

# El acoplamiento molecular de los trímeros de quitina y quitosano como un ejemplo de investigación interdisciplinaria de actualidad

Cristóbal Lárez Velásquez<sup>\*1</sup>, Maura Rojas Pirela<sup>2</sup>

<sup>1)</sup> Grupo de Polímeros, Departamento de Química, Facultad de Ciencias  
Universidad de los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

<sup>2)</sup> Laboratorio de Enzimología de Parásitos, Departamento de Biología,  
Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

(\*) [clarez@ula.ve](mailto:clarez@ula.ve)

Recibido: 29/10/2025

Revisado: 20/11/2025

Aceptado: 17/12/2025

## Resumen

En el presente trabajo se hace uso del acoplamiento molecular (*docking*) para exponer el apoyo que pueden brindar estos procedimientos computacionales en diversos aspectos de investigaciones química interdisciplinarias en áreas como la agricultura, medicina, ciencia de materiales, entre otras. Se discuten algunos resultados obtenidos mediante este sistema informático sobre la energía de afinidad de los ocho quitooligosacáridos trímeros de quitina y quitosano hacia una lectina presente en el floema de la planta de pepino (*Cucumis sativus*). Se destaca el valor predictivo y educativo que puede tener el *docking* como una poderosa técnica complementaria para el estudio de estos biomateriales. De los trímeros estudiados, se pudo perfilar el ADD<sub>r</sub> como el mejor candidato para estudios en aplicaciones agrícolas, como la preservación de frutos de pepino cortado propuesta, mostrando así la versatilidad de estos estudios. Adicionalmente, este trabajo aporta información básica, en idioma español, para ayudar a fomentar el interés por el uso de esta metodología entre estudiantes e investigadores hispanoparlantes.

**Palabras claves:** acoplamiento molecular; quitotriosa; lectinas; trímeros

## Abstract

**The molecular docking of the chitin and chitosan trimers as an example of current interdisciplinary research.** This paper uses molecular docking to expose how these computational procedures can support various aspects of interdisciplinary chemical research in fields such as agriculture, medicine, and materials science. Some results obtained using this informatic system regarding the affinity energy of eight chitin and chitosan trimers of chitooligosaccharides towards a lectin present in the phloem of the cucumber plant (*Cucumis sativus*) are discussed. The predictive and educational value of docking as a powerful complementary technique for studying these biomaterials is highlighted. Of the trimers studied, ADD<sub>r</sub> emerged as the best candidate for studies in agricultural applications, such as the proposed preservation of cut cucumber fruit, thus demonstrating the versatility of these studies. Additionally, this paper provides basic information in Spanish to help foster interest in the use of this methodology among Spanish-speaking researchers.

**Keywords:** Molecular docking; Chitotriose; Lectins; Trimers

## Introducción

La quitina y el quitosano son biopolímeros que se pueden obtener de una amplia variedad de fuentes naturales<sup>1,2</sup> y que han encontrado aplicaciones novedosas en múltiples áreas del quehacer humano. Algunas de sus propiedades han sido aprovechadas desde tiempos remotos para aplicaciones biomédicas como, por ejemplo, su centenario empleo para acelerar la cicatrización de heridas por los coreanos, quienes utilizaron durante mucho tiempo la pluma del calamar como fuente de quitina para el tratamiento de abrasiones corporales; igualmente, los antiguos mexicanos usaban algunos hongos (cuyas paredes celulares contienen quitina) para acelerar la curación de heridas causadas por machetes<sup>3</sup>.

### Oligómeros de quitina y quitosano

En muchísimas investigaciones con la quitina, y especialmente con el quitosano y sus derivados, se ha observado una fuerte

dependencia de sus propiedades, especialmente de sus actividades biológicas, con parámetros fisicoquímicos tales como el grado de polimerización (GP) –relacionado directamente con el peso molecular (PM)–, la fracción de unidades acetiladas o grado de acetilación (GA) y la distribución de las unidades acetiladas a lo largo de la cadena, que se ha comenzado a conocer como el patrón de acetilación (PA). Así, de manera empírica, se ha llegado a comprobar que dichas propiedades se pueden revelar incluso para especies moleculares pequeñas de estos biopolímeros, es decir, sus especies oligoméricas. Para definir estas especies, denominadas usualmente como quito-oligosacáridos (en inglés COS), en este trabajo se hará referencia a los hetero-quitooligosacáridos (H-COS), que son especies moleculares de entre 2-10 unidades repetitivas que contienen unidades glucosamina (GlcN, D) y al menos una unidad N-acetil-glucosamina (GlcNAc, A) en la cadena, y a los homo-quitooligosacáridos, que son también especies de 2-10 unidades repetitivas

conformadas solo por unidades A (A-COS) o solo por unidades D (D-COS).

Por otro lado, la mayoría de los estudios de la relación estructura/bioactividad con los COS se han desarrollado utilizando muestras que, por lo general, son mezclas de especies moleculares con distintos valores de GP, GA y PA. Esta es una práctica muy usual debido a la dificultad de obtener y separar una especie pura de un COS, con una estructura específica y bien caracterizada, a partir de las complejas mezclas que normalmente producen los diversos métodos de síntesis<sup>4</sup>. Por ello, la búsqueda de procesos físicos, químicos y/o enzimáticos que permitan producir estos materiales puros, de manera sencilla y sustentable, es un área de intensa actividad, incluyendo el desarrollo de métodos de separación y caracterización más eficientes<sup>5</sup>. Afortunadamente, en los últimos tiempos se han obtenido logros destacables debido al avance de las distintas estrategias que se han abordado para lograr la síntesis más efectiva de algunos COS, los cuales se pueden resumir en: a) la síntesis de COS a partir de sus unidades repetitivas mediante reacciones puramente químicas<sup>6</sup> o enzimáticas, especialmente con quitinasas obtenidas a partir de microorganismos mutados que se han denominado “glicosintasas”<sup>7</sup>; b) la disponibilidad actual de un arsenal de herramientas para la despolimerización de quitina y quitosano, incluyendo métodos físicos, químicos y biológicos<sup>5</sup>, destacando entre los métodos biológicos la obtención creciente de enzimas cada vez más específicas a través de la ingeniería genética<sup>8</sup>; c) el perfeccionamiento reciente de algunos métodos de separación de estos materiales, como la cromatografía de intercambio iónico (IEC), la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), etc., que son métodos de amplio uso<sup>9</sup>, especialmente cuando están acoplados a técnicas de caracterización poderosas como la espectrometría de masas<sup>10</sup>, entre otras.

Con todos estos avances, han comenzado a aflorar resultados que evidencian la especificidad individual de muchos de estos COS para las distintas bioactividades que se les han venido descubriendo, lo que ha impulsado recientemente un mayor énfasis en investigar, producir y comercializar estos atractivos biomateriales<sup>11-15</sup>. Entre algunos resultados que apuntan fuertemente en este sentido, se puede mencionar los siguientes: a) la efectividad de la inducción de un cebado positivo en semillas de arroz cuando se aplican H-COS con DP = 4 que poseen una sola unidad GlcNAc, la cual ha mostrado ser dependiente de la posición de dicha unidad<sup>16</sup>; b) se ha demostrado que el A-COS pentamérico suprime la proliferación de células HepG2 por inducción de la apoptosis vía ruta intrínseca y por afectación de su autofagia protectora, mostrando su potencial como agente antitumoral frente a células de carcinoma hepatocelular<sup>17</sup>; c) se han encontrado ejemplos de bioactividades específicas gobernadas por el PA para COS con DP mayores que los dos mencionados anteriormente, como el favorecimiento de algunos parámetros del crecimiento en semilleros de trigo por COS hexámeros<sup>18</sup>; aunque todos los hexámeros estudiados en dicho trabajo mostraron mejores prestaciones que las observadas en los

estudios de control, el hexámero DDDDDD tuvo mayores efectos positivos que los del AAAAAA, mientras que un hexámero con un tercio de sus unidades acetiladas por vía química mostró resultados intermedios entre los observados para AAAAAA y DDDDDD; d) estudios de perfiles metabólicos han mostrado que el heptámero DDDDDDD podría actuar como un potenciador metabólico de plantas de trigo, al modular pleiotrópicamente (cuando un gen influye en dos o más rasgos fenotípicos aparentemente no relacionados) su metabolismo del C y N. La fijación fotosintética de carbono fue potenciada por DDDDDDD, con incremento de la fosfato-sacarosa sintasa y de la fructosa 1,6-2 fosfatas<sup>19</sup>.

### *Estudios de acoplamiento molecular de COS*

La diversidad de especies químicas de COS que pueden obtenerse, considerando solo los oligómeros con GP ≤ 10, es muy grande. Debido a que son posibles sólo dos unidades repetitivas en ellos, es posible calcular el número de especies ( $N_{DP}$ ) que pueden existir para un valor de DP determinado. Así, este valor vendría dado por  $N_{DP} = 2^{DP}$ . En la tabla 1 se pueden observar los resultados para valores de DP entre 2-10. Si adicionalmente se considera que la unidad terminal reductora (GlcNAc o GlcN) de cada una de estas especies puede existir también como estructura abierta, el número de especies se duplica.

**Tabla 1.** Número teórico de especies posibles para los COS en función de su grado de polimerización.

DP	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$N_{DP}$	4	8	16	32	64	128	256	512	1024

En búsqueda de un manejo más práctico de la voluminosa información que podría obtenerse en los estudios de estos materiales, y ante la poca cantidad de información experimental disponible en la actualidad, los COS también han venido siendo objeto de estudios de simulación computacional. Adicionalmente, estos métodos también permiten manejar modelos teóricos que facilitan el entendimiento de las complejas relaciones que tienen parámetros como el PM, el DA y el PA sobre sus propiedades fisicoquímicas y sus bioactividades. Los resultados de varios estudios experimentales de titulación calorimétrica isotérmica, microscopía de fuerza atómica y electroforesis, sobre los sitios de unión de una lectina obtenida del floema exudado de los frutos inmaduros de la calabaza de hiedra (*Coccolinia indica*), han permitido establecer que dicha proteína tiene marcadas diferencias en sus afinidades por COS de distintos DP; el trabajo fue complementado con estudios de simulación computacional, incluyendo “experimentos” de acoplamiento molecular (*molecular docking*), modelado por homología y dinámica molecular, que han apoyado estos resultados, generando información adicional o complementando la existente<sup>20</sup>. La información sobre este tipo de proteínas, que se encuentran en el floema de diversas plantas y son conocidas como PP1 y PP2, así como de sus mecanismos de defensa (PPD por sus siglas en inglés para *protein plant defense*), como la formación de estructuras filamentosas extendidas que facilitan el sellado

de las heridas relacionadas con ataques de insectos y patógenos<sup>21</sup>, puede resultar de mucha utilidad para la aplicación agrícola de los COS más adecuados.

Paralelamente, los métodos informáticos para analizar modelos moleculares, combinados con técnicas bio-analíticas, se han convertido en una estrategia alternativa prometedora para ampliar la información existente sobre la unión de ligandos a proteínas del plasma sanguíneo en humanos<sup>22</sup>. Estos estudios pueden generar información nueva sobre la distribución y el comportamiento cinético de fármacos, permitiendo estimar previamente las posibles consecuencias de su acción farmacológica; no obstante, esta información necesita ser confirmada posteriormente porque algunos estudios han señalado que los COS también podrían generar efectos toxicológicos, como la inhibición del transporte de aniones orgánicos por péptidos, la afectación del receptor andrógeno, cardiotoxicidad y fosfolipidosis<sup>23</sup>, etc. En el caso de los COS, estos estudios se han vuelto cada vez más relevantes, especialmente debido a que existe poca información sobre su distribución en los seres humanos, la cual depende fundamentalmente de la afinidad de los COS para unirse a las proteínas del plasma, especialmente a la albúmina del suero (HSA) y a la  $\alpha$ -1-ácido glicoproteína (AGP)<sup>24</sup>.

Los estudios de acoplamiento molecular tienen como objetivo principal proponer modelos de unión entre dos moléculas, usualmente una proteína y una molécula pequeña (denominada ligando), mediante el análisis de las fuerzas envueltas en las interacciones que originan dicha unión. Diversos trabajos describen los primeros pasos necesarios para iniciarse en estos estudios<sup>25-28</sup>, mostrando comparaciones de los diversos programas que se han venido desarrollando; igualmente, existen diversos sitios en línea que permiten realizar este tipo de estudios.

#### *Algunas aplicaciones de los estudios de acoplamiento molecular a proteínas*

A continuación, se resumen tres de las innumerables aplicaciones que pueden obtenerse usando estudios de acoplamiento molecular relacionados con proteínas:

- i) Estudios de unión de fármacos a proteínas del plasma (PPB en inglés): usualmente se realizan para HSA y AGP. Estas interacciones afectan considerablemente la distribución y el comportamiento farmacocinético de los medicamentos, con consecuencias en la acción farmacológica general<sup>22</sup>. Se han reportado algunos estudios de *docking* para la unión de COS con HSA que indican que ésta resulta más fuerte que la unión con AGP<sup>24</sup> y que la fuerza de la unión depende del PM y del GD de los COS. Las interacciones de los COS con AGP y/o HSA tienen un impacto potencial en su biodisponibilidad, distribución, depuración, eficacia y seguridad como agentes antimicrobianos. Los COS unidos a las proteínas plasmáticas no estarán disponibles para el metabolismo de primer paso, llevando entonces a un menor volumen de COS disponible para las proteínas diana. Por otro lado, conocer los residuos de AGP y HSA responsables de la unión/estabilización de los COS con diversos PM, den-

sidad de nucleótidos y densidad de ácido láctico (DAP) es importante en los campos de la química y la medicina clínica, ya que permite diseñar COS con las propiedades deseadas de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET). Otra consecuencia de la unión de los COS a las proteínas plasmáticas es su posible efecto inhibidor de las interacciones de estas proteínas con otros compuestos, ya que se sabe que estas proteínas se unen a una amplia diversidad de ligandos endógenos y exógenos.

- ii) Los estudios de acoplamiento molecular también constituyen una metodología didáctica eficaz y motivante para el aprendizaje de este tipo de interacciones y su relación con el diseño de inhibidores enzimáticos. Un buen ejemplo es el trabajo sobre la generación y visualización del complejo acetilcolinesterasa-tacrina para facilitar la comprensión estudiantil de conceptos como estructuras de las proteínas, interacciones proteína/ligando, fuerzas de interacción de los inhibidores enzimáticos<sup>29</sup>, entre otros.
- iii) Estudios para investigar el efecto sobre las propiedades catalíticas de las enzimas luego de mutaciones controladas: se ha encontrado que la quitosanas BaCsn46A de *Bacillus amyloliquefacien* posee buenas propiedades catalíticas para generar COS por hidrólisis de quitosano; ahora bien, la quitosanas expresada tras una mutación por saturación mostró un aumento de alrededor de 120% en la actividad enzimática específica, y su estabilidad térmica resultó mucho mayor. Los estudios de acoplamiento molecular con el trímero AAA indicaron que el tipo de aminoácido en el sitio 196 afecta los enlaces de hidrógeno y que la disminución de los enlaces desfavorables con el sustrato resulta la principal causa de la mejora en las propiedades enzimáticas<sup>30</sup>. Estos resultados permiten apreciar claramente el gran potencial del *docking* en estudios de ingeniería genética relacionados con mutaciones y con optimización de las actividades enzimáticas, entre otros.

#### *Algunos ejemplos de aplicaciones que pueden encaminarse mediante estudios de docking con COS*

A continuación, se presentan ejemplos de estudios de *docking* usando COS con el fin de obtener información preliminar para su potencial aplicación en áreas específicas:

- a) Agricultura: se ha propuesto que la unión de los COS a lectinas del floema de algunas plantas puede ejercer un efecto importante en las respuestas de éstas a los patógenos, así como en la cicatrización de sus heridas<sup>21</sup>, entre otras. Tales hallazgos han impulsado el estudio de tales interacciones en búsqueda de posibles aplicaciones en sectores como el agrícola y el alimentario. Así, se ha encontrado que el trímero AAA, a 18 °C, posee una constante de unión con la lectina del floema de exudado de calabaza de  $3,24 \times 10^5$ , mayor a la del tetrámero AAAA ( $1,26 \times 10^5$ ) y del pentámero AAAAA ( $1,65 \times 10^5$ ), aunque apreciablemente menor que la del hexámero AAAAAA ( $90,1 \times 10^5$ ), confirmando que esta constante es dependiente del GP y perfilando al hexámero como

un mejor candidato para estudios en la protección de plantas.

- b) Medicina: aunque hasta la fecha no se ha comprobado que los seres humanos produzcan quitina de alto PM, estudios recientes han mostrado que poseen al menos dos quitinasas: la quitotriosidasa humana (HCHT por su nombre en inglés) y la quitinasa ácida de mamífero (AMCase), así como también ciertas proteínas similares a quitinasas (en inglés CLP). Estas enzimas se han asociado a algunas enfermedades y en la actualidad se consideran biomarcadores y dianas terapéuticas; se cree que juegan un papel importante en la respuesta antiparasitaria del sistema inmune innato de los seres humanos<sup>31</sup>. Entre las enfermedades con las que se han asociado están incluidos algunos desórdenes de almacenamiento lisosomal, sarcoidosis y enfermedades del sistema respiratorio tales como el asma, la obstrucción pulmonar crónica y la fibrosis idiopática crónica<sup>32</sup>. Afortunadamente, el creciente acceso digital a grandes bibliotecas de compuestos y fármacos comienza a permitir su cribado virtual, mediante *docking* frente a dianas moleculares, lo cual ha permitido identificar posibles fármacos como candidatos para enfermedades específicas. Adicionalmente, el acoplamiento inverso, que se basa en la búsqueda de dianas biológicas que puedan interactuar con sustancias específicas de interés, integrando datos estructurales de proteínas con información química, también permite obtener resultados prometedores, como en el caso revisado recientemente de las enfermedades parasitarias desatendidas<sup>33</sup>.

Entre las aplicaciones propuestas en este campo para los COS se pueden mencionar la inhibición del crecimiento tumoral y la inflamación inducida por TH2 en el asma, así como su uso para el fortalecimiento óseo en la osteoporosis,

como vector para la administración de genes, agente antibacteriano, antifúngico, antipalúdico o agente hemostático en apósitos para heridas<sup>34</sup>. El uso de mezclas de COS bien definidos podría ayudar a comprender mejor los mecanismos relacionados con sus bioactividades en estas aplicaciones. Así, por ejemplo, se ha reportado que un pretratamiento con derivados per-acetilados de COS (en los cuales todos los grupos -OH y -NH<sub>2</sub> del COS han sido acetilados y que son denominados genéricamente como PACOS) inhibe notoriamente la muerte de células PC12 inducida por exposición a glutamato, de manera dosis dependiente y mostrando una baja citotoxicidad<sup>35</sup>.

- c) Separación y purificación de biomateriales: la N,N',N''-triacetilquitotriosa (AAA) ha sido utilizada para la modificación de Sepharosa con el fin favorecer la separación y purificación de proteínas del tipo lectinas<sup>36</sup>.

Por otro lado, en la tabla 2 se presentan algunos de los estudios reportados sobre los COS trímeros. En ella se puede observar que también existe interés en su uso en áreas como la agricultura, la medicina, biomateriales, entre otras.

Como se puede apreciar de la resumida información mostrada en las subsecciones anteriores, existen numerosos frentes de trabajo que necesitan ser abordados interdisciplinariamente en el insurgente campo de los COS individuales. Estos incluyen desde sus métodos de preparación, los cuales comienzan a tener en consideración la sustentabilidad ambiental, incluyendo conceptos como economía circular y fabricas celulares, pasando por procesos de separación y caracterización que requieren de procedimientos y técnicas avanzadas, hasta llegar a la realización de estudios de aplicación en diferentes campos, como la medicina, la agricultura, la nutraceutica, el sector alimentario,

**Tabla 2.** Estudios relacionados con las bioactividades de los trímeros de GlcNAc y GlcN encontrados durante la revisión.

PA	Bioactividades observadas
DDD <sub>r</sub>	- Ha mostrado una ligera actividad para favorecer la germinación y crecimiento posterior de semillas de trigo, aunque mucho menor que los hexámeros y heptámeros desacetilados <sup>37</sup> . Ha sido separado de otros COS de diferentes tamaños por cromatografía de intercambio iónico <sup>38</sup> . - Mostró cierta bioactividad para mejorar la tolerancia al estrés por el frío en plántulas de trigo; se propone que algunos COS modulan las actividades de las enzimas antioxidantes en las plántulas, las cuales desempeñan un papel clave en sus respuestas defensivas bajo estrés por frío <sup>39</sup> . - La suplementación con quitotriosa favorece la actividad antitumoral del fármaco Doxorubicina <sup>40</sup> .
DDA <sub>r</sub>	- Como antioxidante por su capacidad para atrapar radicales hidroxilo y superóxido, mostrando una actividad algo mayor que el trímero DDD <sup>41</sup>
DAD <sub>r</sub>	- Su presencia ha sido reportada en la mezcla de acetilación de la quitotriosa, aunque no pudo ser separado de ésta <sup>41</sup> .
ADD <sub>r</sub>	- Similarmente al isómero DAD, su presencia ha sido reportada en la mezcla de acetilación de la quitotriosa, aunque no pudo ser separado de ésta <sup>41</sup> .
DAA <sub>r</sub>	- Comparado con la especie trímera DDD, ha mostrado una actividad notoria como agente para atrapar radicales hidroxilos y superóxidos <sup>41</sup> . - Resultó resistente a la hidrólisis con la lisozima <sup>42</sup> .
ADA <sub>r</sub>	- Se ha observado su formación en proporciones apreciables dentro de la fracción de trímeros obtenidos durante la hidrólisis de quitosano (GD = 0,659) con quitinasas de <i>Serratia marcescens</i> , especialmente para altos valores de escisión <sup>43</sup> . - Se ha encontrado que se une a la α-glicoproteína ácida y a la albúmina del suero humano <sup>22</sup> .
AAD <sub>r</sub>	- Se ha mostrado que la lisozima puede hidrolizar este trímero por su extremo no reductor, pero no por su otro extremo, en contraste con el trímero AAA <sub>r</sub> que puede ser hidrolizado por ambos extremos <sup>42</sup> .
AAA <sub>r</sub>	- Se ha reportado su unión moderada (K <sub>b</sub> = 3,24x10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> a 25 °C) a una lectina obtenida del exudado de calabazas <sup>44</sup> . - Se une a la quitotriosidasa humana (K <sub>d</sub> = 9,9 ± 0,8 mM → K <sub>b</sub> = 1x10 <sup>2</sup> M <sup>-1</sup> ), como algunos otros COS, lo cual podría potenciar la respuesta inflamatoria contra patógenos que contienen quitina mediante la liberación de COS inmunogénicos, actuando como un catalizador inmunitario que puede conducir al reclutamiento de agentes inmunitarios adicionales <sup>45</sup> . - Ha sido utilizada en la modificación del adsorbente Sefarosa para la separación y purificación de proteínas del tipo lectinas <sup>36</sup> .

etc. Frecuentemente, los estudios de COS con bioactividades potenciales pueden complementarse con métodos de simulación computacional. Por ello, en el presente trabajo se presentan los pasos necesarios para realizar un estudio preliminar de acoplamiento molecular de los COS trímeros con una de las proteínas presentes en el floema exudado del pepino (*Cucumis sativus*), la cual ha sido caracterizada como una lectina y se ha relacionado con mecanismos de defensa de estas plantas<sup>46</sup>. Algunos de los resultados obtenidos son discutidos brevemente con relación a su potencialidad para ser aplicados en el área de protección de plantas y/o alimentos, para mostrar el soporte que pueden brindar estos estudios computacionales.

## Procedimientos

### Obtención de las estructuras de la proteína y los COS trímeros

La información sobre la lectina del floema de *Cucumis sativus* se obtuvo de la base de datos de acceso abierto *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), en la cual aparece con el identificador PDB ID: 7sv6 para su forma nativa, con un PM reportado de 17 kDa. Sin embargo, debido a que se encontró un nuevo archivo que presenta mejoras en la resolución de la estructura tridimensional, código PDB ID 7YAAQ (<https://files.rcsb.org/download/7YAAQ.pdb>), se usó este último para todos los estudios de acoplamiento. Las estructuras de los trímeros DDD<sub>r</sub> y AAA<sub>r</sub> se obtuvieron mediante el programa Avogadro<sup>47</sup>, usando los identificadores SMILES (*simplified molecular-input line-entry system*) obtenidos de la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) para los compuestos codificados como CID 3086191 y CID 444514, respectivamente. Ambas estructuras fueron optimizadas con el mismo programa usando el campo de fuerza MMFF94 hasta minimizar su energía y se obtuvieron como archivos \*.pdb. Las restantes seis estructuras trímeras se construyeron modificando la estructura bidimensional del trímero AAA<sub>r</sub> en el sitio CB-Dock2 (solo para sustituir los grupos acetilos necesarios por hidrógeno —equivalente a una reacción de desacetilación— y dejando iguales el resto de las uniones) para obtener sus identificadores SMILES, con los cuales se procedió a construir y optimizar sus estructuras tridimensionales, como archivos \*.pdb, usando igualmente el programa Avogadro. Se obtuvieron las energías de todas las estructuras optimizadas.

### Estudios de acoplamiento

Se accede a la plataforma de CB-Dock2 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/>) y se ejecutan los siguientes pasos: i) cargar el archivo PDB correspondiente a la proteína y esperar que el programa indique que ha sido preparado para activar el estudio, ii) cargar el archivo del ligando que será evaluado y esperar su revisión por el programa, luego de lo cual se confirmará en el botón enviar, iii) iniciar la búsqueda de los sitios de unión de la proteína y el estudio de acoplamiento del ligando en dichos sitios. Al finalizar el proceso, se pueden analizar los resultados en el sitio; el programa también envía automáticamente los re-

sultados al correo electrónico indicado y un enlace que permite consultarlos en la plataforma durante un período de 48 horas. Cada uno de los estudios de acoplamiento se realizó por quintuplicado para mejorar el nivel de confianza de los valores de la energía de afinidad (con respecto a los de un solo experimento), recordando que en cada corrida el programa generará valores para el cónfórmero que haya logrado la mayor afinidad.

## Resultados y discusión

### Sitios de unión de la proteína

De acuerdo con la información obtenida del estudio de detección de cavidades en el sitio web de CB-Dock2, la lectina mostró 5 sitios de unión, cuyos volúmenes y coordenadas centrales son detallados en la tabla 2. Estos sitios se pueden apreciar de manera más gráfica en las vistas frontal y posterior de la lectina (figura 1a y 1b, respectivamente), donde el sustrato DDD<sub>r</sub>, representado en colore fucsia, se observa unido a cada uno de ellos. La identificación de varios sitios de unión en la lectina parece justificar lo que se ha mencionado en algunos estudios acerca de que estas proteínas cumplen varias funciones relacionadas con los mecanismos de defensa basados en el floema de la planta<sup>21,46,48</sup> (PBD en inglés). Así mismo, este hallazgo apoyaría su consideración como una lectina con sitios de unión promiscuos debido a que puede interactuar con una intrínseca variedad de carbohidratos<sup>46</sup>.

### Estudios de acoplamiento con los COS trímeros

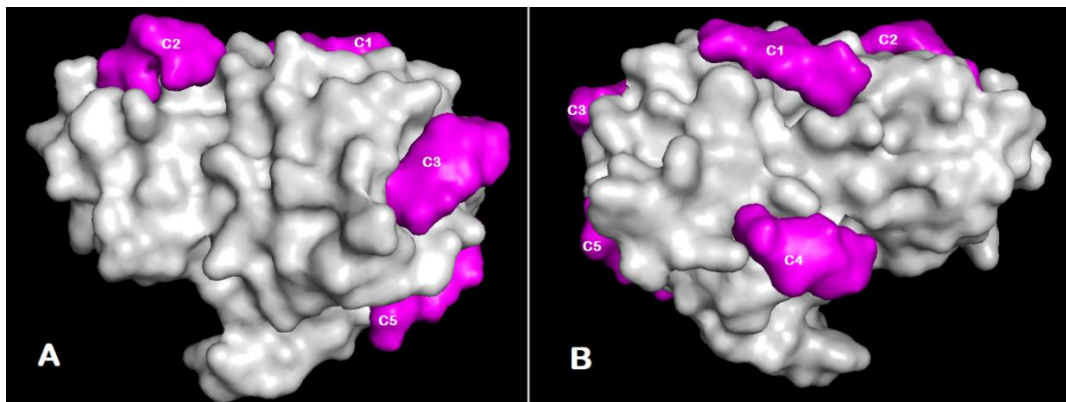
Como se estableció anteriormente (tabla 1), el número de especies trímeras (DP = 3) distintas que son posibles para la combinación de GlcNAc (A) y GlcN (D) es  $N_{DP} = 2^{DP} = 8$ . En la tabla 3 se resume la información química y estructural obtenida para cada una de estas especies.

Por otro lado, los estudios de acoplamiento proteína/ligando realizados a través del sitio CB-Dock2 proporcionan un valor conocido como puntaje Vina (VS por *Vina Score*), el cual está relacionado con la energía libre de la unión del ligando al sitio o cavidad de unión, donde un valor Vina más negativo indica una mayor afinidad del ligando por dicho sitio<sup>49,50</sup>. Este valor se obtiene en CB-Dock2 ejecutando el motor de acoplamiento molecular AutoDock Vina sobre los sitios de unión predichos para la proteína; combina términos de interacción (hidrofóbicos, de hidrógeno, electrostáticos, etc.) así como también penalizaciones conformacionales. La tabla 4 presenta los puntajes

**Tabla 2.** Cavidades de unión de la proteína PP2 del floema exudado de la *Curcumis sativus*, obtenidas mediante el estudio de determinación de cavidades realizado en el sitio CB-Dock2.

Sitio o cavidad	Volumen de la cavidad (Å <sup>3</sup> )	Coordenadas del centro (x, y, z)
C1	109	3, 8, -5
C2	71	8, -8, -9
C3	58	20, 23, 4
C4	57	6, 11, -14
C5	55	16, 28, -5





**Fig. 1:** Vista frontal (A) y posterior (B) de la ubicación de los sitios de unión en la lectina 7YAQ (color gris). Se muestra el ligando DDD<sub>r</sub> unido a cada uno de los sitios (en color morado y con el número del sitio), lo que permite la observación conjunta de las cavidades. Resultados obtenidos en el sitio web de CB-Dock2 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/>).

**Tabla 3.** Resumen de los datos y estructuras de los COS trímeros estudiados.

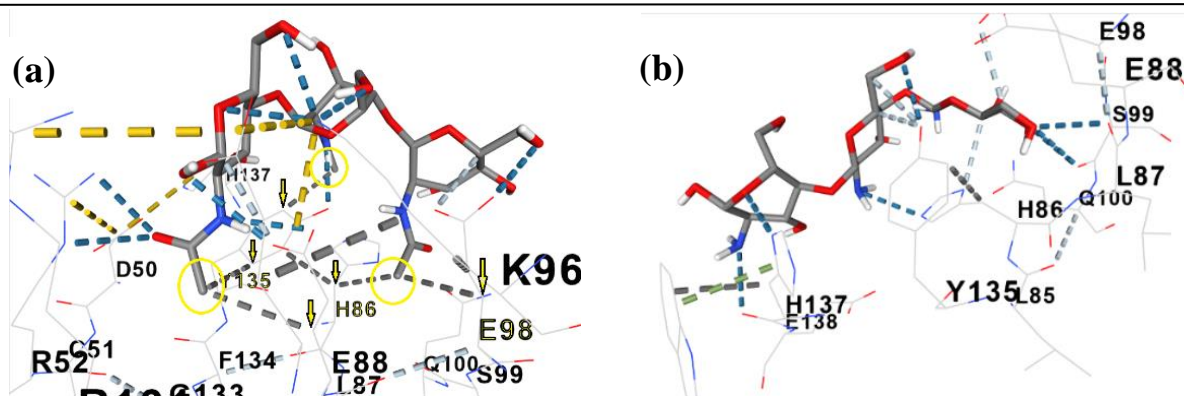
Trímero	PM (Da)	GA	Formula química e identificador Smiles	Energía* (kJ.mol <sup>-1</sup> )	Estructura 3D**
DDD <sub>r</sub>	501,51	0,00	<b>C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub></b> C([C@@H]1[C@H]([C@@H]([C@H]([C@@H](O1)O[C@@H]2[C@H](O[C@H]([C@@H]([C@@H]2O)N)O[C@@H]3[C@H](O[C@H]([C@@H]([C@H]3O)N)O)CO)CO)N)O)O	<b>1190</b>	
DDA <sub>r</sub>	543,55	0,33	<b>C<sub>20</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub></b> CC(=O)N[C@H]3[C@H](O)O[C@H](CO)[C@@H](O[C@@H]2O[C@H](CO)[C@@H](O[C@@H]1O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]1N)[C@H](O)[C@H]2N)[C@@H]3O	<b>1075</b>	
DAD <sub>r</sub>	543,55	0,33	<b>C<sub>20</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub></b> CC(=O)N[C@@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H]1O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]1N)[C@@H](CO)O[C@H]2O[C@H]3[C@H](O)[C@@H](N)[C@H](O)O[C@@H]3CO	<b>1159</b>	
ADD <sub>r</sub>	543,55	0,33	<b>C<sub>20</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub></b> CC(=O)N[C@@H]1[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](CO)O[C@H]1O[C@H]3[C@H](O)[C@@H](N)[C@H](O)[C@H]2[C@H](O)[C@@H](N)[C@H](O)O[C@@H]2CO)O[C@@H]3CO	<b>1152</b>	
DAA <sub>r</sub>	585,59	0,67	<b>C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub></b> CC(=O)N[C@H]3[C@H](O)O[C@H](CO)[C@@H](O[C@@H]2O[C@H](CO)[C@@H](O[C@@H]1O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]1N)[C@H](O)[C@H]2NC(C=O)[C@@H]3	<b>856</b>	
ADA <sub>r</sub>	585,59	0,67	<b>C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub></b> CC(=O)N[C@H]3[C@H](O)O[C@H](CO)[C@@H](O[C@@H]2O[C@H](CO)[C@@H](O[C@@H]1O[C@H](CO)C(O)[C@H](O)[C@H]1NC(C=O)[C@H](O)[C@H]2N)[C@@H]3O	<b>1002</b>	
AAD <sub>r</sub>	585,59	0,67	<b>C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub></b> CC(=O)N[C@@H]1[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](CO)O[C@H]1O[C@H]3[C@H](O)[C@@H](NC(C=O)[C@H](O)[C@H]2[C@H](O)[C@@H](N)[C@H](O)O[C@@H]2CO)O[C@@H]3CO	<b>994</b>	
AAA <sub>r</sub>	627,63	1,00	<b>C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>16</sub></b> CC(=O)N[C@@H]1[C@H]([C@@H]([C@H](O[C@H]1O)CO)O[C@H]2[C@@H]([C@H]([C@@H]([C@H](O2)CO)O[C@H]3[C@@H]([C@@H]([C@H](O3)CO)O)O)NC(=O)C)O)N(C(=O)C)O	<b>819</b>	

\* Energía potencial de los trímeros calculadas con el programa Avogadro luego de optimizada su geometría.

\*\* Obtenidas con el programa Avogadro luego de optimizada la geometría de los trímeros.

**Tabla 4.** Resumen de los valores de VS obtenidos en los estudios de acoplamiento molecular de los trímeros estudiados con los sitios de unión de la lectina (PP2) del floema de *Cucumis sativus*.

Sitio o cavidad	Puntaje Vina (Vina score) (kcal.mol <sup>-1</sup> )							
	AAA <sub>r</sub>	DAA <sub>r</sub>	ADA <sub>r</sub>	AAD <sub>r</sub>	DDA <sub>r</sub>	DAD <sub>r</sub>	ADD <sub>r</sub>	DDD <sub>r</sub>
C1	-5,5 ± 0,1	-5,5 ± 0,2	-5,5 ± 0,2	-5,4 ± 0,1	-5,5 ± 0,2	-5,2 ± 0,1	-5,1 ± 0,2	-5,1 ± 0,2
C2	-5,0 ± 0,2	-5,1 ± 0,3	-5,1 ± 0,3	-4,9 ± 0,1	-5,4 ± 0,4	-5,0 ± 0,1	-4,9 ± 0,2	-5,2 ± 0,2
C3	-5,9 ± 0,2	-5,7 ± 0,3	-5,8 ± 0,1	-5,7 ± 0,1	-5,9 ± 0,3	-5,5 ± 0,1	-5,6 ± 0,1	-5,6 ± 0,3
C4	-5,7 ± 0,3	-5,8 ± 0,5	-5,8 ± 0,2	-5,4 ± 0,2	-5,7 ± 0,3	-5,4 ± 0,1	-5,4 ± 0,1	-5,3 ± 0,2
C5	-5,7 ± 0,1	-5,5 ± 0,1	-5,6 ± 0,2	-5,4 ± 0,2	-6,0 ± 0,2	-5,7 ± 0,1	-5,3 ± 0,4	-5,7 ± 0,2



**Fig. 2:** Interacciones de la lectina 1YAQ en el sitio C1 con: a) el trímero AAA<sub>r</sub> (las flechas amarillas muestran las interacciones hidrofóbicas de los grupos metilos mostrados en círculos amarillos), b) el trímero DDD<sub>r</sub>. Resultados obtenidos en el sitio web CB-Dock2 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/>).

Vina obtenidos durante el acoplamiento de los trímeros estudiados (ligandos) con cada uno de los sitios encontrados para la lectina.

De la tabla 4 se obtiene información relevante sobre la afinidad de los trímeros por cada uno de los sitios de unión de la proteína. Entre los hallazgos más evidentes, sin pretender hacer una evaluación exhaustiva por no ser el objetivo del trabajo, se pueden destacar los siguientes:

- i) Los trímeros AAA<sub>r</sub> y DDD<sub>r</sub> mostraron una energía de afinidad ligeramente diferente (pero estadísticamente significativa) por el sitio C1, observándose una afinidad mayor para AAA<sub>r</sub> que para DDD<sub>r</sub> ( $VS = -5,5 \pm 0,1$  y  $-5,1 \pm 0,2$  kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente). Debido al carácter más hidrofóbico del trímero AAA<sub>r</sub>, este resultado sugiere que las interacciones hidrofóbicas en el sitio C1 podrían ejercer una contribución importante en la afinidad de unión, aunque el valor de VS para AAA<sub>r</sub> está algo alejado de un valor experimental reportado para el complejo AAA-lectina de *Cucumis sativus* ( $\Delta G_b = -6,88$  kcal.mol<sup>-1</sup>)<sup>51</sup>. Por otro lado, a pesar de que C1 es el sitio con mayor volumen (109 Å<sup>3</sup>), teniendo por ello posibilidades de unir cada uno de estos trímeros (por separado) mediante distintos tipos de interacciones, los valores de VS obtenidos indicarían que las interacciones hidrofóbicas definen la afinidad de este sitio. Los análisis de las interacciones predichas para los trímeros AAA<sub>r</sub> y DDD<sub>r</sub> con los residuos en C1 apoyan esta proposición, como puede observarse para AAA<sub>r</sub> en la figura 2a, donde se señalan con flechas amarillas cinco interacciones hidrofóbicas de los tres grupos metilos con distintos residuos (dos con Y135, una con E98, una con E88 y una con H86), las cuales no son posibles para DDD<sub>r</sub> (figura 2b) al carecer de grupos metilos. Un punto importante es el hecho de que en C1 los trímeros más acetilados mostraron valores de VS ligeramente más negativos que aquellos menos acetilados, con excepción de DDA<sub>r</sub>, lo que confirmaría la influencia de las interacciones hidrofóbicas en este sitio.
- ii) De los sitios de unión encontrados para la lectina, el C2 mostró la menor afinidad para prácticamente todos los trí-

meros, lo cual no parece estar relacionado con su volumen debido a que ocupa el segundo lugar en tamaño. En este sitio se obtuvieron valores de VS muy similares para todos los trímero, obteniéndose también los menores valores de afinidad observados ( $VS = -4,9$  kcal.mol<sup>-1</sup> para AAD<sub>r</sub>, ADD<sub>r</sub>) entre todos los trímeros y en todos los sitios. En lo que respecta a su mayor afinidad, ésta fue para DDA<sub>r</sub> ( $VS = -5,4 \pm 0,4$  kcal.mol<sup>-1</sup>). Este hecho parece apuntar a que este sitio poseería menor hidrofobicidad que el sitio C1 y que todos los demás sitios.

- iii) En términos generales se puede indicar que los trímeros más acetilados poseen valores de VS ligeramente más negativos que los menos acetilados para casi todos los sitios de la lectina, excepto para C5. En este último sitio, el trímero DDD<sub>r</sub> logró su valor de VS más negativo ( $-5,7 \pm 0,2$  kcal.mol<sup>-1</sup>), sugiriendo así un modo de unión distinto al de los sitios C1, C2 y C4, pero probablemente similar al del sitio C3 ( $VS = 5,6 \pm 0,3$  kcal.mol<sup>-1</sup>). Sin embargo, para corroborarlo, es necesario profundizar en el estudio de las interacciones de este trímero con los diversos residuos en cada sitio de la lectina.

#### *Estudios de acoplamiento molecular como sondeos preliminares en posibles aplicaciones de los COS con GP = 3*

En relación con potenciales aplicaciones de estos trímeros en el área de la agricultura, los resultados obtenidos no parecen perfilar claramente alguno de ellos, como candidato sobresaliente sobre el resto, para la inhibición de los sitios de la enzima estudiada, aun cuando se podría generalizar indicando que los trímeros más acetilados ofrecen mejores perspectivas al poseer afinidades ligeramente más altas por la mayoría de sus sitios. A pesar de esto, el trímero DDA<sub>r</sub>, que resultó ser la excepción a la menor afinidad de los trímeros menos acetilados por el sitio C1, que obtuvo el valor de VS más negativo ( $-5,4 \pm 0,4$  kcal.mol<sup>-1</sup>) en el sitio con la menor afinidad general (C2) y que, además, logró el valor de afinidad de unión más alto de todos los trímeros para cualquier sitio de la enzima ( $VS = -6,0 \pm 0,2$  kcal.mol<sup>-1</sup> para C5), debería ser el primer candidato de ensayo, entre estas especies, como inhibidor de la lectina estudiada. Claramente, es necesario obtener información adicional sobre

el papel de ésta en los mecanismos PPD de las plantas o en sus frutos.

Por ello, en el caso de demostrarse la participación de esta lectina en los mecanismos de defensa en los frutos de esta planta, estos resultados dejan abierta la puerta para investigar los efectos del trómero DDA<sub>r</sub> como un potencial preservante de alimentos, como, por ejemplo, preservante de ensaladas que contengan pepinos cortados. Obviamente, dichas investigaciones deberían incluir ensayos sobre las dosis necesarias para tales fines, sus efectos organolépticos y, muy importante, sus posibles efectos en los consumidores.

## Conclusiones

El estudio de los oligómeros de quitina y quitosano, actualmente definidos en la literatura especializada como quitooligosacáridos o COS, ha comenzado a revelarse como un área de intensa actividad debido a los beneficios que pudieran derivarse de desarrollos exitosos de sus aplicaciones. Las posibilidades de investigación en estos materiales incluyen su producción por métodos físicos, químicos y biológicos (y/o sus combinaciones), su separación y caracterización, aprovechando los nuevos desarrollos de técnicas cada vez más novedosas y poderosas, y su aplicación en diversos campos como la medicina, agricultura, alimentos, entre otros. Así, estos estudios pueden ser considerados ahora como parte de un campo interdisciplinario independiente, o tal vez complementario, al de sus progenitores, donde la simulación computacional también tiene mucho que aportar, especialmente debido a que algunos avances recientes, como la inteligencia artificial, vienen permitiendo mayores niveles de accesibilidad mediante artilugios informáticos. Los resultados obtenidos del sencillo estudio de acoplamiento molecular mostrado en este trabajo permiten apreciar claramente la potencialidad que tienen estas técnicas, cada vez más novedosas, para vislumbrar aplicaciones de un ligando, o una enzima, en áreas que *a priori* resultarían difíciles de considerar. En el caso específico de los quitooligosacáridos trómeros se ha perfilado el trómero ADD<sub>r</sub> como la especie con mejores perspectivas para ensayos en algunas aplicaciones agrícolas relacionadas con la lectina de *Cucumis sativus* estudiada.

## Referencias

1. BT Iber, NA Kasan, D Torsabo, JW Omuwa. A review of various sources of chitin and chitosan in nature. **J. Renewable Materials**, **10**(4), 1097–1123 (2022). <https://doi.org/10.32604/jrm.2022.018142>
2. C Lárez-Velásquez. Chitosan: An overview of its multiple advantages for creating sustainable development poles. **Polímeros**, **33**(1), e20230005 (2023). <https://doi.org/10.1590/0104-1428.20220103>
3. GG Allan, LC Altman, RE Bensinger, DK Ghosh, Y Hirabayashi, AN Neogi *et al.* Biomedical applications of chitin and chitosan. En: *Chitin, chitosan, and related enzymes*. Ed. JP Zikakis, pp. 119–133, Academic Press. (1984). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-780950-2.50013-7>
4. N Míguez, P Kidibule, M Minguet-Lobato, H Soto, E Jiménez, P Santos-Moriano *et al.* Estrategias para la producción enzimática de diferentes tipos de quitooligosacáridos a partir de quitina y quitosano. XXVIII Congreso Nacional de Microbiología, España, 28 de junio a 2 de julio de 2021, formato virtual. <https://digital.csic.es/handle/10261/248868>
5. C Lárez-Velásquez, F López. Chito-oligosaccharides: A mini-review on sources, production, and agricultural applications. **Adv. Modern Agriculture**, **5**(3), 2730 (2024). <https://doi.org/10.54517/ama.v5i3.2730>
6. M Panza, SG Pistorio, KJ Stine, AV Demchenko. Automated chemical oligosaccharide synthesis: novel approach to traditional challenges. **Chemical Reviews**, **118**(17), 8105–8150 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00051>
7. SN Das, J Madhuprakash, PV Sarma, P Purushotham, K Suma *et al.* Biotechnological approaches for field applications of chito-oligosaccharides (COS) to induce innate immunity in plants. **Critical Reviews in Biotechnology**, **35**(1), 29–43 (2015). <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.798255>
8. Z Mészáros, N Kulik, L Petrásková, P Bojarová, M Texidó, AK Planas *et al.* Three-step enzymatic remodeling of chitin into bioactive chito-oligomers. **J. Agric. Food Chem.**, **72**(28), 15613–15623 (2024). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c03077>
9. M Abila, C Ladavière, S Trombotto. Impact of HILIC amino-based column equilibration conditions on the analysis of chito-oligosaccharides. **Chromatographia**, **85**(1), 55–63 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10337-021-04109-9>
10. S Cord-Landwehr, P Ihmor, A Niehues, H Luftmann, BM Moerschbacher, M Mormann. Quantitative mass-spectrometric sequencing of chitosan oligomers revealing cleavage sites of chitosan hydrolases. **Analytical Chemistry**, **89**(5), 2893–2900 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04183>
11. C Castañeda-Ramírez, NM de la Fuente-Salcido, RP Cano, T Ortiz-Rodríguez, JE Corona. Potencial de los quitooligosacáridos generados de quitina y quitosana. **Acta Universitaria**, **21**(3), 14–23 (2011). <https://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/view/16/pdf>
12. LE Ibáñez, MS Puig, F Lorenzo, R Bertó, FJ Gavilá. Revalorización de quito-oligosacáridos obtenidos a partir de subproductos de la industria pesquera como antimicrobianos naturales. **Nereis**, **(13)**, 173–186 (2021). <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8171760.pdf>
13. PaCosValor. Producción biotecnológica de oligosacáridos de quitosano con estructura definida como inmunoestimulantes. <https://iqs.edu.es/investigacion/proyectos-investigacion/pacosvalor-produccion-biotecnologica-de-oligosacaridos-de-quitosano-con-estructura-definida-como-inmunoestimulantes/>
14. Húmico. Explorando el potencial de uso de los oligosacáridos de quitosano. <https://es.ihumico.com/chitosan-oligosaccharide-uses/>
15. Chitosanlab. Venta de COS para agricultura y para alimentos. <https://chitosanlab.com/es/oligomeros-de-quitosano/>
16. S Basa, M Nampally, T Honorato, SN Das, AR Podile, NE El Gueddari *et al.* The pattern of acetylation defines the priming ac-



- tivity of chitosan tetramers. **J. Am. Chem. Soc.**, **142**(4), 1975–1986 (2020). <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11466>
17. C Zhu, M Zhao, L Fan, X Cao, Q Xia, J Zhou *et al.* Chitopentaose inhibits hepatocellular carcinoma by inducing mitochondrial mediated apoptosis and suppressing protective autophagy. **Biore-sources and Bioprocessing**, **8**(1), 12 pages (2021). <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00358-y>
  18. KC Li, XQ Zhang, Yu Yu, RE Xing, S Liu, S., PC Li. Effect of chitin and chitosan hexamers on growth and photosynthetic characteristics of wheat seedlings. **Photosynthetica**, **58**(3), 819–826 (2020). <https://doi.org/10.32615/ps.2020.027>
  19. X Zhang, K Li, R Xing, S Liu, P Li. Metabolite profiling of wheat seedlings induced by chitosan: revelation of the enhanced carbon and nitrogen metabolism. **Front. Plant Sci.**, **8**, 13 pages (2017). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02017>
  20. KB Bobbili, B Singh, A Narahari, G Bulusu, A Surolia, MJ Swamy. Chitoooligosaccharide binding to CIA17 (*Coccinia indica agglutinin*): Thermodynamic characterization and formation of higher order complexes. **Int. J. Biol. Macromol.**, **137**, 774–782 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.211>
  21. MJ Swamy, KB Bobbili, S Mondal, A Narahari, D Datta. Cucur-bitaceae phloem exudate lectins: Purification, molecular charac-terization, and carbohydrate binding characteristics. **Phytochem-istry**, **201**, 113251 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113251>
  22. G Lambrinidis, T Vallianatou, A Tsantili-Kakoulidou. In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding: A review. **Adv. Drug Delivery Reviews**, **86**, 27–45 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.005>
  23. DL Roman, M Roman, C Som, M Schmutz, E Hernandez, P Wick *et al.* Computational assessment of the pharmacological profiles of degradation products of chitosan. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, **7**, 214 (2019). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00214>
  24. DL Roman, V Ostafe, A Isvoran. Computational assessment of chito-oligosaccharides interactions with plasma proteins. **Marine Drugs**, **19**(3), 120 (2021). <https://doi.org/10.3390/md19030120>
  25. FD Prieto-Martínez, M Arciniega, JL Medina-Franco. Acopla-miento Molecular: Avances Recientes y Retos. **TIP Revista Es-pecializada en Ciencias Químico-Biológicas**, **21**, 65–87 (2018). <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>
  26. C Yang, EA Chen, Y Zhang. Protein–ligand docking in the ma-chine-learning era. **Molecules**, **27**(14), 4568 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27144568>
  27. PC Agu, CA Afiukwa, OU Orji, EM Ezech, IH Ofoke, CO Ogbu *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Re-ports**, **13**(1), 13398 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>
  28. ES Istifli. Introductory chapter: Molecular docking—The transi-tion from the micro nature of small molecules to the macro world. En: *Molecular Docking—Recent Advances*. IntechOpen (2023). <https://doi.org/10.5772/intechopen.106750>
  29. A Rudnitskaya, B Török, M Török. Molecular docking of enzyme inhibitors: A computational tool for structure-based drug design. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, **38**(4), 261–265 (2010). <https://doi.org/10.1002/bmb.20392>
  30. G Jing, W Gao, Y Wang, K Xu, W Luo, T Hong *et al.* Enhancing enzyme activity and thermostability of *Bacillus amyloliquefaciens* chitosanase BaCsn46A through saturation mutagenesis at Ser196. **Current Microbiology**, **80**(5), 180 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03281-5>
  31. LW Stockinger, KB Eide, AL Dybvik, H Sletta, KM Vårum, VG Eijsink *et al.* The effect of the carbohydrate binding module on substrate degradation by the human chitotriosidase. **Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, **1854**(10), 1494–1501 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.06.008>
  32. Ö Kurç, N Rähse, H Gohlke, J Cramer. Human chitinases and chi-tinase-like proteins as emerging drug targets—a medicinal chemis-try perspective. **RSC Medicinal Chemistry**, **16**(6), 2388–2402 (2025). <https://doi.org/10.1039/D4MD01050G>
  33. RM de Angelo, LA Nascimento, JP Encide, H Barbosa, JH Lago, F da Silva Emery *et al.* Advances and Challenges in Molecular Docking Applied to Neglected Tropical Diseases. **Current Me-dicinal Chemistry**, **32**(28), 5939–5959 (2025). <https://doi.org/10.2174/0109298673327352240930040103>
  34. BB Aam, EB Heggset, AL Norberg, M Sørli, KM Vårum, VG Eijsink. Production of chitoooligosaccharides and their potential applications in medicine. **Marine Drugs**, **8**(5), 1482–1517 (2010). <https://doi.org/10.3390/md8051482>
  35. C Hao, L Gao, Y Zhang, W Wang, G Yu, H Guan *et al.* Acetylated chitosan oligosaccharides act as antagonists against glutamate-in-duced PC12 cell death via Bcl-2/Bax signal pathway. **Marine Drugs**, **13**(3), 1267–1289 (2015). <https://doi.org/10.3390/md13031267>
  36. NN Desai, AK Allen. The purification of potato lectin by affinity chromatography on an N,N',N''-triacylchitotriose-Sepharose matrix. **Analytical Biochemistry**, **93**(1), 88–90 (1979). [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(79\)80120-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(79)80120-7)
  37. X Zhang, K Li, S Liu, R Xing, H Yu, X Chen, P Li. Size effects of chitoooligomers on the growth and photosynthetic characteris-tics of wheat seedlings. **Carbohydrate Polymers**, **138**, 27–33 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.050>
  38. KC Li, S Liu, RE Xing, HH Yu, Y Qin, RF Li *et al.* High-resolu-tion separation of homogeneous chitoooligomers series from 2-mers to 7-mers by ion-exchange chromatography. **Journal of Separation Science**, **36**(8), 1275–1282 (2013). <https://doi.org/10.1002/jssc.201201038>
  39. P Zou, X Tian, B Dong, C Zhang. Size effects of chitoooligomers with certain degrees of polymerization on the chilling tolerance of wheat seedlings. **Carbohydrate Polymers**, **160**, 194–202 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.058>
  40. H Li, K Ji, P Liu, Y Geng, J Gong, C Zhang *et al.* Chitotriose Enhanced Antitumor Activity of Doxorubicin through Egr1 Up-regulation in MDA-MB-231 Cells. **Marine Drugs**, **22**, 26 (2024). <https://doi.org/10.3390/md22010026>
  41. K Li, S Liu, R Xing, Y Qin, P Li. Preparation, characterization and antioxidant activity of two partially N-acetylated chito-trioses.

- 
- Carbohydrate Polymers**, **92**(2), 1730–1736 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.038>
42. KI Amano, E Ito. The action of lysozyme on partially deacetylated chitin. **Eur. J. Biochemistry**, **85**(1), 97–104 (1978). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12216.x>
43. SJ Horn, M Sørli, G Vaaje-Kolstad, AL Norberg, B Synstad, KM Vårum *et al.* Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*. **Biocatalysis and Biotransformation**, **24**(1–2), 39–53 (2006). <https://doi.org/10.1080/10242420500518482>
44. A Narahari, H Singla, PK Nareddy, G Bulusu, A Surolia, MJ Swamy. Isothermal titration calorimetric and computational studies on the binding of chitoooligosaccharides to pumpkin (*Cucurbita maxima*) phloem exudate lectin. **J. Phys. Chem.**, **B115**(14), 4110–4117 (2011). <https://doi.org/10.1021/jp110468n>
45. O Crasson, G Courtade, RR Léonard, FL Aachmann, F Legrand, R Parente *et al.* Human chitotriosidase: catalytic domain or carbohydrate binding module, who's leading HCHT's biological function. **Scientific Reports**, **7**(1), 2768 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02382-z>
46. KB Bobbili, N Sivaji, B Priya, K Suguna, A Surolia. Structure and interactions of the phloem lectin (phloem protein 2) Cus17 from *Cucumis sativus*. **Structure**, **31**(4), 464–479 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.str.2023.02.008>
47. Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.2.0. <http://avogadro.cc/>
48. VJ Osterne, KS Nascimento, BS Cavada, EJ Van Damme. The future of plant lectinology: Advanced technologies and computational tools. **BBA Advances**, **7**, 100145 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2025.100145>
49. Y Liu, X Yang, J Gan, S Chen, ZX Xiao, Y Cao. CB-Dock2: improved protein–ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting. **Nucleic Acids Res.**, **50**(W1), W159–W164 (2022). <https://doi.org/10.1093/nar/gkac394>
50. Y Liu, Y Cao. Protein–Ligand Blind Docking Using CB-Dock2. In: *Computational Drug Discovery and Design. Methods in Molecular Biology*, Vol 2714, Eds. M Gore, M. y UB Jagtap. Humana, New York, USA, (2024). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3441-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3441-7_6)
51. PK Nareddy, KB Bobbili, MJ Swamy. Purification, physico-chemical characterization and thermodynamics of chitoooligosaccharide binding to cucumber (*Cucumis sativus*) phloem lectin. **Int. J. Biol. Macromol.**, **95**, 910–919 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.078>
-