustrato. Asimismo, se determinó la actividad proteolítica de cada muestra, presentando actividad enzimática en las últimas etapas de la fermentación, siendo la cepa 5.3.3 la que mostró mayores valores de actividad con respecto a las demás. Por otro lado, la cepa 5.3.4 es un caso de relevancia, puesto que los resultados sugieren que la evaluación de la actividad enzimática solo en medio líquido podría subestimar su potencial proteolítico real.

Los resultados que se obtuvieron muestran que, de las 287 cepas aisladas, únicamente poco más de la mitad logró crecer en 3 de los cuatro medios salinos evaluados (medio marino 0.5 M, 2 M y ATCC 2 M de NaCl), y solo el 16.03 % presentó actividad enzimática proteolítica. Las cepas que fueron seleccionadas para los ensayos de fermentación fueron aquellas que mostraron dicha actividad, reflejando no solo su capacidad funcional en entornos salinos, sino también la amplia diversidad contenida en suelos salinos, incluyendo microorganismos cuyo potencial no solo depende de las condiciones de salinidad, sino también de condiciones más específicas como la temperatura y agitación, como se sugiere con la cepa 5.3.4., por lo que se recomienda optimizar las condiciones de fermentación (agitación, temperatura y tiempo de cultivo) para potenciar la síntesis de proteasas.

Conflicto de Interés

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés

REFERENCIAS

- Abd Samad, N. S., Amid, A., Jimat, D. N., and Shukor, N. A. 2017. Isolation and identification of halophilic bacteria producing halotolerant protease. *Science Heritage Journal*, 1(1), 7-9. <https://doi.org/10.26480/gws.01.2017.07.09>
- Alnahdi, H. S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(9), 071-074. DOI:10.7324/JAPS.2012.2915
- Benmebarek, H., and Kharroub, K. 2023. Production Assay and Partial Characterization of a Protease Produced by *Idiomarina loihiensis*, a Moderately Halophilic Bacterium Strain. In *Biology and Life Sciences Forum* (Vol. 31, No. 1, p. 18). MDPI.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Camacho, R. M., Martínez, R., B. and Camacho, M. 2023. Cuantificación de proteasas haloalcalinas empleando un método cinético basado en pH. *Manual de métodos para el estudio de extremófilos*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. DOI: 10.30973/2023/manual-extremofilos
- Chung, D., Yu, W. J., Lim, J. Y. *et al.* 2021. Characterization of the proteolytic activity of a halophilic *Aspergillus reticulatus* strain SK1-1 isolated from a solar saltern. *Microorganisms*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010029>
- Chung, D., Yu, W. J., Lim, J. Y., Kang, N. S., Kwon, Y. M., Choi, G., ... and Lee, D. S. 2021. Characterization of the proteolytic activity of a halophilic *Aspergillus reticulatus* strain SK1-1 isolated from a solar saltern. *Microorganisms*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010029>
- Condalab. (2020). Ficha técnica: Caldo Marino Cat. 1217. <https://www.condalab.com/int/en/dehydrated-culture-media/984-11616-marine-broth.html>
- Deole, R. and Hoff, W. D. 2020. A potassium chloride to glycine betaine osmoprotectant switch in the extreme halophile *Halorhodospira halophila*. *Sci Rep* 10, 3383. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59231-9>

- Drissi-Kaitouni, L.B., Anissi, J., Sendide, K. *et al.* 2020. Diversity of hydrolase-producing halophilic bacteria and evaluation of their enzymatic activities in submerged cultures. *Ann Microbiol* 70, 33. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01570-z>
- Edbeib, M.F., Wahab, R.A. and Huyop, F. 2016. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World J Microbiol Biotechnol* 32, 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>
- Fahmy, N. M., and El-Deeb, B. 2023. Optimization, partial purification, and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by *Halobacillus* sp. HAL1 using fish wastes as a substrate. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00509-6>
- Fitriyanto, N. A., Hadi, S., Bahtiyar, M. I., Prasetyo, R. A., and Erwanto, Y. 2020. Characterization and growth profile of proteolytic strain PK-4 isolated from local slaughterhouse wastewater. In BIO Web of Conferences (Vol. 28, p. 03001). *EDP Sciences*. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202803001>
- Ghasemi, Y., Rsoul, A. S., Ebrahiminezhad, A., Kazemi, A., Shahbazi, M., and Talebnia, N. 2011. Screening and isolation of extracellular protease producing bacteria from the Maharloo Salt Lake. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(3): 175-180. <https://www.sid.ir/paper/300324/en>
- Hong, T., Pan, R., Ke, J. *et al.* 2023. Expression, purification, and enzymatic characterization of an extracellular protease from *Halococcus salifodinae*. *Braz J Microbiol* 54, 2689–2703. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01114-y>
- Hou, J., Yin, X. M., Li, Y., Han, D., Lü, B., Zhang, J. Y., and Cui, H. L. 2021. Biochemical characterization of a low salt-adapted extracellular protease from the extremely halophilic archaeon *Halococcus salifodinae*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 176, 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.081>
- Irshad, A., Ahmad, I., and Kim, S. B. 2014. Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 563-572. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000050>
- Kamath, P., Subrahmanyam, V. M., Rao, J. V., and Raj, P. V. 2010. Optimization of cultural conditions for protease production by a fungal species. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72(2), 161. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.65017>
- Karan, R., Kumar, S., Sinha, R., and Khare, S. K. 2011. Halophilic Microorganisms as Sources of Novel Enzymes. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*, 555–579. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2214-9_25
- Khoshnevis, N., Rezaei, S., Samaei-Nouroozi, A., Amin, M., Moshfegh, M., Khoshayand, M. R., and Faramarzi, M. A. 2018. Enhanced production and characterization of a highly stable extracellular protease from an extreme halophilic isolate *Salicola marasensis*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 17(4), 1392. PMID: 30568698
- Lario, L. D., Pillaca-Pullo, O. S., Sette, L. D., Converti, A., Casati, P., Spampinato, C., and Pessoa, A. 2020. Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. *Biotechnology Reports*, 28, e00546. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00546>
- Lim, Y., Foo, H., Loh, T. *et al.* 2019. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. *J Animal Sci Biotechnol* 10, 15. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0323-z>
- Martin del Campo, M., Camacho, R. M., Mateos-Díaz, J. C., Müller-Santos, M., Córdova, J., and Rodríguez, J. A. 2015. Solid-state fermentation as a potential technique for esterase/lipase production by halophilic archaea. *Extremophiles*, 19, 1121-1132.
- Martínez-Pérez, R. B., Camacho-Ruiz, M. A., Estrada-Alvarado, I., Armenta-Pérez, V., and Camacho-Ruiz, R. M. 2019. Time-efficient pH-based method to quantify the activity of alkaline and halo-alkaline proteases. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(3), 1063-1071. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/debi/revmexingquim/2019v18n3/Martinez>
- Martínez-Pérez, R.B., Rodríguez, J.A., Cira-Chávez, L.A. *et al.* 2020. Exoenzyme-producing halophilic bacteria from the former Lake Texcoco: identification and production of n-butyl oleate and bioactive peptides. *Folia Microbiol* 65, 835–847. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00794-5>
- Mesbah, N. M. 2022. Industrial biotechnology based on enzymes from extreme environments. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 870083. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.870083>
- Mokashe, N., Chaudhari, B., and Patil, U. 2018. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. *International journal of biological macromolecules*, 117, 493-522. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.217>
- Raval, V.H., Purohit, M.K. and Singh, S.P. 2015. Extracellular proteases from halophilic and haloalkaliphilic bacteria: occurrence and biochemical properties. In: Maheshwari, D., Saraf, M. (eds) *Halophiles. Sustainable Development and Biodiversity*, vol 6. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14595-2_16
- Reang, L., Bhatt, S., Tomar, R.S. *et al.* 2024. Extremozymes and compatible solute production potential of halophilic and halotolerant bacteria isolated from crop rhizospheric soils of Southwest Saurashtra Gujarat. *Sci Rep* 14, 15704. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63581-z>
- Revankar, S., Rathod, J. and Arakera, S. 2024. Screening of a halotolerant *Bacillus* species for protease production from Kali Estuary. *Journal of Advanced Zoology*, 45(2), 1820-1824.
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S. *et al.* 2012. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of bacteriology*, 194(3), 686-701. <https://doi.org/10.1128/jb.06112-11>
- Ruginescu, R., Gomoiu, I., Popescu, O., *et al.* 2020. Bioprospecting for novel halophilic and halotolerant sources of hydrolytic enzymes in brackish, saline and hypersaline lakes of Romania. *Microorganisms*, 8(12), 1903. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121903>

- Saini, A., Kumar, A., Singh, G., and Giri, S. K. 2023. Survival strategies and stress adaptations in halophilic Archaeobacteria. In *Microbial stress response: mechanisms and data science* (pp. 1-21). American Chemical Society. DOI: 10.1021/bk-2023-1434.ch001
- Santos, J., and Villalta, J. 2015. La Halotolerancia y síntesis enzimática en *Pseudomonas cf. fluorescens* aislada de las piscinas de Ecuasal, provincia de Santa Elena, Ecuador. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 9(1), 5-5. <https://doi.org/10.53591/cna.v9i1.235>
- Sarwa, N., Kumari, P., Meena, D. *et al.* 2024. Alkaline proteases from haloalkaliphiles: unveiling nature's catalysts for diverse applications. *Appl Biochem Microbiol* 60, 855–870. <https://doi.org/10.1134/S0003683824603676>
- Sinha, R., Khare, S.K. 2014. Structural changes in halophilic and non-halophilic proteases in response to chaotropic reagents. *Protein J* 33, 394–402. <https://doi.org/10.1007/s10930-014-9571-0>
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., and Pereira, M. O. 2013. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of microbiological methods*, 95(3), 327-335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.020>
- Tennalli, G. B., Hungund, B. S., and Jain, A. M. 2024. Response surface methodology mediated optimization of serine protease by *Salinicola tamaricis* BGN2 isolated from the West Coast of India and its application in culturing of MCF7 cell line. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(3), 119-135. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2024.162421>
- Wang, S.-L., Chao, C.-H., Liang, T.-W., and Chen, C.-C. 2009. Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. *Marine Biotechnology*, 11, 334-344. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9149-y>

El Cempoalxóchitl: historia, presente y perspectivas

Sánchez-Millán José L.^{1,2,3,4,5}, Gutiérrez-Cortes Elsa¹, Heredia-Barbero Alejandro⁶, Chávez-Martínez Ana I.⁷, Palacios-Martínez Janet⁷, Luis Cárdenas⁷ ♦

¹Departamento de investigación y posgrado

²Departamento de Matemáticas

³Centro de Enseñanza Agropecuaria

⁴Departamento de Ciencias Pecuarias

⁵Departamento de Ciencias Biológicas, departamentos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

⁶Instituto de Ciencias Nucleares

⁷Instituto de Biotecnología; todas dependencias académico-científicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

♦ Correspondencia: luis.cardenas@ibt.unam.mx

Área Temática:
Ciencia de las Plantas

Recibido: 15 enero, 2025
Aceptado: 14 marzo, 2025
Publicado: 31 julio, 2025

Cita: Sánchez-Millán JL, Gutiérrez-Cortes E, Heredia-Barbero A, Chávez-Martínez AI, Palacios-Martínez J y Cárdenas L. 2025. El Cempoalxóchitl: historia, presente y perspectivas. *Bioc Scientia* 1(2). <https://doi.org/10.63622/RBS.2504>



Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Resumen: El cempoalxóchitl (*Tagetes erecta*) es una planta endémica de México con un gran potencial y múltiples aplicaciones entre las que se encuentran: la ornamental, la terapéutica, la agroindustrial y la tecnológica. Desde sus primeros reportes en el siglo XV, el cempoalxóchitl ha sido naturalizada en diferentes zonas subtropicales del mundo. Los carotenoides son de los principales metabolitos presentes en *T. erecta*. Estos son compuestos lipofílicos e hidrofóbicos, generalmente constituidos por un esqueleto hidrocarbonado de 40 átomos y en las plantas están involucrados en el desarrollo y la respuesta al estrés. El desarrollo de las ómicas para generar estrategias que permitan incrementar el rendimiento y/o producción en los niveles de estos metabolitos en *T. erecta*, puede ser una solución para lograr cubrir la demanda y posicionar a México como un líder en la producción de carotenoides. Así mismo, esto permitirá el desarrollo de tecnologías más sostenibles mediante el uso de *T. erecta*.

Palabras clave: Cempoalxóchitl, *Tagetes erecta*, México, carotenoides, flor, industria.

Abstract: The cempoalxóchitl (*Tagetes erecta*) is a plant endemic to Mexico with a great potential and multiple applications, including ornamental, therapeutic, agro-industrial and technological applications. Since its first reports in the 15th century, cempoalxóchitl has been naturalized in different subtropical areas of the world. Carotenoids are among the most important metabolites present in *T. erecta*. These are lipophilic and hydrophobic compounds, generally composed of a hydrocarbon skeleton of 40 atoms, among its roles it has been described in development and stress responses. The development of omics approaches to generate strategies to increase the yield and/or production levels of these metabolites in *T. erecta* could be a solution to meet the demand and position Mexico as a leader in the production of carotenoids. This will also allow the development of more sustainable technologies through the use of *T. erecta*.

Keywords: Cempoalxóchitl, *Tagetes erecta*, Mexico, carotenoids, flower, industry.

INTRODUCCIÓN

Origen y diversidad de la flor de cempoalxóchitl

El cempoalxóchitl (del náhuatl *cempoalli* que hace referencia al número 20 y *xochitl* flor), es una planta endémica de México. Se considera que los aztecas fueron los primeros en atribuirle propiedades medicinales, por lo que su uso se diseminó hacia América central y Sudamérica. El primer reporte del cempoalxóchitl data de 1552 plasmado en el “Herbal Azteca De La Crus-Badiano” (Gupta et al., 2022). Tiempo después fue descrita por el fraile franciscano Bernardino de Sahagún en el Códice Florentino la flor de cempoalxóchitl (Figura 1) e introducida en Europa en el siglo XVI. Posteriormente, las semillas de cempoalxóchitl fueron transportadas al norte de África, donde fue naturalizada y a finales del siglo XVI fue introducida en la India proveniente de Portugal (Shukla y Thakur 2018).



Figura 1. Flores de cempoalxóchitl en el Códice Florentino. Se observa una copia del Códice Florentino “Estas flores que se llaman cempoalxóchitl son amarillas y de buen olor, y hermosas. Hay muchas de ellas que ellas se nacen y otras que las siembran en los huertos. Son de dos maneras: unas que llaman hembras cempoalxóchitl, y son grandes y hermosas; otras hay que se llaman macho cempoalxóchitl: no son tan hermosas ni tan grandes”. Códice Florentino Folio 186v, 1577.

Esta especie se desarrolla en diversos tipos de ecosistemas que abarcan desde bosques tropicales caducifolios, bosques espinosos, bosques nubosos y bosques de pino-encino, a altitudes que van desde los 800 hasta los 2300 metros (Heyden, 1987). Actualmente, se ha introducido como especie cultivada en China, India, Zambia, Sudáfrica y Australia (Gupta et al., 2022).

En México, debido a su amplia distribución y presencia en el país, se le han atribuido diferentes nombres entre los que se encuentran: Flor de muerto;

Cempoalxóchitl (náhuatl): flor de veinte pétalos; Cepazuchilt, cempasochil, cempoal, flor de cempoal, flor de cempoaxóchitl, flor de difunto, flor de muerto chino, flor de niño, veinte flores; Distrito Federal: cempoalxóchitl (náhuatl); Estado de México: tecacaya, zempoalxochitl; Guerrero: yita cua (mixteco); Michoacán: tiringuin-tztzuki; Nayarit: púua (cora); Oaxaca: pikna'a pojy, pikon'kpojy (huave), li mi ñe, zempazuchil; Puebla: calpuxham, kgalhpuxan (totonaco), chant (tepehua), cempaxochitl, copalxuitl (náhuatl); Tlaxcala: zempalzuchilt; Veracruz: kalpuxum, xempasochitl; Yucatán: ts'uul xpujuk, xpa'ajuk, xpajjul; San Luis Potosí: k'uchid huitz, santorum huitz (tenek).

El nombre científico del cempoalxóchitl es *Tagetes erecta*. *Tagetes* pertenece a la familia Asteraceae y está constituido por alrededor de 55 especies de plantas herbáceas anuales o perennes (Serrato-Cruz et al., 2008). Esta planta ramificada puede llegar a medir aproximadamente 1.5 m de altura y presentar distintas formas de inflorescencias. Estas pueden estar conformadas por varios tipos de flores, como las flores liguladas (hembras) o sin ligulas (hermafroditas). El arreglo de estas flores va desde inflorescencias con solo un anillo exterior de flores liguladas (hembras) y en su centro presencia de flores hermafroditas tubuladas, inflorescencias que presentan varios anillos de flores liguladas y pocas flores tubuladas hermafroditas en el centro, hasta las que solo presentan flores hembra sin presencia de fuentes de polen (Figura 2 A y B).



Figura 2. Fotos de inflorescencias de cempoalxóchitl. Se presentan distintos tipos de inflorescencias de cempoalxóchitl. En el panel A, se presenta una inflorescencia con un solo anillo de lígulas y en el centro se encuentran flores tubuladas sin lígulas hermafroditas. En el B, una inflorescencia de flores hembras con lígulas (se ha descrito un tipo de inflorescencias hembras sin lígulas) (fotografías del autor).

Aplicaciones de *T. erecta*

T. erecta es una planta ornamental y medicinal que sintetiza metabolitos con un amplio rango de actividad farmacológica, la cual incluye actividad antibacterial, diurética, anti-inflamatoria, antioxidante, hepatoprotectora, antiepiléptica,

anticancerígena, antiparasitaria (Singh et al., 2020). Además, en ensayos *in vitro* se ha demostrado que el extracto de *T. erecta* presenta una gran actividad antioxidante, antidiabética y antilipémica, al inhibir a la α -glucosidasa, la α -amilasa y la lipasa pancreática (Wang et al., 2016). Particularmente la luteína y la zeaxantina, son dos moléculas con propiedades antioxidantes que benefician la salud visual y ayudan a prevenir enfermedades en humanos (Wang et al., 2023). Además, los metabolitos secundarios derivados de *T. erecta* han sido utilizados como aditivos por la industria agroalimentaria para brindar color a los alimentos, aumentar su vida de anaquel y además por sus propiedades nutrimentales. Por ejemplo, se ha reportado que la adición de extractos de *T. erecta* retrasa considerablemente la presencia de radicales libres durante la extracción de aceite de soya (Huang et al., 2022).

Composición bioquímica de *T. erecta*

Las plantas de *T. erecta* son ampliamente cultivadas por su rol ornamental y medicinal, sin embargo, sus usos se han ampliado gracias a diversos estudios que han aportado información respecto a su composición bioquímica. Los metabolitos secundarios presentes en *T. erecta* varían en función del genotipo, las condiciones de crecimiento y el tejido del que se trate (Park et al., 2017). Por ejemplo, el análisis fitoquímico de plantas de *T. erecta* reveló la presencia de cumarinas solo detectadas en hojas, mientras que la presencia de esteroides solo se detectó en las flores (Camacho-Campos et al., 2018). Particularmente de las flores de estas plantas se han aislado hasta 22 compuestos los cuales son: β -sitosterol, daucosterol, 7 β -hidroxisitosterol, eritrodiol-3-palmitato, lupeol, eritrodiol, 1-[5-(1-propin-1-il)-[2, 2-bitiofeno]-5-il]-etanona, α -tercentilo, quercetagetina, quercetagetina-7-metiléter, quercetagetina-7-O-glucósido, kaempferol, ácido siríngico, ácido gálico, ácido 3- α -galactosil disiríngico, ácido 3- β -galactosil disiríngico, 6-etoxi-2, 4-dimetilquinolina, oplodiol, (3S, 6R, 7E)-hidroxi-4,7-megastigmadien-9-ona, palmitina, glicolinoleato de etileno y n-hexadecano (Singh et al., 2020). Entre los diferentes componentes aislados (flavonoides, ácidos fenólicos, tiofenos), los carotenoides son los mayores constituyentes del extracto de las flores de *T. erecta*.

Generalidades y ruta biosintética de los carotenoides

Los carotenoides son compuestos lipofílicos e hidrofóbicos y su estructura usualmente consiste en una cadena de polieno, la cual posee nueve dobles enlaces conjugados con un grupo terminal a cada extremo de la cadena. Estos compuestos generalmente están constituidos por ocho unidades de isopreno formando un esqueleto hidrocarbonado de 40 átomos. Sin embargo, en algunos organismos como *Haloarcula japonica* se ha detectado la presencia de carotenoides de hasta 50 átomos (Yatsunami et al., 2014). Por otro lado, también se han detectado los apocarotenoides de cadena corta (<C40), generados por la escisión oxidativa de dobles enlaces específicos (Figura 3) (Zhang et al., 2020).

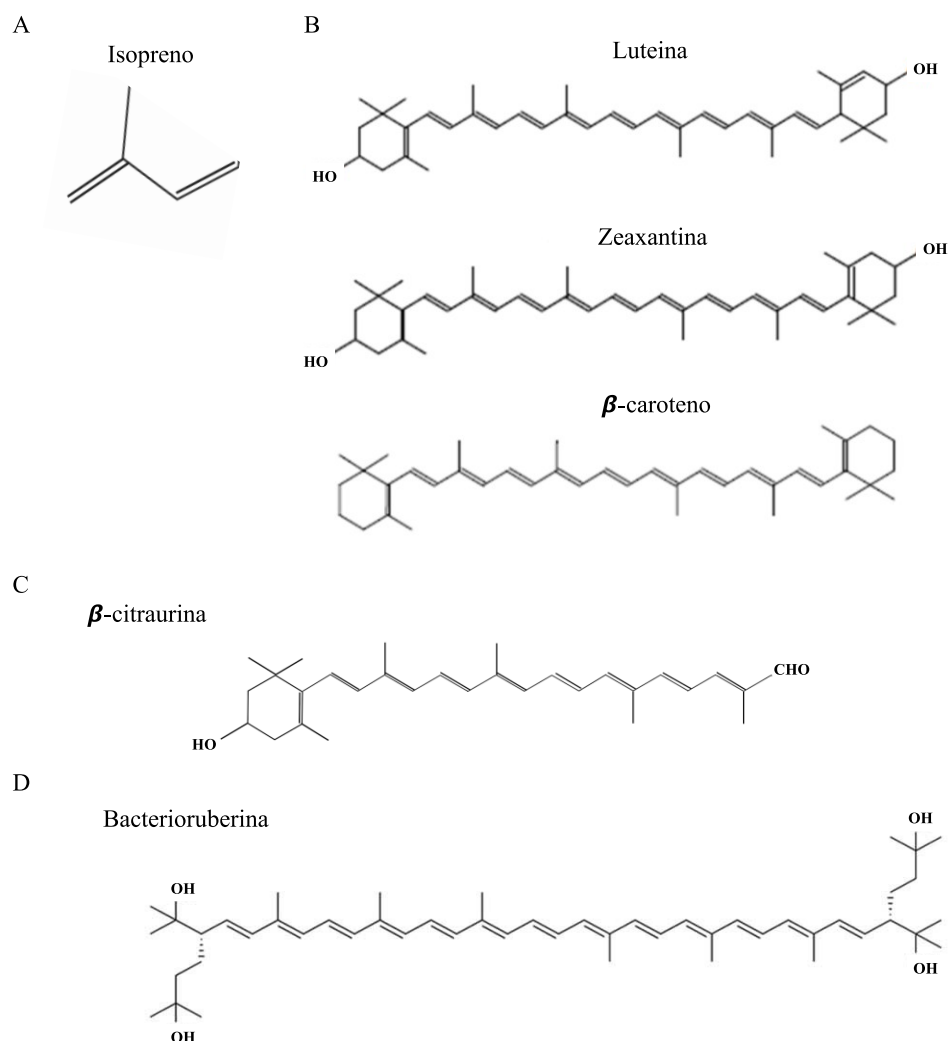


Figura 3. Estructuras químicas de los carotenoides. **A.** Estructura química del isopreno, unidad fundamental de los carotenoides. **B.** Estructura química de los tres principales carotenoides de 40 carbonos a partir de las inflorescencias del cempoalxóchitl, la luteína, zeaxantina y el β -caroteno. **C.** Estructura química de la β -citraurina, apocarotenoide de 30 carbonos presente en cítricos. **D.** Estructura química de la bacterioruberina, carotenoide de 50 carbonos presente en *Haloarcula japonica* (modificado de Millan, 2010)

Los carotenoides están distribuidos en una amplia variedad de organismos, entre los que se encuentran algunas microalgas, hongos, bacterias y plantas. En las plantas, la acumulación de carotenoides se ha detectado en los cloroplastos y los cromoplastos, y su presencia está relacionada a la fotoprotección, la absorbancia de la luz, las reacciones redox, la resistencia a estreses abióticos, la polinización y la germinación de las semillas (Galpaz et al., 2006; Kolašinac et al 2021). Además, la degradación de los carotenoides conlleva a la generación de compuestos volátiles, estrigolactonas y la fitohormona ácido abscísico (ABA) (Zhang et al., 2020). Estos compuestos pueden clasificarse en dos grupos dependiendo de su función: las

xantofilas, que contienen oxígeno e incluyen a la luteína y la zeaxantina y los carotenos como el α -caroteno, el β -caroteno y el licopeno (Figura 3). Sin embargo, la gran diversidad de los carotenoides está dada por las diferencias en su estructura, como son: el desplazamiento de dobles enlaces conjugados y la adición de grupos funcionales en los anillos terminales de la molécula. Los carotenoides fueron aislados por primera vez en 1999 mediante la saponificación del extracto de flores de *T. erecta* (Hadden et al., 1999).

En las plantas, la ruta biosintética de los carotenoides comienza con la condensación del geranilgeranilpirofosfato (GGPP), el cual es un precursor de la vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), que por acción de cuatro enzimas: la 1-deoxilulosa-5-fosfato sintasa (DXS), la 1-deoxilulosa-5-fosfato reductasa (DXR), la geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS) y la fitoeno sintasa (PSY) dan lugar a la formación del fitoeno (compuesto incoloro). A continuación, ocurren cuatro reacciones subsecuentes mediadas por la fitoeno desaturasa (PDS), la 15-cis- ζ -caroteno isomerasa (Z-ISO), la ζ -caroteno desaturasa (ZDS) y la caroteno isomerasa (CRTISO) para la conversión del fitoeno en licopeno (pigmento rojo). Posteriormente, el licopeno puede dirigirse hacia dos vías, por un lado, la β -ciclase (LCY- β) y la ϵ -cyclase (LCY- ϵ) conllevan a la formación de α -caroteno para posteriormente, por acción de la β -hidroxilasa (HYD- β) y la ϵ -hidroxilasa (HYD- ϵ), formar la luteína. Mientras que en la otra vía el licopeno es llevado a la formación de β -caroteno mediada por la LCY- β y que deriva en la formación de las xantofilas zeaxantina, violaxantina y neoxantina (Zhang et al., 2020) (Figura 4 A).

Las ciencias ómicas aplicadas en la biotecnología: Genomas y transcriptomas del cempoalxóchitl

Recientemente se publicó el genoma de dos variedades de cempoalxóchitl. El primer genoma se secuenció a partir del tejido foliar de la variedad mexicana V-01 de *T. erecta*, los datos genómicos se identifican en NCBI con el código GCA_026213115.1 publicado por la Universidad de Agricultura de China (Xin et al., 2023). A partir de este genoma se estimó un tamaño de 621.2 Mb distribuido en 12 cromosomas. Respecto al segundo genoma, este se identificó con código GCA_030867185.1 publicado por el Instituto de Agricultura y Genómica de Shenzhen, China. Este se realizó a partir de tejido foliar de la variedad WSJ de un cultivo ubicado en Guangdong, China. De acuerdo con el análisis de los datos genómicos, el tamaño estimado es de 778.9 Mb en 12 cromosomas (Jiang et al., 2023). La tecnología de secuenciación usada para analizar ambos genomas fue PacBio, esta tecnología ofrece un análisis de cobertura y profundidad amplio, lo que permite generar lecturas de mayor longitud, y aumenta significativamente las probabilidades de realizar un ensamble *de novo* del genoma y con mayor calidad.

Dentro de las características que se han ponderado en el uso comercial de *T. erecta*, está la producción de carotenoides. En este sentido, se han considerado dos características importantes de las inflorescencias, una es el número de inflorescencias y la segunda es la concentración de carotenoides. Respecto al número y desarrollo de inflorescencias, se realizó un análisis de los genomas de *T. erecta* en el que se identificó la familia de los genes que codifican para los factores de transcripción MADS-box (Liu et al., 2024). Esta familia de genes se ha relacionado con el crecimiento y desarrollo de las inflorescencias, el tiempo de floración, la arquitectura de la flor y la identidad de los órganos florales. De manera específica, la familia de genes MADS-box son cruciales para la formación del complejo floral del clado Asteraceae. Se identificaron 65 genes MADS-box en el genoma de *T. erecta*, distribuidos en los 12 cromosomas (Liu et al., 2024). El análisis de la expresión de los genes reveló patrones específicos en cada órgano, lo que permitió identificar 34 genes relacionados con el desarrollo de los órganos florales. De los cuales, cuatro genes se expresaron específicamente sólo en los pétalos y 20 mayormente en los estambres (Liu et al., 2024). Los autores sugieren que sus resultados podrían estar relacionados con la formación de diferentes tipos de flor. Además, de que este análisis exhaustivo contribuye con el conocimiento acerca del desarrollo de los órganos florales de la familia Asteraceae (Liu et al., 2024).

Debido a la importancia económica que representa el colorante que se sintetiza en las inflorescencias y a que este es producido por los carotenos, el énfasis de los análisis ómicos ha sido identificar las vías metabólicas involucradas en la producción de carotenos. En este sentido, se han generado repositorios ómicos con datos de los paisajes transcripcionales y metabólicos durante las etapas de la floración. En el 2018, se realizó un primer análisis del paisaje transcripcional con la tecnología de Illumina HiSeq 2000 del tejido floral de *T. erecta*, en el que se ensamblaron un total de 72,499 unigenes, de los cuales 34,892, es decir, el 48% fueron anotados en Swiss-Prot/Pfam (www.uniprot.org/), GO (Gene Ontology) (www.geneontology.org/) y KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (www.genome.jp/kegg/). Se identificaron 11,721 genes expresados diferencialmente en hojas, tejido floral inmaduro y maduro. Los genes expresados diferencialmente en el tejido floral estuvieron involucrados principalmente en la fotosíntesis y la biosíntesis de metabolitos secundarios. Además, se determinaron los unigenes relacionados con la biosíntesis de los carotenoides, los cuales también se validaron por RT-qPCR (Feng et al., 2018). Los resultados sugieren que la expresión diferencial de los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides podría explicar el alto contenido de pigmento en *T. erecta* (Feng et al., 2018).

En un segundo análisis de los paisajes transcripcionales y metabolómicos, se identificaron los transcritos con expresión diferencial y las vías metabólicas involucradas en la producción de carotenos en dos líneas; la mutante V-01 de pétalos color naranja y una mutante natural con pétalos amarillos V-01M (Zhang et al., 2020). Es importante mencionar que, a partir de los datos de los perfiles

transcripcionales de la vía de biosíntesis de los carotenoides, construimos un gráfico de tipo heatmap, con los perfiles transcripcionales de los elementos más importantes de la vía de biosíntesis (Figura 4 B). De acuerdo con los resultados, se identificaron las enzimas y sus perfiles de expresión involucradas en la biosíntesis, transporte y degradación de carotenoides que estuvieron reguladas diferencialmente en ambas líneas. Inicialmente, se identificaron las enzimas que catalizan la conversión de fitoeno en licopeno (Figura 4 A) (Zhang et al., 2020). En el análisis transcriptómico y metabolómico se identificaron las enzimas involucradas en la fase catalítica; la PDS, la Z-ISO, la ZDS y la CRTISO, que fueron reguladas positivamente de manera significativa en las etapas III y IV (Zhang et al., 2020). De manera consistente, LCY- β , LCY- ϵ , HYD- β y HYD- ϵ se regularon positivamente en las etapas III y IV (Figura 4 A) (Zhang et al., 2020).

La inducción en la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides está relacionada con el aumento en la pigmentación de las flores en las etapas de desarrollo III y IV, durante la expansión de los pétalos. Tanto V-01 como V-01M tuvieron un patrón de expresión similar de estos genes. Sin embargo, los genes que codifican para las enzimas de degradación de carotenoides se expresan de manera diferencial entre V-01 y V-01M (Zhang et al., 2020). Este resultado sugiere que la vía de síntesis de carotenoides se mantiene inducida en ambas líneas, sin embargo, la vía de degradación de los carotenoides está sobreexpresada en la línea V-01 y bajamente expresada en la línea mutante V-01M (Zhang et al., 2020). En otras palabras, en ambas líneas se sintetizan los carotenoides de manera similar, pero en la línea V-01 se degradan más rápido que en la mutante V-01M (Figura 4 A y B).

Estos resultados son consistentes de acuerdo con otro análisis ómico realizado en tres variedades de *T. erecta*, en el que se identificó un mayor contenido de luteína, en la variedad 'Juwang' de flor naranja y 'Taishan' de color amarillo anaranjado, que en la variedad de flor amarilla 'Quanwang'. Las variedades 'Juwang' 'Taishan' mostraron una significativa sobreexpresión de genes en la vía de biosíntesis de carotenoides, especialmente la PDS, la PSY y la ZDS, mientras que los genes que codifican las enzimas de escisión de carotenoides CCD se regularon bajamente durante el desarrollo de la inflorescencia en la variedad con mayor contenido de luteína 'Juwang'. Además, se aislaron tres genes *TePDS*, *TePSYS3* y *TeZDS* y se transformaron en tomate (Qiu et al., 2024). La sobreexpresión de *TePDS* o *TeZDS* resultó en la promoción de la maduración de la fruta y la acumulación de carotenoides en las líneas transgénicas. Por otro lado, *TePSYS3* de *T. erecta* mostró múltiples efectos, no solo en la biosíntesis de carotenoides de la fruta sino también en los patrones de pigmentación en los tejidos vegetativos y en el crecimiento de la planta (Qiu et al., 2024). En conjunto, las variaciones en los perfiles de expresión de los genes biosintéticos contribuyen con el cambio dinámico de los niveles de carotenoides y a la diversidad de coloración de las inflorescencias en *T. erecta* (Qiu et al., 2024).

Esta información acerca del estado del arte de las ciencias ómicas de *T. erecta*, es fundamental en las nuevas estrategias genómicas de preservación y conservación de la especie, además de que permitirán proponer pruebas de hipótesis acerca de las estrategias moleculares y fenotípicas que están relacionadas con el número y tamaño de inflorescencias, así como la síntesis de los carotenoides producidos en cempoalxóchitl, que se requieren para la industria de la floricultura o bien, para la producción de suplementos alimenticios usados en la industria alimenticia.

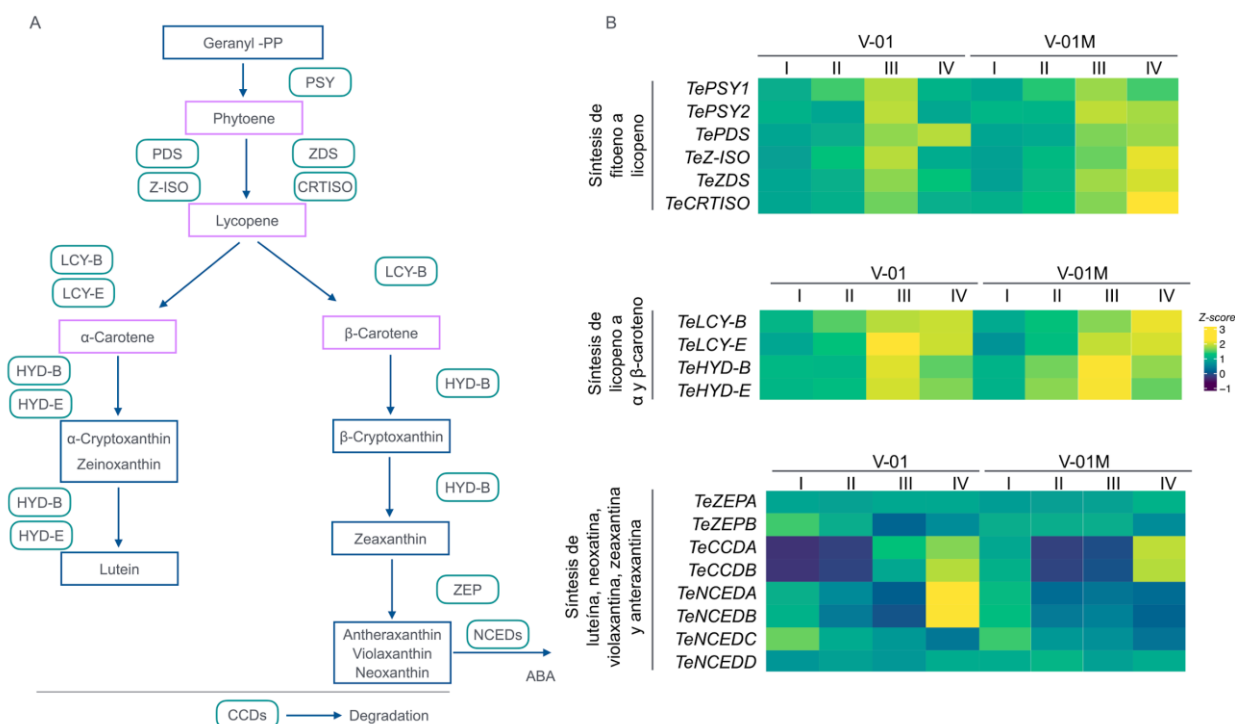


Figura 4. Vía de síntesis y degradación de los carotenoides y paisaje transcripcional en flores. En el panel **A**, se ilustra la vía de síntesis y degradación de los carotenoides y en el panel **B**, los perfiles de expresión de genes que codifican enzimas que participan en la biosíntesis y degradación de carotenoides en las flores de cempoalxóchitl. Los niveles de expresión génica en las cuatro etapas de desarrollo de las flores de cempoalxóchitl (*T. erecta*) 'V-01' y 'V-01M' están representados en el *heatmap*. Las nomenclaturas de las enzimas son: Fitoeno sintasa PSY, fitoeno desaturasa PDS, Z-ISO 15-cis-zeta-caroteno isomerasa, ZDS zeta-caroteno desaturasa, CRTISO proliscopeno isomerasa, LCY- β licopeno beta ciclasa, LCY- ϵ licopeno épsilon ciclasa, HYD- β anillo beta hidroxilasa, HYD- ϵ caroteno épsilon-monooxigenasa, ZEP zeaxantina epoxidasa, CCD dioxigenasa de escisión de carotenoides, NCED 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa.

Biología para la producción de *T. erecta* mediante cultivo de tejido vegetal y transformación genética

Desde su disseminación por Europa, se han desarrollado muchas variedades de cempoalxóchitl entre las que se encuentran las siguientes: Atlantis, Cortez, Discovery, Galore, Jubilé, Ladies, Piezas de Oro y Vainilla (Serrato-Cruz, 2004). Sin embargo, debido a sus diversas aplicaciones, el incremento en su demanda ha requerido de esfuerzos para incrementar su producción y el rendimiento de sus compuestos derivados. El cultivo de tejido vegetal ha sido una herramienta muy

útil y clave para el desarrollo de sistemas eficientes en la regeneración de plantas completas de *T. erecta*, para preservar sus características morfológicas. Se ha estudiado la suplementación de los explantes con ácido ascórbico o reguladores de crecimiento como las auxinas, las citocininas y las giberelinas en diferentes dosis. No obstante, otra estrategia exitosa ha sido la transformación genética de forma estable o transitoria, de plantas compuestas para manipular rutas metabólicas y la producción de compuestos de interés. Por ejemplo, en 2015, Gupta y Rahman establecieron un protocolo para la transformación estable de *T. erecta* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* mediante el uso de hipocótilos. Posteriormente, se reportó la producción eficiente de tiofenos, compuestos sulfurosos heterocíclicos que poseen actividad biocida en cultivos de raíces pilosas transformadas con *A. rhizogenes* (Gupta et al., 2016).

Aplicaciones biotecnológicas del cempoalxóchitl: Potencial en tecnología, fitorremediación y agricultura

Debido a su elevada capacidad antioxidante, el extracto de *T. erecta* se ha estudiado en la síntesis de nanopartículas estables de plata con potencial terapéutico (Tyagi et al., 2021). Por otro lado, a partir de las flores de *T. erecta* se ha logrado la generación de puntos cuánticos de grafeno, un material luminiscente con propiedades llamativas como lo son: una baja toxicidad, una alta biocompatibilidad, una emisión fluorescente ajustable y una alta estabilidad con aplicaciones en la electrónica y la biomedicina (Gupta et al., 2021). Otro aspecto importante es la implementación de tecnologías de remediación del suelo y de los mantos acuíferos mediante el uso de plantas acumuladoras o hiper acumuladoras de metales pesados como lo es *T. erecta*, , por ser una alternativa sustentable al uso de los métodos convencionales (lavado de suelos, solidificación, vitrificación, remediación electrocinética, etc.) (Yan et al., 2020). En este sentido, mientras que, en la mayoría de las plantas, concentraciones superiores a 39 mg/kg de peso seco de cadmio generan toxicidad, interfiriendo en el arreglo de la cromatina y la actividad fotosintética e inhibiendo el desarrollo, *T. erecta* tiene una alta capacidad para acumular metales pesados como el cromo (3.2 mg/kg de peso seco), el cobre (150-400 mg/kg de peso seco), el cadmio (57 mg/kg de peso seco) y el plomo (1.3 mg/kg de peso seco) (Castillo et al., 2011; Chitraprabha y Sathyavathi, 2018; Małkowski et al., 2019; Rungruang et al., 2011).

En lo que respecta a su aplicación en la agricultura, en las hojas de *T. erecta* se ha referido la presencia de compuestos de tipo monoterpenos y sesquiterpenoides, los cuales pueden tener actividad herbicida, lo que podría proponer a los extractos de *T. erecta* como una alternativa en una agricultura más sustentable (Laosinwattana et al., 2018). Aunado a esto, el potencial del extracto de *T. erecta* en el control de nemátodos fitoparásitos representa una enorme ventaja al tratarse de compuestos de toxicidad selectiva y biodegradables (Bhattacharyya, 2017).

PERSPECTIVAS

Aunque México es el centro de origen de *T. erecta*, no se está aprovechando la inmensa biodiversidad de esta especie (se cuenta con aprox. 2000 accesiones en bancos de germoplasma) para su uso industrial y es una gran paradoja que nuestro país tenga que importar prácticamente la totalidad del pigmento derivado de esta especie. Para las necesidades nacionales, principalmente para uso en la industria avícola, se cuenta con las herramientas científicas y tecnológicas para generar variedades de alto rendimiento tanto de biomasa de las inflorescencias como de concentración de carotenoides, incluso estimular la producción de uno de ellos. Pero es necesaria la vinculación entre el sector académico y el sector industrial, así como el apoyo de las autoridades federales.

La industria del cempoalxóchitl en México tiene el potencial de ser un motor de desarrollo económico y social, especialmente en zonas rurales. El cultivo del cempoalxóchitl puede ser una opción viable para los agricultores que buscan diversificar sus ingresos y generar empleos en sus comunidades. El desarrollo de una industria sustentable y rentable del cempoalxóchitl requiere de una visión a largo plazo que involucre la investigación, la innovación, la colaboración entre el sector académico y la industria, y la creación de sistemas de producción eficientes. El cempoalxóchitl es un tesoro mexicano con un futuro brillante. Con la inversión adecuada en investigación y desarrollo, México puede recuperar su posición como líder en la producción de carotenoides a nivel mundial, generar empleos, impulsar el desarrollo económico y contribuir a la seguridad alimentaria.

Agradecimientos

La cátedra de investigación: Innovación agroindustrial: eficiencia en la utilización de recursos y sustentabilidad frente al cambio climático, clave CI2452, agradece a la Secretaría de Posgrado e Investigación y al Centro de Enseñanza Agropecuaria (CEA) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, por el apoyo recibido. Agradecemos a CONAHCyT por las becas posdoctorales a Janet Palacios-Martínez (No. 2342655) y a Ana Isabel Chávez-Martínez (No. 4057713).

REFERENCIAS

- Bhattacharyya, M. 2017. Use of marigold (*Tagetes* sp.) for the successful control of nematodes in agriculture. *The Pharma Innovation*, 6(11, Part A), 1.
- Castillo, O. S., Dasgupta-Schubert, N., Alvarado, C. J., Zaragoza, E. M., and Villegas, H. J. 2011. The effect of the symbiosis between *Tagetes erecta* L.(marigold) and *Glomus intraradices* in the uptake of Copper (II) and its implications for phytoremediation. *New biotechnology*, 29(1), 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.05.009>.
- Chitraprabha K and Sathyavathi, S. 2018. Phytoextraction of chromium from electroplating effluent by *Tagetes erecta* (L.). *Sustainable Environment Research*, 28(3), 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.01.002>.
- Feng G, Huang S, Liu Y, Xiao F, Liu J, Zhang Z., ... X, Niu. 2018. The transcriptome analysis of *Tagetes erecta* provides novel insights into secondary metabolite biosynthesis during flower development. *Gene*. PMID: 29574190. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.051>.

- Galpaz N, Ronen G, Khalfia Z, Zamir D and Hirschberg J. 2006. A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *The Plant Cell*, 18(8), 1947-1960. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039966>.
- Gupta GK, Sagar P, Srivastava M, Singh AK, Singh J, Srivastava SK and Srivastava A. 2021. Excellent supercapacitive performance of graphene quantum dots derived from a bio-waste marigold flower (*Tagetes erecta*). *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(77), 38416-38424. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.09.094>.
- Gupta, V and ur Rahman, L. 2015. An efficient plant regeneration and Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Tagetes erecta*. *Protoplasma*, 252, 1061-1070. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0740-y>.
- Gupta, V., Shanker, K., and ur Rahman, L. 2016. In vitro production of thiophenes using hairy root cultures of *Tagetes erecta* (L.). *African Journal of Biotechnology*, 15(17), 706-713. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.14483>.
- Gupta YC, Panwar S, Banyal N, Thakur N and Dhiman, M. R. 2022. Marigold. In *Floriculture and Ornamental Plants* (pp. 1-23). Singapore: Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1554-5_1-1.
- Hadden, W. L., Watkins, R. H., Levy, L. W., Regalado, E., Rivadeneira, D. M., van Breemen, R. B., and Schwartz, S. J. 1999. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 4189-4194. <https://doi.org/10.1021/jf990096k>.
- Huang, X., Gao, W., Yun, X., Qing, Z., & Zeng, J. (2022). Effect of natural antioxidants from marigolds (*Tagetes erecta* L.) on the oxidative stability of soybean oil. *Molecules*, 27(9), 2865. <https://doi.org/10.3390/molecules27092865>.
- Jiang F, Yuan L, Wang S, Wang H, Xu D, Wang and Fan W. 2023. Improved chromosome-level genome assembly for marigold (*Tagetes erecta*). *BiorXiv*. doi.org/10.1101/2023.07.25.550479
- Liu C, Wang F, Li R, Zhu Y, Zhang C and He Y. 2024. Marigold (*Tagetes erecta*) MADS-Box Genes: A Systematic Analysis and Their Implications for Floral Organ Development. *Agronomy*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/agronomy14091889>.
- Małkowski, E., Sitko, K., Zieleźnik-Rusinowska, P., Gieroń, Ż., and Szopiński, M. 2019. Heavy metal toxicity: Physiological implications of metal toxicity in plants. *Plant metallomics and functional omics: a system-wide perspective*, 253-301. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19103-0_10.
- Millán, J. L. S. 2010. Análisis del efecto de la radiación fotosintéticamente activa en la biosíntesis de carotenoides en *Tagetes erecta* L. [Tesis de Doctorado]. México. Universidad Nacional Autónoma de México; 2010. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/73280>.
- Park YJ, Park SY, Valan Arasu M, Al-Dhabi NA, Ahn HG, Kim JK and Park SU. 2017. Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of *Tagetes* flowers. *Molecules*, 22(2), 313. <https://doi.org/10.3390/molecules22020313>.
- Qiu, Y., Wang, R., Zhang, E., Shang, Y., F, Guodong., ... Xiang, N. 2024. Carotenoid biosynthesis profiling unveils the variance of flower coloration in *Tagetes erecta* and enhances fruit pigmentation in tomato. *Plant Science*. 347. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2024.112207>.
- Riyazuddin, R., Nisha, N., Ejaz, B., Khan, M. I. R., Kumar, M., Ramteke, P. W., and Gupta, R. 2021. A comprehensive review on the heavy metal toxicity and sequestration in plants. *Biomolecules*, 12(1), 43
- SEMARNAT. (10 de junio de 2021). Seis flores endémicas que son un regalo de México para el mundo. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/seis-flores-endemicas-que-son-un-regalo-de-mexico-para-el-mundo?idiom=es>
- Rungruang, N., Babel, S., and Parkpian, P. 2011. Screening of potential hyperaccumulator for cadmium from contaminated soil. *Desalination and water treatment*, 32(1-3), 19-26. <https://doi.org/10.5004/dwt.2011.2672>.
- Serrato-Cruz MA 2004. Cempoalxóchitl: Diversidad biológica y usos. *Ciencia y Desarrollo en Internet*. Julio-Agosto, pp 1-6. Available online: <http://www.conacyt.mx/comunicacion/revista/181/articulos/pdf/Cempoalxochit.pdf>
- Shukla, A., and Thakur, R. 2018. First report of Septoria leaf spot on marigold (*Tagetes erecta* L.) from Himachal Pradesh, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 7(1), 1744-1748. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.211>.
- Tyagi, P. K., Tyagi, S., Gola, D., Arya, A., Ayatollahi, S. A., Alshehri, M. M., and Sharifi-Rad, J. 2021. Ascorbic acid and polyphenols mediated green synthesis of silver nanoparticles from *Tagetes erecta* L. aqueous leaf extract and studied their antioxidant properties. *Journal of Nanomaterials*, 2021(1), 6515419. <https://doi.org/10.1155/2021/6515419>.
- Wang, W., Xu, H., Chen, H., Tai, K., Liu, F., and Gao, Y. 2016. In vitro antioxidant, anti-diabetic and antilipemic potentials of quercetagenin extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.) inflorescence residues. *Journal of food science and technology*, 53, 2614-2624. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2228-6>.
- Xin, H., Ji, F., Wu, J., Zhang, S., Yi, C., Zhao, S., ... and Zhang Z. 2023. Chromosome-scale genome assembly of marigold (*Tagetes erecta* L.): An ornamental plant and feedstock for industrial lutein production. *Horticultural Plant Journal*, 9(6), 1119-1130.
- Yan A, Wang Y, Tan SN, Mohd Yusof ML, Ghosh S and Chen Z. 2020. Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Frontiers in plant science*, 11, 359. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>
- Yatsunami R, Ando A, Yang Y, Takaichi S, Kohno M, Matsumura Y, ... and Nakamura, S. 2014. Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Frontiers in microbiology*, 5, 100. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00100>.
- Zhang H, Zhang S, Zhang H. et al. 2020. Carotenoid metabolite and transcriptome dynamics underlying flower color in marigold (*Tagetes erecta* L.). *Sci Rep* 10, 16835. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73859-7>.

Aprovechamiento agroindustrial de la candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*)

Guerrero-Manzanares María Lizbeth¹, Lara-Viveros Francisco Marcelo², Rodríguez-Hernández Ana Margarita², García-Amaro Quetzalli Maricela⁴, Ortega-Ortega Yolanda², de León-Santillán Arxel³, Ledezma-Pérez Antonio Serguei³, Díaz-Cervantes Erik⁵, Castillo-Campohermoso Marco Antonio²✦

¹Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Estudiante de Posgrado, Blvd. Enrique Reyna No. 140. Colonia San José de los Cerritos. Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25294.

²Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Biociencias y Agrotecnología, Blvd. Enrique Reyna No. 140. Colonia San José de los Cerritos. Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25294.

³Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). 90. Materiales Avanzados, Blvd. Enrique Reyna No. 140. Colonia San José de los Cerritos. Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25294.

⁴Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Estudiante de Licenciatura. Calz. Antonio Narro 1923, Buena Vista, C.P. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

⁵Departamento de Alimentos, Centro Interdisciplinario del Noreste de la Universidad de Guanajuato, Tierra Blanca, Guanajuato C.P. 37975, México.

✦Correspondencia: marco.castillo@ciqua.edu.mx

Área Temática: Ciencias Ambientales

Recibido: 06 diciembre, 2024

Aceptado: 21 julio, 2025

Publicado: 25 julio, 2025

Cita: Guerrero-Manzanares ML, Lara-Viveros FM, Rodríguez-Hernández AM, García-Amaro QM, Ortega-Ortega Y, Santillán A, Ledezma-Pérez AS, Díaz-Cervantes E y Castillo-Campohermoso MA 2025. Aprovechamiento agroindustrial de la candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*). *Bioc Scientia* 1(2). <https://doi.org/10.63622/RBS.2412>



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Resumen: Este trabajo de revisión se enfoca en el aprovechamiento sostenible de la candelilla, una planta de gran importancia económica, social e industrial nativa de las zonas áridas del norte de México. La cera extraída de esta planta es ampliamente utilizada en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria, pero su explotación tradicional enfrenta serios desafíos relacionados con la sostenibilidad ambiental y el bienestar de los candelilleros. A través de una revisión de literatura y entrevistas, este artículo aborda estos problemas sugiriendo soluciones innovadoras en los ámbitos culturales, agronómicos, ambientales y tecnológicos. El trabajo destaca la necesidad de transformar los métodos tradicionales de extracción, que suelen ser contaminantes y peligrosos para la salud de los productores. Entre las técnicas propuestas se encuentra el uso de dióxido de carbono en estado supercrítico, que ofrece un proceso limpio y eficiente, mejorando la calidad de la cera y reduciendo el impacto ambiental. Además, se sugiere la implementación de prácticas agronómicas como el establecimiento del cultivo, la micropropagación y la conservación de suelos para garantizar la sostenibilidad del cultivo. En el ámbito tecnológico, se promueve la trazabilidad digital y el uso de inteligencia artificial para optimizar la recolección, mejorar la calidad del producto y fortalecer la logística de comercialización. Estas innovaciones también contribuyen a agregar valor económico al recurso, beneficiando a las comunidades rurales que dependen de esta actividad. Es crucial capacitar a los candelilleros en prácticas sostenibles, desarrollar políticas públicas que incentiven la investigación y brinden apoyo técnico y financiero. Estas acciones no solo protegerán la biodiversidad y el ecosistema, sino que también fortalecerán la economía local y el desarrollo industrial basado en la cera de candelilla, promoviendo un equilibrio entre conservación y progreso.

Palabras clave: Candelilla, Sostenibilidad, Cera vegetal, Extracción limpia, Innovación agroindustrial.

Abstract: This review paper focuses on the sustainable utilization of candelilla, a plant of significant economic, social, and industrial importance native to the arid regions of northern Mexico. The wax extracted from this plant is widely used in the cosmetic, pharmaceutical, and food industries. However, traditional harvesting practices face serious challenges related to environmental sustainability and the well being of candelilla harvesters. Through a literature review and expert interviews, this article addresses these issues and proposes innovative solutions across cultural, agronomic, environmental, and technological domains. It underscores the urgent need to transform conventional extraction methods, which are often polluting and hazardous to workers' health. Among the proposed alternatives is the use of supercritical carbon dioxide, which enables a clean and efficient process, enhancing wax quality while reducing environmental impact. The paper also advocates for the implementation of agronomic practices such as crop establishment, micropropagation, and soil conservation to ensure the long term sustainability of candelilla cultivation. On the technological front, the integration of digital traceability tools and artificial intelligence is recommended to optimize harvesting, improve product quality, and strengthen supply chain logistics.

These innovations contribute to adding economic value to the resource and benefit rural communities that rely on this activity. Capacity building for candelilla workers in sustainable practices, the development of public policies that support research, and the provision of technical and financial assistance are identified as critical actions. Such measures will not only protect biodiversity and local ecosystems but also enhance local economies and foster industrial development based on candelilla wax, promoting a balance between conservation and progress.

Keywords: Candelilla, Sustainability, Plant wax, Clean extraction, Agroindustrial innovation.

INTRODUCCIÓN

Para realizar este trabajo se llevó a cabo una revisión bibliográfica de diversos documentos científicos y técnicos, seleccionados por su relevancia y actualidad en relación con la integración de la cadena de valor del aprovechamiento agroindustrial de la candelilla. Esta revisión incluyó revistas, bases de datos, y trabajos de tesis, con el objetivo de garantizar un análisis integral sobre el tema de estudio, permitiendo comprender el impacto multidimensional del aprovechamiento de la candelilla y su relevancia. Este enfoque holístico busca ofrecer una visión completa y fundamentada que contribuya al desarrollo sostenible y al conocimiento profundo de esta planta y su industria asociada. Sin embargo, es necesario recalcar que existen pocos artículos científicos que abordan de manera integral los aspectos agrónómicos, sociales, tecnológicos y culturales en la primera etapa de la cadena de valor de la candelilla (*Euphorbia antisiphilitica*). La mayoría de las investigaciones se han centrado en las fases finales del proceso, particularmente en la extracción, caracterización y mejoramiento del producto final de la cera con fines industriales y comerciales. Esta tendencia deja un vacío importante en el conocimiento sobre las prácticas agrícolas, las condiciones socioeconómicas de los productores, las tecnologías aplicables en campo y las dimensiones culturales asociadas al cultivo y aprovechamiento de la planta. Dado el creciente interés por esta agroindustria en los últimos años, resulta crucial reconocer esta etapa inicial como un área de oportunidad estratégica para la investigación científica, que permita impulsar un desarrollo más sustentable, equitativo e innovador de la agroindustria de la candelilla.

Es importante mencionar que la candelilla es una planta nativa de las zonas áridas y semiáridas del norte de México, la cual ha tenido una gran importancia en las comunidades rurales que han habitado en la zona durante muchas generaciones. El principal estado ubicado al noreste de México que explota este recurso es Coahuila, donde alrededor de 95 comunidades ejidales subsisten gracias a la explotación de éste y otros recursos (Mycotte et al., 2021). La planta es de suma importancia socio-económica ya que la cera que se extrae de sus tallos tiene amplia relevancia principalmente en las industrias cosméticas, farmacéuticas, de alimentos y recubrimientos (Moreno et al., 2019). La candelilla desde hace más de 100 años ha

sido un recurso forestal no maderable muy esencial para la economía de las regiones semiáridas del noreste mexicano, pero su recolección en estado silvestre plantea desafíos en cuanto a sostenibilidad y conservación ambiental (Rojas et al., 2011).

Durante varios años, el método de recolección de la cera de candelilla no ha sido modificado, sigue siendo principalmente manual y tradicional, lo que ha llevado a una explotación intensiva de la planta en su entorno natural (Núñez et al., 2022). Este modelo de uso, genera altas preocupaciones sobre su sostenibilidad a largo plazo, ya que la recolección de una manera descontrolada puede amenazar las poblaciones de candelilla, por lo que puede llegar a afectar la biodiversidad del ecosistema y reducir la disponibilidad de la planta para futuras generaciones (Rojas et al., 2021). Además, el trabajo de recolección y extracción de cera de candelilla ha sido históricamente una fuente clave de ingresos para las comunidades locales, aunque muchas veces este trabajo carece de un manejo adecuado y tecnologías que mejoren la eficiencia y minimicen tanto el impacto ambiental como la salud humana (López, 2014).

Desde una perspectiva de salud ocupacional, el proceso tradicional expone a los trabajadores a condiciones peligrosas. El uso de ácido sulfúrico para llevar a cabo la extracción de cera de candelilla, la inhalación de vapores y el manejo sin equipo de protección personal, puede provocar afecciones respiratorias, quemaduras dérmicas y daños oculares (Rojas et al., 2021). A esto se suma la inhalación constante de humo proveniente de la combustión de leña, comúnmente utilizada como fuente de energía térmica.

En el plano ambiental, la actividad también tiene repercusiones, por ejemplo, el vertido de residuos líquidos contaminados con ácido, sin tratamiento adecuado, representa un riesgo potencial para los cuerpos de agua y el equilibrio ecológico de las zonas de extracción (Rojas et al., 2021).

En cuanto al rendimiento, el proceso artesanal presenta una eficiencia limitada. Se estima que se requieren entre 800 y 1,000 kilogramos de biomasa vegetal para obtener apenas entre 30 y 40 kilogramos de cera, dependiendo de las condiciones del proceso y la calidad del material vegetal. Este bajo rendimiento, sumado a las condiciones de trabajo y al impacto ambiental, subraya la necesidad urgente de implementar tecnologías más limpias y eficientes, así como programas de capacitación y apoyo técnico para los productores (Emmanuel et al., 2022).

La transición hacia modelos sostenibles de aprovechamiento no solo permitiría reducir los riesgos asociados a la salud y el ambiente, sino también mejorar la competitividad del producto en mercados internacionales que actualmente valoran la trazabilidad, la ética de producción y el cumplimiento de criterios ambientales.

Ante estas situaciones, surge la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que permitan un mejor aprovechamiento de la cera de candelilla de una manera más sostenible. Esta revisión bibliográfica busca identificar, conocer y evaluar métodos eficientes e innovadores que optimicen la extracción, recolección y uso de la cera de candelilla, considerando cuatro aspectos claves: cultural, agronómico, ambiental y tecnológico.

CANDELILLA (*E. antisiphilitica*)

La Candelilla es un arbusto perenne (Figura 1), con tallos cilíndricos, densamente compactos, erectos, recubiertos de cera, con apariencia de pequeñas velas, sin hojas y en temporada de lluvias se llena de flores pequeñas (Rojas et al., 2011). La planta crece en laderas con suelo calcáreo, de origen aluvial, someros (menor a 25 cm), de textura franco arenosa, poco profundos, pedregosos, con buen drenaje, ricos en carbonato de calcio, con un pH que va de 7.4 a 8.4 y pobres en nitrógeno (Rojas et al., 2011). Son arbustos con un diámetro aproximado a 90 cm, la raíz es pequeña; aunque una planta de tamaño moderado puede desarrollar más de 100 tallos de color verde grisáceo, con dimensiones típicas de 30-60 cm de largo y de 0.1-1.0 cm de diámetro (Romahn, 1985).



Figura 1. Candelilla creciendo en su hábitat natural, con tallos delgados y erguidos característicos de esta especie, utilizada para la producción de cera natural (fotografía del autor de correspondencia).

Aspectos culturales y principales usos de la Candelilla

Indagando en la historia, la producción de cera de candelilla tuvo su auge durante la Segunda Guerra Mundial, cuando se utilizaba para impermeabilizar y proteger de los mosquitos, las telas de las tiendas de campaña, así como para cubrir y prevenir el deterioro de algunas partes de los aviones y la fabricación de explosivos (Rojas et al., 2011). Aunque la cera de candelilla tiene un gran número de aplicaciones industriales, se ha demostrado que es posible gelificarla junto con ciertas olefinas, lo cual permite mejorar sus propiedades eléctricas al tratarse de un material de alta resistencia (Cabello et al., 2013). También la cera se utiliza principalmente en la industria cosmética como emoliente y agente formador de películas (Martínez, 2022). En general, el mercado es impulsado por la preferencia del consumidor por un cosmético "natural", de esta manera, hay un aumento en la demanda de cera para la producción de rímel, uno de los productos cosméticos más utilizados, seguido por el lápiz labial y lápiz cosmético o delineador de ojos (Emmanuel et al., 2022). Estos productos tienen buena resistencia a la sudoración, debido a un fenómeno de excreción de aceite en la superficie de la barra de labios (Cabello et al., 2013).

Por otro lado, se utiliza también en algunos alimentos como: goma de mascar, café, substitutos del café, té, infusiones de hierbas, cereales calientes y bebidas que contengan gran contenido de cacao, dulces, incluidos los caramelos duros y blandos, y decoraciones (decoraciones de pasteles y galletas) (Emmanuel et al., 2022). Además, se usa en la fabricación, de películas comestibles que, complementadas con un potente antioxidante como es el ácido gálico, ácido elágico y *Aloe vera*, extienden la vida de anaquel y aumentan el potencial antioxidante, así como la calidad nutricional de las frutas y verduras recién cortadas (Cabello et al., 2013).

Adicionalmente, la cera se obtiene de la recolecta comercial de la candelilla, y cuyo aprovechamiento se remonta a 1914, año en que los señores Borrego y Flores diseñaron un método sencillo para la extracción de la cera, que consiste en la recolección total de la planta y posterior ebullición en una solución agua-ácido sulfúrico, método que en la actualidad todavía es utilizado (Rojas et al., 2011). El método tradicional comienza con la recolección de la planta de candelilla, la cual es arrancada de raíz sin respetar lo establecido en la NOM-018-SEMARNAT-1999 "la cual establece los requisitos y especificaciones para el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de candelilla en su estado natural. Su objetivo principal es regular la extracción de esta especie vegetal para evitar su sobreexplotación y contribuir a su conservación, promoviendo prácticas sostenibles en zonas áridas y semiáridas del país". (Diario Oficial de la Federación 1999), para posteriormente colocar los

“tercios” de planta en calderos de hierro llamados “pailas”, con una solución de ácido sulfúrico a una concentración aproximada del 0.3 % (SEMARNAT 1999).

Un “tercio”, es la unidad de medida equivalente a una “brazada”, es decir, lo que se alcance a tomar entre los dos brazos abiertos; en kilogramos corresponde entre 24 y 32 kg de planta, la variación responde al contenido de humedad de la planta (Torres et al., 2015). Cada paila (recipiente o contenedor, generalmente metálico que se utiliza en el proceso de extracción artesanal de la cera de candelilla) tiene una capacidad de 500 L, allí se introducen ocho “tercios” (192 a 256 kg) de candelilla por extracción o “pailada”. La carga inmersa en la solución agua-ácido se calienta a fuego directo hasta el punto de ebullición de la solución, lo que permite la fusión de la cera y el desprendimiento de la planta (Rojas et al., 2011). Mediante esta técnica (Figura 2), la cera de candelilla fundida flota en la superficie del agua como espuma. Enseguida se retira de la “paila” utilizando utensilios perforados denominados “espumaderas” que permiten separar la cera del agua y los residuos sólidos, con las cuales se pasa a tanques de acero, cubetas o moldes de barro que se colocan a nivel de piso. En cualquiera de los recipientes, la espuma caliente (cera) se separa por decantación, de un líquido pardo que precipita hacia el fondo, para posteriormente reciclarse en la “paila” de extracción (CONABIO 2022). En la parte superior de la “paila”, se forma una capa fina de color amarillo, que constituye la cera de candelilla. Se retira con la ayuda de las espumaderas y se deja enfriar hasta solidificarse a temperatura ambiente (cerote, es decir, bloque sólido de cera cruda) (Torres et al., 2015). Después se quiebra en pedazos con golpes de martillo, y los trozos se refunden en un recipiente cilíndrico de hierro (cortador) con la misma solución ácida con la que se realizó la extracción en la “paila”, a fin de eliminar las impurezas de tierra y materia orgánica, que finalmente se separan por sedimentación (Flores, 2013). La cera decantada, conocida como “cera de candelilla cruda”, se deja enfriar y solidificar. Para refinar la cera es necesario quebrarla, fundirla y filtrarla a través de carbón activado y de algunos otros medios filtrantes (Torres et al., 2015).

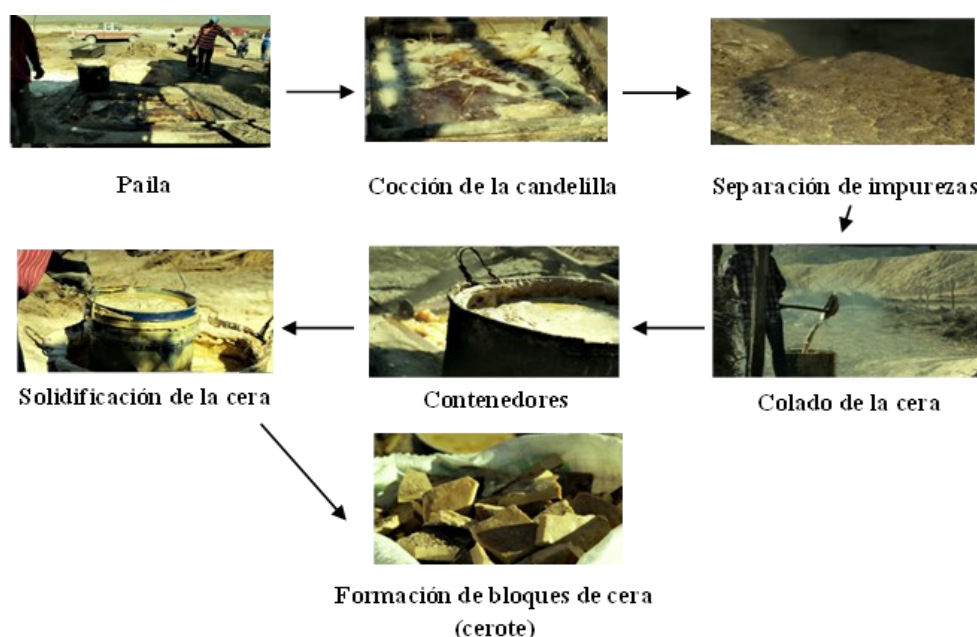


Figura 2. Técnica y proceso de extracción de cera de candelilla (Fotografías del autor de correspondencia).

Analizando la técnica y proceso tradicional de extracción de cera se sugiere que se podría mejorar dicho proceso mediante la implementación de sistemas de control automático de temperatura para evitar el sobrecalentamiento, y con ello la pérdida de calidad de la cera (Torres et al., 2015). Mantener una temperatura uniforme aseguraría una extracción más eficiente y de mayor calidad. Torres (2015) sugirió la construcción e implementación de un horno que se ubique debajo de la paila, de manera que aproveche el calor residual generado durante el proceso de ebullición. Esta técnica permitiría una mayor eficiencia en el uso del combustible, ya que el horno se mantendría caliente incluso cuando no se esté añadiendo más leña, lo que optimizaría los recursos. Aunque actualmente existe una especie de horno debajo de la paila, este es simplemente un hoyo en la tierra sin ningún tipo de control ni cobertura adecuada, lo que limita su efectividad (Ochoa et al., 2010). La falta de un diseño controlado impide que se aproveche de manera óptima el calor generado, además de que no permite regular las condiciones térmicas necesarias para mejorar el rendimiento en la producción de cera. Por otro lado, se sugiere también el estudio de la aplicación de nanopartículas catalíticas para mejorar la purificación de la cera durante el proceso de extracción, obteniendo un producto más uniforme y con propiedades mejoradas (García, 2022). De suma importancia es ofrecer toda la información técnica disponible a los recolectores y procesadores para optimizar las prácticas tradicionales, reduciendo desperdicios y riesgos laborales. Por otra parte, Martínez (2022) propuso una tecnología alterna, en la que sustituye al ácido sulfúrico por ácido cítrico como extractor. Este agente presenta

la característica de no emitir gases tóxicos, es una alternativa muy buena e innovadora, pero en la actualidad los productores no quieren implementarla ya que obtienen más cantidad de cera usando ácido sulfúrico que con el ácido crítico, de acuerdo a la comunicación personal con el señor Gerardo Guerrero quien es un conocedor y experto de la candelilla en diferentes ejidos del estado de Coahuila.

Por otra parte Gerardo Guerrero, menciona que es muy importante que los candelilleros sean partícipes de talleres, conferencias, formaciones y capacitaciones técnicas, para que puedan mentalizarse y valorar acerca de todo lo bueno que pudiera ser un candelillero, ya que en la actualidad las personas que se dedican a esta actividad han mencionado el poco interés de seguir con el trabajo de extracción de la cera de candelilla, debido principalmente al problema del transporte de la planta al lugar de extracción (cada día son más los kilómetros que necesitan recorrer). Así mismo, menciona que la extracción de la cera de candelilla es un trabajo muy pesado y las empresas les pagan “lo mínimo” por el kilogramo de cerote. Sin embargo, el brindar capacitación a los candelilleros para informarles y actualizarles acerca de todo lo concerniente a la cera de candelilla, sería una magnífica estrategia de mejora. Por ejemplo, si los candelilleros conocieran que el valor económico de la cera aumenta según su coloración, especialmente cuando es más clara, probablemente procurarían obtener una cera más limpia y sin impurezas. La cera de candelilla blanca, al ser más pura, alcanza precios más altos en el mercado. Sin embargo, debido a la desinformación existente, muchos productores no conocen esta diferencia y los compradores suelen pagar el mismo precio tanto por la cera blanca como por la amarilla, lo que desincentiva la mejora en la calidad del producto. Por último, el Señor Guerrero, comenta que una estrategia sería implementar talleres prácticos de toda la cadena de valor de la cera de candelilla hacia las comunidades y emprendedores dedicados a esta maravillosa actividad y poder así fomentar un valor agregado a la cera de candelilla; ejemplo, que se les enseñe a realizar velas artesanales decorativas entre otros subproductos; aunado a un sin fin de productos más que se podrían derivar con el uso de la cera de candelilla.

Aspectos agronómicos

Dado que la candelilla es una planta silvestre de mucha relevancia e importancia económica, se están promoviendo técnicas de cultivo controlado en invernaderos que permitan su crecimiento sostenible sin afectar el ecosistema natural. También se exploran prácticas de manejo agronómico orientadas a mejorar el rendimiento del cultivo y reducir su impacto ambiental, tales como la propagación vegetativa controlada, la rotación de cultivos, el uso eficiente del agua mediante riego

por goteo y la aplicación de biofertilizantes y enmiendas orgánicas (Bartolomé, 2017). Se han desarrollado investigaciones sobre tecnología para la producción de plántulas de candelilla mediante semilla, estacas e hijuelos en vivero e invernadero para obtener plantas vigorosas y sanas que sirvan para la reforestación de zonas degradadas (Catalán et al., 2008).

Propagación

Para la propagación de la candelilla se han utilizado plantas completas con raíz, las cuales se exponen al sol de 10 a 15 días y se plantan en un suelo removido y con buena humedad durante el invierno, obteniendo una mortalidad del 10 %, lo que indica que la propagación y multiplicación de la candelilla durante el invierno no requiere de una preparación esmerada del suelo (Villa et al., 2010). También se ha señalado que el mejor método para reproducir a la candelilla en campo es por medio de la plantación de cinco tallos a distancias equidistantes de 50 x 50 cm, lo cual produce una regeneración de la planta superior al 300 % después de dos años (Catalán et al., 2008).

Propagación por semilla

La propagación de la candelilla por semilla presenta su mayor dificultad en la recolección, ya que el fruto “revienta” dejando escapar las semillas y como éstas son muy pequeñas, es difícil localizarlas en el suelo (Catalán et al., 2008). Una solución a esto es recolectar el fruto, ponerlo en recipientes de plástico o vidrio en un lugar soleado; estos recipientes deberán estar cubiertos con una malla para que cuando la semilla reviente, esta permanezca dentro del recipiente y no se pierda (Muñoz, 2019). Después de la obtención de las semillas, se seleccionan las que están en buen estado y se guardan en frascos de vidrio color ámbar o bien, en recipientes de plástico opacos que estén cerrados. Estos recipientes o frascos se almacenan a una temperatura entre 24 y 26 °C (Villa et al., 2010).

Poco se conoce sobre el porcentaje de germinación de la semilla y la respuesta de ésta a los tratamientos pregerminativos. Para la producción de planta mediante semilla, el mejor periodo de siembra de la candelilla en vivero es de marzo a junio, esto para tener una emergencia de plantas de siete a diez días después (Flores et al., 2013). En siembras durante este periodo, las plantas crecen más rápido dado que las condiciones de luz y temperatura son más adecuadas para su crecimiento (Muñoz, 2019). Se pueden sembrar en charolas germinativas, dejar las plantas hasta una altura de 15 cm y después trasplantarlas en recipientes más grandes como son las bolsas de plástico, hasta que las plantas crezcan de 30 a 35 cm y tengan un buen

desarrollo de raíces (Flores et al., 2013). Los riegos deben ser ligeros, principalmente después de la emergencia; estos son cada tercer día. Después, cuando las plantas tengan dos o más centímetros de altura, los riegos deberán ser más pesados y espaciarse hasta cinco días, dependiendo de las condiciones ambientales (López, 2007).

Propagación por estaca

La recolección de tallos se puede hacer durante todo el año, estos deben de tener buen aspecto y ser “fuertes”. Las estacas se escogen de la parte media del tallo que tengan de 20 a 25 cm y tres a cuatro nudos, se dejan siete días para que los cortes sellen o se forme callo (CONABIO 2008). Las estacas se cortan con unas tijeras con filo que deben ser desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 10%, por 30 minutos. El mejor método para reproducir a la candelilla en campo es por medio de la plantación de cinco tallos a distancias equidistantes de 50 x 50 cm, lo cual produce una regeneración de la planta superior al 300 % después de dos años (Catalán et al., 2008). Las estacas se plantan durante las primeras horas de la mañana en bolsas de plástico negro de tres litros de capacidad. Se recomienda poner al menos dos estacas por bolsa, clavándolas de 3 a 4 cm, y que al menos un nudo quede enterrado (Catalán et al., 2008). Las macetas con las estacas se colocan dentro de un invernadero de baja tecnología, con ventilación natural y con cubierta de plástico (López, 2007). Durante los primeros doce meses, se coloca con malla sombra sobre el techo del invernadero, con el fin de crear condiciones de temperatura más favorables para la brotación (Moreno et al., 2019). Las macetas se riegan cada tres días los primeros dos meses; después de la plantación, estos se van espaciando hasta regar cada siete días (Blancas, 2017). Las plantas de candelilla producidas por medio de estacas están listas para llevarse a campo a los 18 meses después de la plantación (Hernández, 2007).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), la recolección de estacas se hace después de un período de lluvias, estos deben de tener buen aspecto y deben de tener una altura de 17 a 20 cm (Hernández, 2007). Se llevan a un lugar sombreado y se seleccionan estacas con al menos dos tallos. Se dejan de 10 a 14 días para que la parte basal de las estacas forme callo. Es recomendable tratar a las estacas, antes de la plantación, con algún fungicida para prevenir enfermedades radiculares. Uno de ellos es captan 50, a razón de 1 g por L de agua por un tiempo de inmersión de la parte basal de los hijuelos de tres a cinco minutos (Canales et al., 2006).

Se plantan estacas con al menos dos tallos de 17 a 20 cm, en bolsas de plástico

negro de 3 L durante las primeras horas de la mañana. Estas bolsas se llenan con una mezcla de turba con arena (Catalán *et al.*, 2008). Un día antes de la plantación se aplica un riego hasta saturar el sustrato. El día de la plantación, se aplica otro riego para asegurar que las macetas tengan una humedad adecuada y evitar que las estacas se sequen. Se recomienda llevar a cabo la plantación de las estacas a finales de invierno o principios de la primavera, con el fin de lograr una brotación más temprana y crecimiento de brotes (López, 2007).

Con las técnicas anteriormente planteadas, se considera aplicar nuevas técnicas que permitan una propagación y manejo más sostenible como son la micropropagación, el mejoramiento genético y las prácticas de conservación de suelos, todas con un enfoque en la sostenibilidad agronómica y económica.

La micropropagación es una técnica que utiliza el cultivo de tejidos vegetales en condiciones controladas, para producir plantas genéticamente idénticas, a partir de pequeñas porciones de la planta madre (Moreno *et al.*, 2019). Esta técnica tendrá ciertas ventajas ya que permitiría una propagación masiva de plantas en menor tiempo, se podría garantizar la calidad genética de la planta y se podrán obtener plántulas capaces de adaptarse a condiciones específicas (Jakobek *et al.*, 1986). Por otro lado, se sugiere implementar el mejoramiento genético que busca desarrollar variedades de candelilla con características superiores, como mayor rendimiento de cera, tolerancia a condiciones extremas y resistencia a plagas y enfermedades.

Aspectos ambientales

El impacto ambiental de la candelilla depende de cómo se maneje su explotación. En condiciones naturales, contribuye positivamente al equilibrio ecológico y a la conservación de ecosistemas áridos. Sin embargo, las prácticas no sostenibles pueden llevar a la degradación del hábitat y a la pérdida de este recurso forestal no maderable (Contreras, 2007). La implementación de técnicas sostenibles y regulaciones efectivas serán esenciales para garantizar que la candelilla siga siendo un recurso valioso tanto para la industria como para el medio ambiente. Para ello se sugiere, como ya se mencionó, realizar plantaciones con manejo agronómico, lo cual ya se ha planteado años atrás; sin embargo, los ejidatarios no cuentan con el apoyo técnico-económico para poder implementarlo. Otra alternativa sería, que una vez realizados correctamente los estudios técnicos y las guías (documentos oficiales que permiten el transporte y comercialización legal de productos, subproductos o materias primas forestales), se conceda el permiso y el apoyo por cada estudio técnico para así realizar la plantación de candelilla en el ejido donde se está explotando (Ezcurra, 2003). Además, sería muy importante implementar Áreas Naturales

Protegidas (ANPs) para conservar los ecosistemas que albergan esta especie. Estas áreas no sólo protegen a la candelilla como parte de la biodiversidad local, sino que también mitigarían los impactos de su explotación no regulada, sin embargo, también es importante la implementación de sistemas para la remediación de suelos degradados ya que los suelos donde se encuentra la candelilla suelen estar en regiones áridas y semiáridas, propensas a la degradación debido a la erosión, la sobreexplotación y la baja fertilidad (Moreno et al., 2019). La remediación de estos suelos es clave para garantizar la sostenibilidad de los ecosistemas y del cultivo de candelilla (Núñez et al., 2022). Finalmente, implementar técnicas de conservación de suelos aseguraría un medio sostenible para su cultivo, por lo que ayudaría a mantener la fertilidad y productividad del suelo a largo plazo, proteger contra la desertificación, promover la regeneración natural del ecosistema, y reducir costos al minimizar el uso de fertilizantes y agua (Ávila, 2007).

ASPECTOS DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA

Bagazo

La cera de candelilla es uno de los recursos naturales del semidesierto mexicano más importantes y valiosos, con múltiples aplicaciones industriales. La incorporación de tecnologías innovadoras puede mejorar la eficiencia en la producción, reducir significativamente los impactos ambientales y promover un aprovechamiento más sostenible de la cera de candelilla (Bañuelos et al., 2019). Durante los procesos de extracción de cera de candelilla se generan toneladas de “residuos” (bagazo) al año, los cuales podrían ser considerados como subproductos con potencial agroindustrial de mayor valor agregado (Ávila, 2007). Este residuo presenta características nutricionales que lo convierten en sustrato para la producción de enzimas de interés biotecnológico como la elagitanasa (Bañuelos et al., 2019). También se ha demostrado que el bagazo presenta compuestos polifenólicos como los elagitaninos de alto peso molecular, con capacidades biológicas importantes, tales como antioxidante y antimicrobiana contra bacterias como *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis* y *Xanthomonas axonopodis* (Moreno et al., 2019).

Trazabilidad digital

Otra de las nuevas tecnologías es la de implementar una trazabilidad digital, que es esencial para garantizar un comercio justo, ético y sostenible de la cera de candelilla, considerando que la extracción de cera de candelilla está ligada a comunidades rurales. Se sugiere realizar una estrategia de trazabilidad durante toda la cadena de valor, partiendo desde la recolección de la planta en el campo, hasta el producto final. Esto ayudará a tener en cuenta aspectos importantes como el origen

de la materia prima, condiciones laborales y sobre todo la certificación de las buenas prácticas sostenibles (Rocha et al., 2023). Además, la incorporación de etiquetas inteligentes facilitaría el rastreo en tiempo real de la ubicación y características tanto del producto como de los actores involucrados en cada etapa del proceso productivo, ayudando así a evitar fraudes y mezclas de cera que no estén certificadas. Estas nuevas técnicas proporcionarían garantía de productos éticos y sostenibles dentro de los mercados. Además, se podría fomentar una mayor confianza y seguridad por parte del consumidor en productos derivados de la cera de candelilla (Quiñones, 2022).

Extracción con bióxido de carbono en estado supercrítico

Tradicionalmente, la extracción de cera de candelilla por varios años ha involucrado métodos muy rudimentarios que implica hervir la planta en una solución con ácido sulfúrico, lo que hace que este proceso sea efectivo, pero muy peligroso y pone en riesgo la salud de los productores, lo que se sugiere que se modifique este proceso (Núñez et al., 2022). Una alternativa sería utilizar bióxido de carbono en estado supercrítico para extraer la cera. Este método, al ser más limpio (pues no deja residuos tóxicos), permite obtener mayores rendimientos y purezas. Además, al favorecer la ruptura de las células vegetales, podría acelerar el proceso de extracción, reduciendo tanto el tiempo como la energía invertida por los candelilleros. Sin embargo, para lograr esto se tendría que considerar el elevado costo inicial y de mantenimiento de este tipo de tecnologías e infraestructuras, además de la necesidad de recursos humanos altamente especializados (Núñez et al., 2022).

Implementación de la IA en toda la cadena de valor para el aprovechamiento integral de la candelilla

Por otro parte el implementar la inteligencia artificial sería una herramienta clave para mejorar todos los procesos relacionados con la cera de candelilla en toda la cadena de valor, desde la recolección hasta la comercialización del producto final (García, 2022). Por medio de imágenes satelitales y drones, se podrán obtener datos climáticos y del suelo, para poder identificar las áreas más productivas y los momentos que sean óptimos para la recolección, además de colocar un sistema de visión artificial para conocer, identificar y analizar la calidad de la cera de candelilla, colocar plataformas de inteligencia artificial que ayude a optimizar y mejorar las rutas de transporte para así poder obtener una mejor gestión de logística (García, 2022). A partir de lo antes mencionado se podrían obtener beneficios como son: la reducción del desperdicio en el proceso de extracción, tener una mejor calidad del producto final y tener una mayor sostenibilidad en la producción.

Con todo lo mencionado anteriormente, en el siguiente diagrama (Figura 3) se plantea una propuesta integral (aspectos: *culturales*, *agronómicos*, *tecnológicos*, *ambientales*) para llevar a cabo un manejo equilibrado y holístico de la obtención de cera de candelilla, dentro del cual se considera muy importante reforzar el conocimiento comunitario, y mejorar las prácticas ancestrales que tradicionalmente realizan los candelilleros, llevando a cabo talleres, capacitaciones y manejo de buenas prácticas de aprovechamiento con el fin de reducir la brecha de la ignorancia, el impacto ambiental y el impacto social.

El nuevo enfoque holístico de la industria de la cera de candelilla se centraría básicamente en el desarrollo tecnológico e industrial llevando a cabo técnicas avanzadas para desarrollar nuevos productos a partir de la cera, así como implementar el aprovechamiento de los subproductos obtenidos derivados de la extracción (Canales *et al.*, 2006).

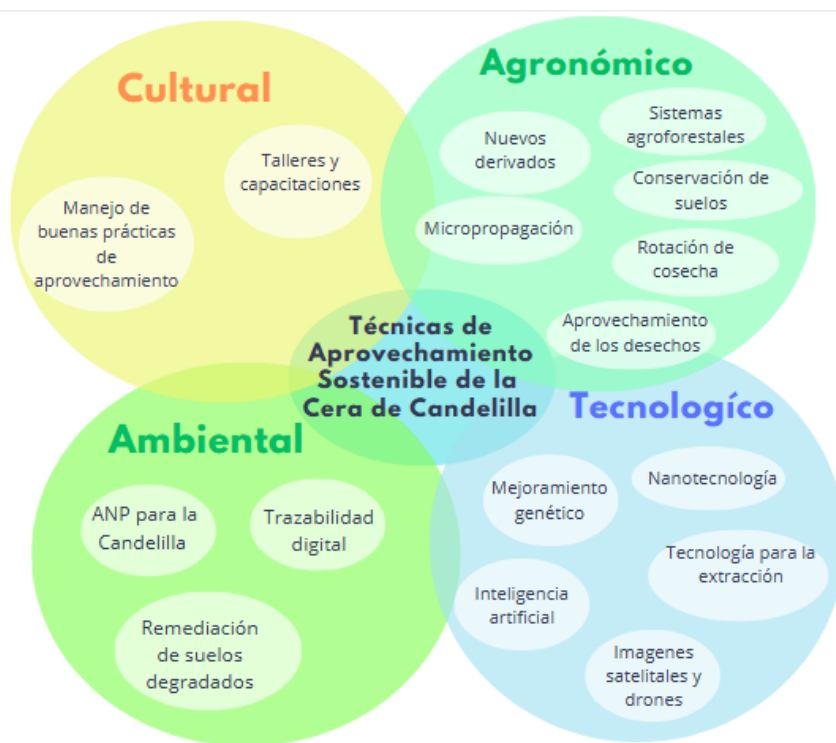


Figura 3. Enfoque integral para el aprovechamiento equilibrado y sostenible de la cera de candelilla, respetando el medio ambiente, mejorando las condiciones sociales y optimizando los procesos tecnológicos e industriales (Diagrama del autor).

Finalmente, es importante destacar que México es el principal país productor de cera de candelilla a nivel mundial. Se estima que existe una producción anual de entre 800 y 1,200 toneladas de cera de candelilla (Multiceras, 2022). De esta canti-

dad, alrededor del 80% se destina a la exportación, siendo Estados Unidos, Alemania, Francia y Japón los principales países receptores. Empresas internacionales como L'Oréal, Estée Lauder, Procter & Gamble y Unilever han registrado múltiples formulaciones que incluyen cera de candelilla, lo cual evidencia su relevancia dentro de sus líneas de productos cosméticos como bálsamos labiales, cremas, mascarillas y maquillaje (CONABIO, 2008). La distribución de estas empresas se concentra en regiones con fuerte desarrollo industrial, como Europa, América del Norte y Asia. En estos mercados, la demanda de productos sustentables y veganos ha favorecido la inclusión de la cera de candelilla como sustituto de ceras animales como la de abeja, lo que refuerza su importancia comercial y estratégica.

PERSPECTIVAS

Las perspectivas sobre el aprovechamiento integral de la cera de candelilla revelan un campo fértil para el desarrollo científico, tecnológico y socioambiental en las regiones áridas del norte de México. A partir del análisis de los aspectos culturales, agronómicos, ambientales y tecnológicos, estas perspectivas se articulan como una síntesis estratégica que impulsa la acción coordinada para el manejo de la agroindustria de la candelilla entre la ciencia, la comunidad, el sector empresarial y las políticas públicas.

FINANCIAMIENTO

No aplicable

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), en especial a la coordinación de posgrado por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés financiero, personal, académico o de otra índole que haya influido inapropiadamente en la realización de este trabajo, su análisis o su publicación. Todas las opiniones y resultados presentados reflejan únicamente el criterio académico de los autores.

REFERENCIAS

- Ávila, F. La candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc) en el norte de Zacatecas. [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2007. Recuperado a partir de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6024/t16513%20%20%20avila%20rebollar%2c%20francisco%20%20tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bañuelos Revilla E., Palacio Núñez J., Martínez Montoya J., Flores Cano J. 2019. Potential distribution and abundance of candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*) in northern Zacatecas, Mexico. Scientific magazine Madera y Bosques. <https://doi.org/10.21829/myb.2019.2511657>
- Bartolomé H.A. Sobrevivencia de tres plantaciones de candelilla en diferentes condiciones en el noreste de Coahuila. [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2017. Recuperado a partir de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/42155>
- Blancas, J. 2017. Los productos forestales no maderables de México. <http://red-pfnm.org.mx>
- Cabello V., Javier C., Galindo S., Bermúdez B., Berumen P., Orta Á., & Garza V. 2013. Cera de candelilla y sus aplicaciones. Avances en Química, 8(2), 105–110. <http://www.saber.ula.ve/avancesenquimica>
- Canales, E., Canales, Martínez y E.M. Zamarrón. 2006. Candelilla, del desierto mexicano hacia el mundo. CONABIO. Biodiversitas 69:1-5. <https://www.cofemersimir.gob.mx/expediente/13817/mir/32651/anexo/910494>
- Catalán E., Antonio M., Ibarra I., Abel M. C., López R., & Ávalos J. E. 2008. Técnicas de producción de plantas de candelilla por semilla, estaca e hijuelos. INIFAP. http://cenid-raspa.inifap.gob.mx/demo/modulo/Folletos%20tecnicos/2008/13_T%C3%A9cnicas%20de%20Producci%C3%B3n%20de%20Plantas%20de%20Candelilla%20por%20Semilla,%20Estaca%20e%20Hijuelos.pdf
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2008, 17,12. Conservación, uso y comercio de la candelilla. Gobierno Federal. <http://www.conabio.gob.mx>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2022. Guía informativa para la elaboración de estudios técnicos de aprovechamiento sustentable de candelilla en el marco de las disposiciones de la CITES. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México.
- Contreras, G. La obtención y comercialización de la cera de candelilla e ixtle de lechuguilla. [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2007. Recuperado a partir de: http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2670/1234_benjamin%20lopez%20cortes.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Diario Oficial de la Federación.1999. NOM-018-RECNAT-1999. SEMARNAT. <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2264.pdf>
- Emmanuel Toribio Ferrer, & Villalón Mendoza, H.2022. Impacto del gradiente altitudinal en la producción de una plantación forestal comercial de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.). Revista Científica en Coahuila, México.
- Ezcurra, E.2003. Guía para la realización de trabajos forestales. Montevideo.
- Flores, M. Situación actual de las poblaciones de candelilla: Inventario, su propagación sexual y asexual en el estado de Coahuila. [Tesis de Doctorado]. México: Universidad Autónoma de Nuevo León. 2013. Recuperado a partir de: <http://epri-nts.uanl.mx/3425/1/1080256791.pdf>
- Flores del Ángel M. L., Rodríguez-Flores A. R., Martínez Catalán E. Á., González López M. G., & Hernández Álvarez M. A.-V.2013. Morphology, viability and germination of candelilla seeds (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.). Revista Internacional de Botánica Experimental. <https://doi.org/10.32604/phyton.2013.82.161>
- García E. Aislamiento y caracterización de microorganismos asociados a la planta de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc) y su efecto en la germinación y crecimiento en *Phaseolus vulgaris*. [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2022. Recuperado a partir de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/48970>
- Hernández P. Respuesta de estacas de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) a diferentes promotores del enraizamiento y aplicación de riegos. [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2007. Recuperado a partir de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/2671>
- Jakobek, J., Backhaus, R., & Hernández.1986. Micropropagation of candelilla, *Euphorbia antisyphilitica* Zucc. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 7, 145–148. DOI: 10.1007/BF00043038
- López B. Producción de plántula de candelilla por hijuelos: Dosis de fertilización y aplicación de riegos. [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2007. Recuperado a partir de: http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2670/1234_benjamin%20lopez%20cortes.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- López J. Aprovechamiento de la cera de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) en el norte de México. [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2014. Recuperado a partir de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/3649>
- Martínez S. (2022, diciembre 14). Mejoran proceso para extracción de cera de candelilla. Facultad de Agronomía de la UANL. Recuperado a partir de: <https://vidauniversitaria.uanl.mx/sustentabilidad/mejoran-proceso-para-extraccion-de-cera-de-candelilla/>

- Moreno Reséndez A., Hernández Herrera J. A., Valenzuela Núñez L. M., & Martínez Salvador M. 2019. Modelación de la presencia de *Euphorbia antisyphilitica* Zucc mediante propiedades físicas y químicas del suelo. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 6(18). DOI: <https://doi.org/10.19136/era.a6n18.1910>
- Muñoz, C. (2019). Método para incrementar los metabolitos secundarios en candelilla y orégano.
- Mycotte de la Peña M. L., Rodríguez Pérez J. M., & Torres Arellano J. T. 2021. Prácticas para un desarrollo local sustentable en comunidades rurales candelilleras: El caso de dos ejidos de Coahuila, México. Revista de divulgación y transferencia tecnológica. DOI: <https://doi.org/10.59741/agraria.v18i3.42>
- Multiceras. 2022. Multiceras. <https://www.multiceras.com>
- Núñez García I. C., Rodríguez Flores L. G., Guadiana De Dios M. H., González Hernández M. D., Martínez Ávila G. C. G., Gallegos Infante J. A., González Laredo R., Rosas Flores W., Martínez Gómez V. J., Rojas R., Villanueva Fierro I., & Rutiaga Quiñones M. 2022. Candelilla wax extracted by traditional method and an ecofriendly process: Assessment of its chemical, structural and thermal properties. Molecules, 27(12). <https://doi.org/10.3390/molecules27123735>
- Ochoa E., Saucedo Pompa S., De la Garza H., Martínez D. G., Rodríguez R., & Aguilar González C. N. 2010. Extracción tradicional de cera de *Euphorbia antisyphilitica*. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. <http://www.postgradoinvestigacion.uadec.mx/AQM>
- Quiñones M. 2022. Candelilla wax extracted by traditional method and an ecofriendly process: Assessment of its chemical, structural and thermal properties. Molecules, 27(12). <https://doi.org/10.3390/molecules27123735>
- Rocha Estrada A., Foroughbakhch Pournavab R., Guzmán Lucio M. A., & Alvarado Vázquez M. A. 2023. Candelilla, *Euphorbia antisyphilitica* Zucc., aprovechamiento tradicional en el Norte de México. Revista Ciencia UANL, 24(110), 19–28. Recuperado a partir de <https://cienciauanl.uanl.mx/ojs/index.php/revista/article/view/245>
- Rojas R., Tafolla Arellano J. C., & Martínez Ávila G. C. G. 2021. *Euphorbia antisyphilitica* Zucc.: A source of phytochemicals with potential applications in industry. Plants, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.3390/plants10010008>
- Rojas Molina R., Saucedo Pompa S., de León Zapata M. A., Jasso Cantú D., & Aguilar, N. 2011. Pasado, presente y futuro de la candelilla. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322011000400003
- Romahn C. F. 1985. Principales productos forestales no maderables de México. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México. México. 376 p.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 1999, 23, 4. NOM-018-SEMARNAT-1999. Diario Oficial de la Federación. <https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3332/1/nom-018-semarnat-1999.pdf>
- Steinmann V. 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. Acta Botánica Mexicana, 61, 61–93. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm61.2002.909>
- Torres Castro A., Garza Navarro M. A., Ortiz Méndez U., & González González V. 2015. Candelilla del semidesierto mexicano como fuente de biocombustible. Revista científica. XVIII (69). <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2009.07.027>
- Villa Castorena M., Catalán Valencia E. A., Inzunza Ibarra M. A., González López M. de L., & Arreola Ávila J. G. 2010. Production of candelilla seedlings (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) by cuttings. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 16(1), 37–47. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2009.07.027>