

Artículo de investigación

<https://doi.org/10.33789/talentos.11.1.193>

Descripción físico-química teórica y computacional de los complejos enzima-ligando de la proteína bromelina reportada mediante difracción de Rayos X

Theoretical and computational physicochemical description of the enzyme-ligand complexes of bromelain protein reported by X-Ray diffraction



Fabián Mauricio Santana Romo 

Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí - Ecuador

fmsantana@espe.edu.ec

Marcia Jimena Morales Ortíz 

Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí - Ecuador

Aurora Lisette Carreño Otero 

Investigador independiente, Bucaramanga - Colombia

Gabriela Elena Vizuete Fiallos 

Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí - Ecuador

Jessica Lorena Peñaherrera Veintimilla 

Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí - Ecuador

Resumen: El estudio teórico computacional aborda la descripción de los complejos enzima-ligando obtenidos mediante el método de difracción de Rayos X. El propósito de este estudio es analizar a la enzima bromelina aplicando aspectos de la química teórica y computacional, con un enfoque transdisciplinar, a través de cribados virtuales consecutivos en la plataforma del RCSB PDB hasta llegar al cristal de mejor calidad reportada. La descripción física de la obtención de coordenadas tridimensionales a través del modelo de difracción de Rayos X, y la aplicación de la química teórica y computacional para describir la estructura proteínica cuaternaria reportada con sus cadenas, ligandos asociados, y moléculas de agua estructural. Se determinó que el complejo cristalino ID PDB: 6YCB es el que posee la mejor resolución, comparándola con respecto a la proteína en criogenia que minimiza sus vibraciones estructurales.

Palabras Clave: Bromelina, cristalografía, enzima-ligando, físico-química, Rayos X.

Abstract: The computational theoretical study addresses the description of the enzyme-ligand complexes obtained by the X-Ray diffraction method. This study aims to analyze the enzyme bromelain by applying aspects of theoretical and computational chemistry, with a transdisciplinary approach, by applying computational chemistry through consecutive virtual screenings on the RCSB platform. PDB until reaching the crystal of best-reported quality. The physical description of obtaining three-dimensional coordinates through the X-Ray diffraction model and applying theoretical and computational chemistry to describe the reported quaternary protein structure with its chains, associated ligands, and structural water molecules. It was determined that the crystalline complex PDB ID: 6YCB has the best resolution compared to the cryogenic protein that minimizes its structural vibrations.

Keywords: Bromelain, crystallography, enzyme-ligand, physical chemistry, X-Rays.

Citación sugerida: Santana Romo, F., Morales Ortíz, M., Carreño Otero, A., Vizuete Fiallos, G., & Peñaherrera Veintimilla, J. (2024). Descripción físico-química teórica y computacional de los complejos enzima-ligando de la proteína bromelina reportada mediante difracción de Rayos X. *Revista de Investigación Talentos*, 11(1), 1-14. <https://doi.org/10.33789/talentos.11.1.193>

I. Introducción

Dentro de la química está en auge las ciencias computacionales asociadas, es así como la química teórica y computacional se conjuga con áreas complementarias, entre ellas la física para predecir los fenómenos atómicos y estructurales de sus partículas, y la biotecnología para dar una posible aplicación práctica, en la mayor parte de los casos refleja una bioactividad directa (McArdle et al., 2020; Polik & Schmidt, 2022). Dando como resultado que la química es el punto de convergencia para explicar fenómenos paralelos en otras áreas, así también como punto de llegada para concluir los comportamientos de la materia, tanto inorgánica como viva (Leszczynski & Shukla, 2010).

Las biomoléculas poseen primordial importancia en el entendimiento de sus estructuras tridimensionales, ya que cada uno de sus átomos poseen una hibridación específica a la que corresponde su respectiva geometría molecular (Santana-Romo et al., 2020). Con este precedente se toma el método de cristalización y difracción de Rayos X, para retratar estructuralmente cada átomo de una molécula y/o compuesto, dando como resultado las coordenadas espaciales (x,y,z) que al graficarlas nos trasladan a un plano amplificado del compuesto y sus enlaces formales (Ali et al., 2022; Chen et al., 2019).

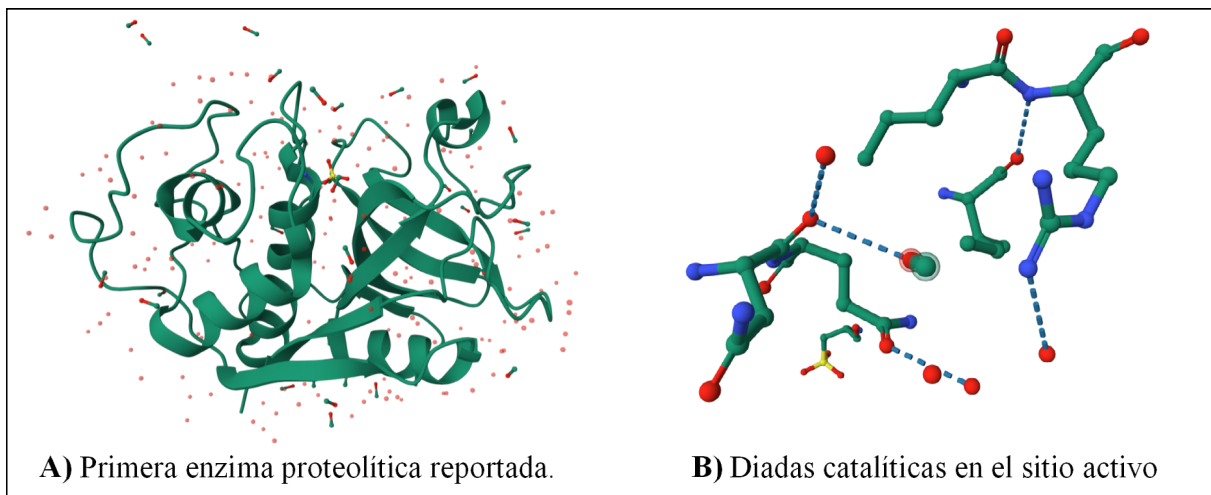
A través de la Ley de Bragg en el campo de la dispersión y difracción de los Rayos X, simplificando conceptos como una reflexión

de ondas que chocan en superficies con efecto de espejo, se construye el modelo en el que cada sitio de choque es una frontera en la que un impedimento no permite el paso libre de la energía; múltiples ondas chocan un plano cristalino en donde se genera las ubicaciones de los átomos de la molécula analizada (J.-J. Xie & Liu, 2023). Para desplegar la estructura propuesta final, se toma en cuenta los radios atómicos, las distancias de enlace, y los ángulos diedros para emitir una propuesta conformación estructural del compuesto (Y. Xie et al., 2023).

La determinación estructural de cada átomo presente en el compuesto, molécula o macromolécula hace que se tenga una fuente fiable para crear bases de datos para el almacenamiento y consulta de complejos proteínicos, como lo es el RSCB Protein Data Bank (PDB), donde se encuentra cristales reportados de complejos enzima-ligando, todos ellos en su estructura cuaternaria de super enrollamiento, al unirse sus monómeros estructurales, mediante enlaces peptídicos entre residuos aminoacídicos (Duarte et al., 2022).

Figura 1

Complejo enzima-ligando ID PDB: 9PAP reportado en 1986-03-3 (Kamphuis et al., 1984)



El objetivo principal de este trabajo es afianzar la multidisciplinaria a través de las ciencias computacionales complementarias a la química, con el fin de tener una línea base inicial para futuras aproximaciones de la enzima bromelina, dando a conocer su importancia proteolítica en la ingeniería de enzimas, ablandando tejidos; como también a proyecciones terapéuticas como cicatrización de heridas, salud cardiovascular, digestión, y trastornos osteoartrosicos y reumáticos. (Agrawal et al., 2022; Pavan et al., 2012; Pezzani et al., 2023)

La relevancia de tener un enfoque de varias disciplinas es contribuir a elucidar aspectos poco comunes, y peculiares de las estructuras proteicas obtenidos por el método de difracción de Rayos X. Siendo así muy útil la química computacional que a través de programas específicos proporciona una visualización tridimensional de los complejos enzima-ligando, mejorando su entendimiento,

y su proyección para entenderla en la versión dinámica de éstas.

II. Materiales y Métodos

Descripción Física de la Difracción de Rayos X

Mediante el análisis de la técnica de elucidación espectroscópica de difracción de Rayos X, planteando inicialmente el fundamento de ésta, seguido de enunciar cada uno de los tipos de análisis aplicando los Rayos X (Chojnowski et al., 2022; Nam, 2022). Con el enfoque a la obtención de cristales estructurales se describió los modelos matemáticos y físicos a seguir para la obtención de las coordenadas espaciales, cada átomo refleja su coordenada tridimensional obtenida en comparación con la coordenada esperada (Wang et al., 2022).

Aplicación Químico-Computacional a los Cristales de Bromelina

Aplicando un cribado virtual a través de filtros consecutivos en las técnicas de química computacional, se generó una lista preliminar consolidada de los complejos enzima-ligando de la proteína bromelina (Boufissiou et al., 2022; Scardino et al., 2023). La lista generada deberá reflejar la totalidad de complejos enzimáticos reportados por los diversos tipos de técnicas de elucidación estructural, centrándonos en la difracción de Rayos X.

Tabulación de Ligandos Cristalizados por su Procedencia

Como resultado del punto 2.2 se obtuvo un cribado virtual holístico de los complejos enzima-ligando de las proteínas/cristales reportados en el RCSB PDB. Con un cribado extra se obtuvo una lista refinada de las proteínas de bromelina obtenidas de acuerdo con su procedencia, es decir al organismo de expresión génica en donde se aisló y purificó la enzima (RCSB Protein Data Bank, 2022).

Reporte de Resolución Mediante Coordenadas Espaciales

Con la ayuda de la tabulación de resultados para los complejos cristalizados, y con la referencia de la Desviación de la Raíz Cuadrada Media (DRCM), sus siglas en inglés Root-Mean-Square Deviation (RMSD) en el área de la dinámica molecular como parámetro de contraste entre coordenadas

obtenidas y esperadas, entrega una variable de confiabilidad al tener un cristal enzima-ligando reportado más cercano a su real ubicación espacial-tridimensional. El sistema de cribado virtual consecutivo entregó la lista global, en la que se procedió a ordenar de forma creciente los valores de DRCM siendo el valor más pequeño el de mayor calidad/confiabilidad. (Greisman et al., 2023)

Visualización Tridimensional de Complejos con Menor Resolución

La visualización de los cristales reportados en el PDB y tabulados previamente en el paso 2.4 muestran los mejores resultados en cuanto a calidad del complejo enzima-ligando, es así como mediante la utilización del graficador UCSF Chimera versión 1.17 se pudo construir la representación tridimensional de la enzima cuaternaria de la bromelina con menor resolución (Pettersen et al., 2004). Se procedió a mostrar la enzima total, el ligando cristalizado asociado, el volumen electrostático, y finalmente, la superficie de la enzima con el 70% de transparencia y su ligando asociado.

III. Resultados y Discusión

Fundamento Físico de la Difracción de Rayos X

Los Rayos X se encuentran dentro del espectro electromagnético (longitud de onda

$\lambda = 10^{-10}$ m), se puede indicar que actúan de forma semejante que la luz visible, pero con la diferencia de que los Rayos X son más energéticos. El espectro electromagnético puede actuar de forma dual esto implica que en ocasiones tiene movimiento ondulatorio y en otras actúa como partícula. (Nam, 2022; Vélasquez-González & Amézquita-Morataya, 2022)

Para generar un análisis adecuado de la estructura tridimensional de una proteína se suelen utilizar varias técnicas como cristalografía de proteínas, Resonancia Magnética Nuclear (RMN), crio-microscopía electrónica (Crio ME), y modelado por homología. De las técnicas enunciadas la más utilizada es la de cristalografía de proteínas, la que permite obtener estructuras reticulares ordenadas, en estado sólido las proteínas tienden a desnaturalizarse o a deformarse, pero si están en estado cristalino estas tienen mayor estabilidad. (Kavitha G. et al., 2022; Krishna & Philip, 2022)

Cuando la proteína se encuentra cristalizada, se irradia la muestra con rayos X, generando la difracción, se trata de Redir las distancias interatómicas de una macromolécula. La difracción de los Rayos X se genera cuando un haz de Rayos X interaccionan con los electrones del cristal y estos comienzan a vibrar emitiendo radiación en todas direcciones, generando dispersión de ondas electromagnéticas. Los cristales tienen acoplamientos de tipo periódico. eso permite que en ciertas direcciones se genere la superposición de ondas electromagnéticas

o una interferencia constructiva, como lo detalla la ley de Bragg. (Liu et al., 2022; Lovesey & van der Laan, 2022; Yang et al., 2022). Ver figura 2.

Para poder generar un patrón de interferencia es necesario considerar las diferencias de trayecto totales de las ondas dispersadas, las distancias de la fuente al elemento dispersor, y de éste al observador. Según la hipótesis de Bragg, los planos de átomos de la red cristalina son como espejos y estos planos están separados por una distancia d constante, entonces una onda de Rayos X con una longitud de onda λ inciden sobre el plano imaginario, y un ángulo de incidencia θ_1 , para que exista interferencia constructiva es necesario que la onda reflejada siga en fase. (Quenot et al., 2022)

Para que la radiación llegue en fase al observador se requiere: el ángulo de incidencia θ_1 debe ser igual al ángulo dispersión θ_2 , la diferencia entre filas adyacentes será igual a $n\lambda$. Por lo tanto, la ley de Bragg se reduce a la Ecuación 1:

$$2d \sin\theta = n\lambda \quad (1)$$

Respuesta químico-computacional de los complejos enzima-ligando

Al generar una búsqueda especializada en la plataforma del RCSB PDB, se obtuvo una lista de 36 cristales enzimáticos; siete de ellos se obtuvieron por la técnica de RMN; mientras que un cristal no fue de proteína cristalizada, sino de un inhibidor proteico de la enzima bromelina. La información se muestra de forma organizada en la Tabla 1.

Figura 2

Representación gráfica de la Ley de Bragg (Lodh et al., 2022).

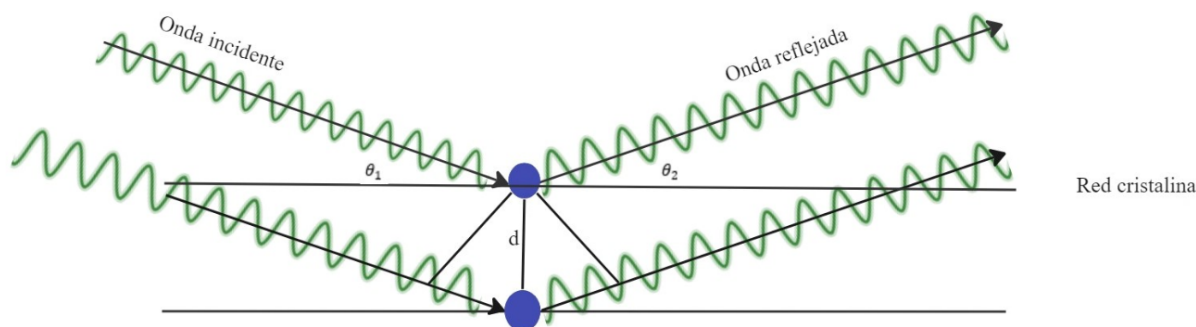


Tabla 1

Listado de complejos cristalinos de la enzima bromelina

No.	ID PDB	No.	ID PDB	No.	ID PDB
1	2BI6*	13	2FJ8**	25	5J4Q
2	1BI6*	14	6LH6	26	5J4S
3	6Y6L	15	1H34	27	2QN5
4	6YCE	16	1BBI*	28	3MYW
5	6YCG	17	1PI2	29	1TX6
6	6YCB	18	2BBI*	30	2ILN
7	6YCC	19	2R33	31	3RU4
8	6YCD	20	1PBI	32	1D6R
9	6YCF	21	1C2A	33	2G81
10	6OKJ	22	1K9B	34	2L4V*
11	6MIS	23	1MVZ*	35	6MT1
12	6U7D	24	2AIH*	36	9PAP

*Complejos enzima-ligando reportados por Solución vía RMN,

**Cristal de alta resolución del inhibidor Bowman-Birk de cebada frente a la bromelina.

Cribado Virtual a la Enzima Bromelina por su Procedencia

Mediante un filtro consecutivo se tomó en cuenta a todos los cristales de la enzima

bromelina, catalogándolos por el organismo fuente en el que se generó su expresión, para su posterior purificación y elucidación por técnicas espectroscópicas. La Tabla 2 refleja 15 organismos de expresión génica, donde los resultados más representativos son en la fruta piña *Ananas comosus* con 13 cristales reportados, mientras que en el ganado vacuno *Bos taurus* se encontró 7 cristales enzimáticos, la soya *Glycine max* presentó 7 complejos cristalinos; así mismo otros organismos tienen presencia mínima de enzimas cristalizadas.

Reporte de Resolución Mediante DRCM

A través de un filtro específico se pudo catalogar a los 27 cristales enzimáticos según su DRCM en rangos de 0,5 unidades. Se tomó en cuenta los límites de clase en 1,0 y 3,5 unidades, teniendo así cinco rangos en donde se clasificaron todos los cristales por su resolución a través de método de cristalización de Rayos X (Ver Tabla 3). Se conoce que las resoluciones más cercanas a cero indican la mejor calidad/resolución del cristal, teniendo una menor desviación estándar con respecto

a la enzima cristalizada; la que se contrasta con las coordenadas especiales de la enzima en criogenia, que presenta la minimización de

vibraciones en la enzima purificada en estado sólido.

Tabla 2

Organismo de procedencia en el aislamiento de la enzima bromelina

No.	Organismo	Cantidad	ID PDB
1	<i>Ananas comosus</i>	13	2BI6, 1BI6, 6Y6L, 6YCE, 6YCG, 6YCB, 6YCC, 6YCD, 6YCF, 6OKJ, 6MIS, 6U7D, 2L4V
2	<i>Bos taurus</i>	7	2ILN, 3RU4, 2G81, 2QN5, 5J4Q, 5J4S, 1D6R
3	<i>Glycine max</i>	7	5J4Q, 5J4S, 1D6R, 1BBI, 1PI2, 2BBI, 1K9B
4	<i>Hordeum vulgare</i>	3	1TX6, 2FJ8, 1C2A
5	<i>Vigna unguiculata</i>	3	3RU4, 2G81, 2R33
6	<i>Medicago scutellata</i>	2	2ILN, 1MVZ
7	<i>Sus scrofa</i>	2	3MYW, 1TX6
8	<i>Carica papaya</i>	1	9PAP
9	<i>Cicer arietinum</i>	1	6LH6
10	<i>Lens culinaris</i>	1	2AIH
11	<i>Medicago truncatula</i>	1	6MT1
12	<i>Oryza sativa</i>	1	2QN5
13	<i>Phaseolus lunatus</i>	1	1H34
14	<i>Pisum sativum</i>	1	1PBI
15	<i>Vigna radiata</i>	1	3MYW

Tabla 3

Rango de resoluciones de los cristales de la enzima bromelina

No.	Rango DRCM	Cantidad	PDB ID
1	1,0 - 1,5	5	6Y6L, 6YCG, 6YCB, 6YCC, 6YCD
2	1,5 - 2,0	9	6YCE, 6YCF, 6OKJ, 6MIS, 1C2A, 3RU4, 2G81, 6MT1, 9PAP
3	2,0 - 2,5	6	1H34, 5J4Q, 5J4S, 1TX6, 2ILN, 1D6R
4	2,5 - 3,0	5	1PI2, 2R33, 1PBI, 1K9B, 3MYW
5	3,0 - 3,5	2	6U7D, 2QN5

Una vez escogido el rango de mejor resolución/calidad, se procedió a cribar una vez más para mostrar los seis cristales con su respectivo valor de resolución DRCM, como se puede apreciar en la Tabla 4. Cabe destacar que los cinco cristales formaron parte de un mismo estudio (Azarkan et al., 2020).

El cristal ID PDB: 6YCB se importó al graficador UCSF Chimera versión 1.17 para generar su imagen tridimensional preliminar, obteniendo la visualización del dímero estructural, cadena A de color azul, cadena B de color rojo. En la Figura 3 se muestra la conformación de plegamientos proteicos.

Complejo Enzimático Tridimensional de Menor Resolución

Al escoger al cristal ID PDB: 6YCB se logró extraer las gráficas globales de toda la proteína, es así como en primera instancia se generó todas las cadenas de residuos aminoacídicos con la visualización inicial de alambres (Figura 4A). De forma consecutiva a cada uno de los átomos y enlaces se les asignó la visualización de palillos (Figura 4B) aumentando el grosor de cada línea. En la Figura 4C se muestra el volumen electrostático representado como una superficie de color sólido, delimitando zonas como salientes y posibles cavidades catalíticas. Finalmente, en la Figura 4D se representa una gráfica mixta entre el volumen electrostático con transparencia al 70% y la visualización de fondo de palillos.

Siguiendo esta secuencia se demuestra a través de herramientas químico-computacionales

como un cristal enzimático reportado en el RCSB PDB, se lo puede tratar para su visualización y refinamiento en estructuras que reflejan su tridimensionalidad, y así proyectar futuras aplicaciones biotecnológicas.

Tabla 4

Reporte de mejores resoluciones de la enzima bromelina

No.	ID PDB	DRCM [Å]	Fecha lanzamiento
1	6Y6L	1,30	2020-11-25
2	6YCG	1,45	2020-11-25
3	6YCB	1,26	2020-11-25
4	6YCC	1,30	2020-11-25
5	6YCD	1,35	2020-11-25

Figura 3

Cristal enzimático tridimensional ID PDB: 6YCB (Azarkan et al., 2020)

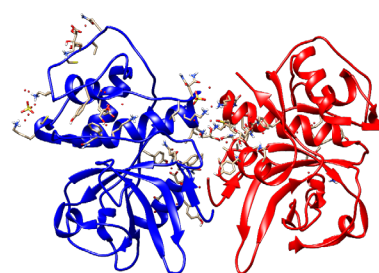
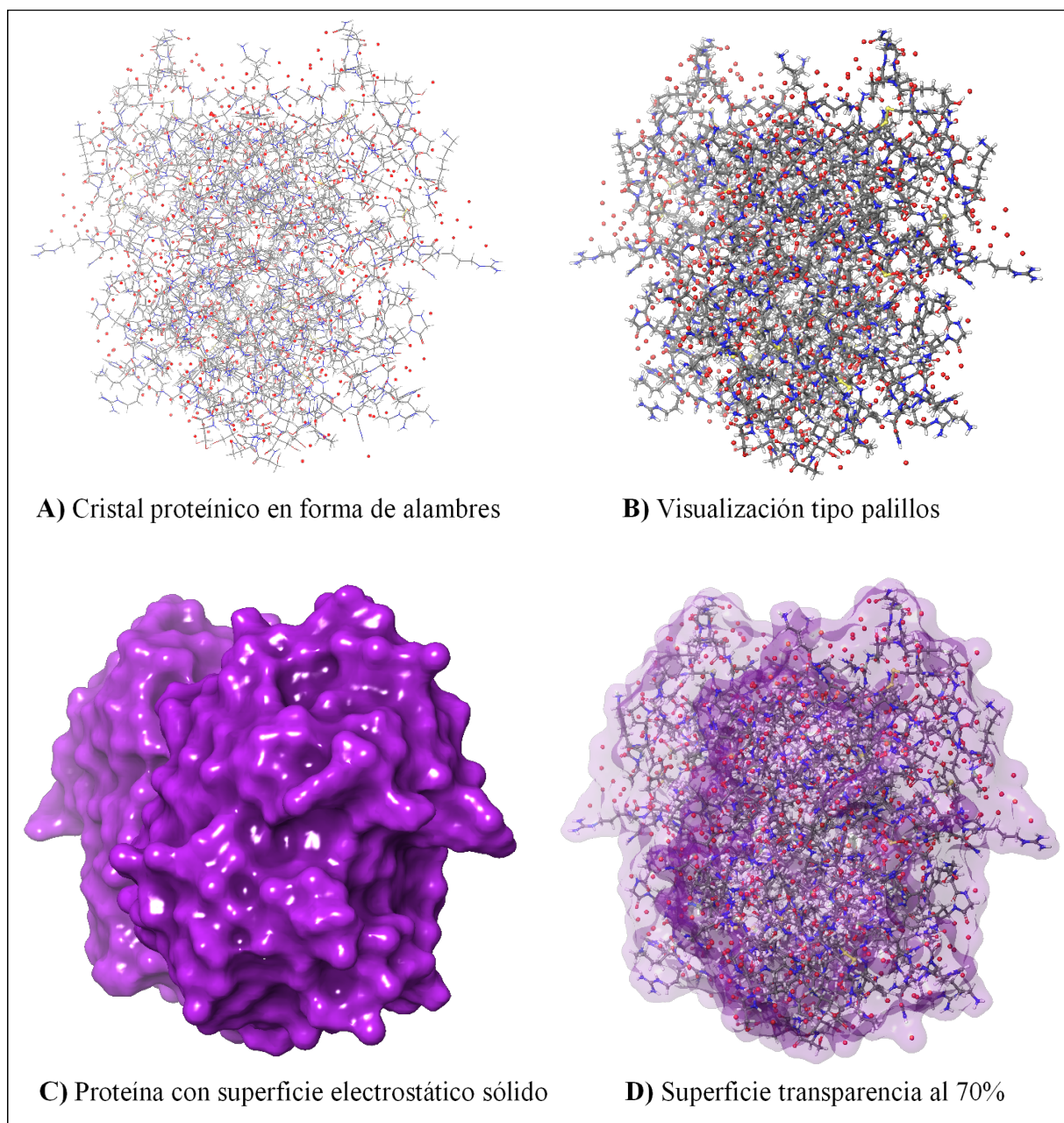


Figura 4

Cristal enzimático en proceso de depuración ID PDB: 6YCB (Azarkan et al., 2020).

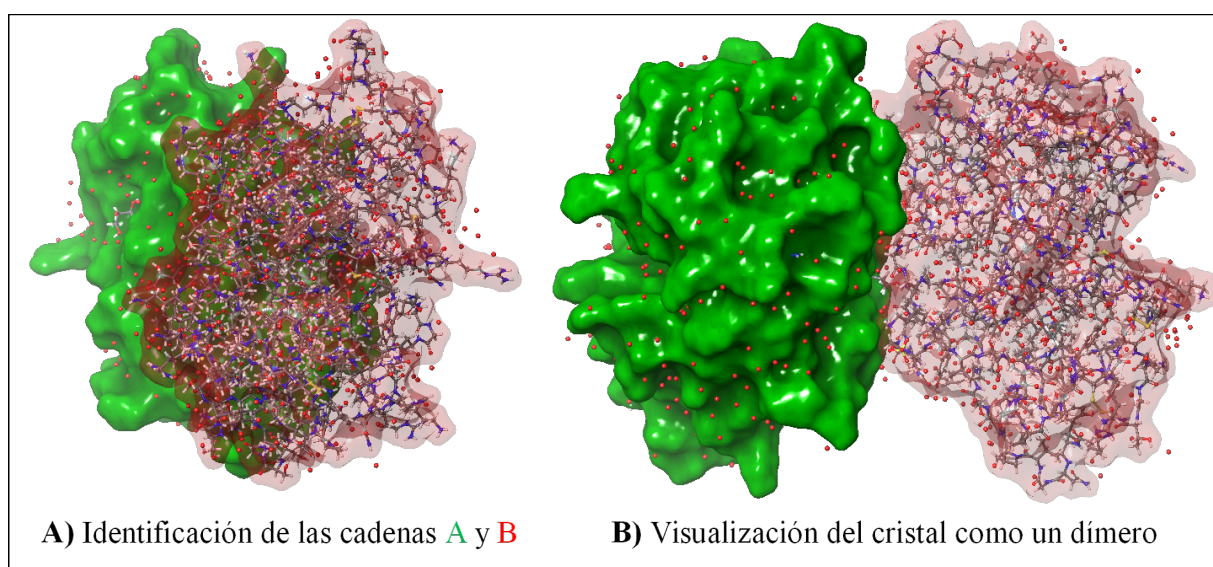


Para finalizar este estudio, se determinó que el complejo cristalino ID PDB: 6YCB, por ser una proteína globular con dos cadenas muy bien delineadas, se pudo concluir que cada unidad monomérica presenta un sitio activo con sus respectivas diadas catalíticas para su actividad proteolítica. La Figura 5A muestra de forma lateral a las cadenas A y B, siendo la cadena A una superficie verde de color sólido, mientras que la cadena B es una proyección de volumen electrostático de

color rojo, y con transparencia al 70% para mostrar su esqueleto interno de residuos aminoacídicos con visualización de palillos. Consecuentemente, la Figura 5B muestra una visualización en donde los dos monómeros de proteína globular se representan una alado de la otra, obteniendo una proyección especular, demostrando que las subunidades A y B son iguales, teniendo la misma secuencia de residuos aminoacídicos constituyentes.

Figura 5

Identificación estructural del cristal ID PDB: 6YCB (Azarkan et al., 2020).



IV. Conclusiones

La importancia de saber aprovechar los recursos disponibles como la plataforma RSCB Protein Data Bank (PDB), donde se reportan complejos enzima-ligando, identificado puntualmente estos objetivos moleculares o dianas terapéuticas en su estudio frente a nuevas y más eficaces moléculas bioactivas. Es así como, el entendimiento de

la difracción de Rayos X, y cómo su modelo matemático refleja la posición individual de cada átomo, generando una visualización tridimensional que nos permite entender de forma paralela las conformaciones y posibles impedimentos que puede tener un ligando para asociarse con la enzima bromelina, que en su super enrollamiento comprende 67 residuos aminoacídicos, los mismos que evidencian un dímero estructural macromolecular.

La enzima bromelina al ser destacada en la industria de los alimentos, y actualmente como biomolécula en la medicina holística es un foco para la inter y multidisciplinaria, aplicando así modelos explicados a través de teorías complementarias que contribuyen al entendimiento de esta macromolécula. Con el uso de herramientas químico-computacionales se hace un puente entre las diversas especializaciones teóricas, teniendo así una contribución significativa que inicia a partir de una revisión profunda del estado del arte. Llegando hasta la aplicación mediante graficadores tridimensionales que evalúan estos objetivos moleculares de forma cualitativa y cuantitativa simultáneamente posibles y potenciales inhibidores de actividad.

VI. Referencias Bibliográficas

- Agrawal, P., Nikhade, P., Patel, A., Mankar, N., & Sedani, S. (2022). Bromelain: A Potent Phytomedicine. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.27876>
- Ali, A., Chiang, Y. W., & Santos, R. M. (2022). X-ray Diffraction Techniques for Mineral Characterization: A Review for Engineers of the Fundamentals, Applications, and Research Directions. *Minerals*, 12(2), 205. <https://doi.org/10.3390/min12020205>
- Azarkan, M., Maquoi, E., Delbrassine, F., Herman, R., M'Rabet, N., Calvo Esposito, R., Charlier, P., & Kerff, F. (2020). Structures of the free and inhibitors-bound forms of bromelain and ananain from *Ananas comosus* stem and in vitro study of their cytotoxicity. *Scientific Reports*, 10(1), 19570. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76172-5>
- Boufissiou, A., Abdalla, M., Sharaf, M., Al-Resayes, S. I., Immeddine, K., Alam, M., Yagi, S., Azam, M., & Yousfi, M. (2022). In-silico investigation of phenolic compounds from leaves of *Phillyrea angustifolia* L. as a potential inhibitor against the SARS-CoV-2 main protease (Mpro PDB ID:5R83) using a virtual screening method. *Journal of Saudi Chemical Society*, 26(3), 101473. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101473>
- Chen, P. Y.-T., DeColli, A. A., Freel Meyers, C. L., & Drennan, C. L. (2019). X-ray crystallography-based structural elucidation of enzyme-bound intermediates along the 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase reaction coordinate. *Journal of Biological Chemistry*, 294(33), 12405–12414. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009321>
- Chojnowski, G., Simpkin, A. J., Leonardo, D. A., Seifert-Davila, W., Vivas-Ruiz, D. E., Keegan, R. M., & Rigden, D. J. (2022). findMySequence: a neural-network-based approach for identification of unknown proteins in X-Ray crystallography and cryo-

- EM. *IUCrJ*, 9(1), 86–97. <https://doi.org/10.1107/S2052252521011088>
- De Lencastre Novaes, L. C., Jozala, A. F., Lopes, A. M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P. G., & Pessoa Junior, A. (2016). Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnology Progress*, 32(1), 5–13. <https://doi.org/10.1002/btpr.2190>
- Duarte, J. M., Dutta, S., Goodsell, D. S., & Burley, S. K. (2022). Exploring protein symmetry at the RCSB Protein Data Bank. *Emerging Topics in Life Sciences*, 6(3), 231–243. <https://doi.org/10.1042/ETLS20210267>
- Greisman, J. B., Willmore, L., Yeh, C. Y., Giordanetto, F., Shahamadtar, S., Nisonoff, H., Maragakis, P., & Shaw, D. E. (2023). Discovery and Validation of the Binding Poses of Allosteric Fragment Hits to Protein Tyrosine Phosphatase 1b: From Molecular Dynamics Simulations to X-ray Crystallography. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 63(9), 2644–2650. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00236>
- Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B. A., & Drenth, J. (1984). Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 179(2), 233–256. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90467-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90467-4)
- Kavitha G., Muthulakshmi M., & Latha M. (2022). Image Segmentation Using Contour Models. In *Research Anthology on Improving Medical Imaging Techniques for Analysis and Intervention* (pp. 892–915). IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-6684-7544-7.ch045>
- Krishna, D. N. G., & Philip, J. (2022). Review on surface-characterization applications of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS): Recent developments and challenges. *Applied Surface Science Advances*, 12, 100332. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2022.100332>
- Leszczynski, Jerzy., & Shukla, M. K. (2010). *Practical Aspects of Computational Chemistry* (J. Leszczynski & M. K. Shukla, Eds.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2687-3>
- Liu, Z., Sharma, H., Park, J.-S., Kenesei, P., Miceli, A., Almer, J., Kettimuthu, R., & Foster, I. (2022). BraggNN: fast X-ray Bragg peak analysis using deep learning. *IUCrJ*, 9(1), 104–113. <https://doi.org/10.1107/S2052252521011258>
- Lodh, A., Thool, K., & Samajdar, I. (2022). X-ray Diffraction for the Determination of Residual Stress of Crystalline Material: An Overview. *Transactions of the Indian Institute of Metals*, 75(4), 983–995. <https://doi.org/10.1007/s12046-022-02000-0>

- org/10.1007/s12666-022-02540-6
- Lovesey, S. W., & van der Laan, G. (2022). Ligand-metal bonding effects in resonance enhanced x-ray Bragg diffraction. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 34(47), 475601. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/ac7e11>
- McArdle, S., Endo, S., Aspuru-Guzik, A., Benjamin, S. C., & Yuan, X. (2020). Quantum computational chemistry. *Reviews of Modern Physics*, 92(1), 015003. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.92.015003>
- Nam, K. H. (2022). Serial X-ray Crystallography. *Crystals*, 12(1), 99. <https://doi.org/10.3390/cryst12010099>
- Pavan, R., Jain, S., Shraddha, & Kumar, A. (2012). Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. *Biotechnology Research International*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/976203>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera -- A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pezzani, R., Jiménez-García, M., Capó, X., Sönmez Güreç, E., Sharopov, F., Rachel, T. Y. L., Ntieche Woutouoba, D., Rescigno, A., Peddio, S., Zucca, P., Tsouh Fokou, P. V., Martorell, M., Gulsunoglu-Konuskan, Z., Ydyrys, A., Bekzat, T., Gulmira, T., Hano, C., Sharifi-Rad, J., & Calina, D. (2023). Anticancer properties of bromelain: State-of-the-art and recent trends. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1068778>
- Polik, W. F., & Schmidt, J. R. (2022). WebMO: Web-based computational chemistry calculations in education and research. *WIREs Computational Molecular Science*, 12(1). <https://doi.org/10.1002/wcms.1554>
- Quenot, L., Bohic, S., & Brun, E. (2022). X-ray Phase Contrast Imaging from Synchrotron to Conventional Sources: A Review of the Existing Techniques for Biological Applications. *Applied Sciences*, 12(19), 9539. <https://doi.org/10.3390/app12199539>
- RCSB Protein Data Bank. (2022). *RCSB Protein Data Bank - Query: "Bromelain."* <https://www.rcsb.org/>
- Santana-Romo, F., Lagos, C. F., Duarte, Y., Castillo, F., Moglie, Y., Maestro, M. A., Charbe, N., & Zacconi, F. C. (2020). Innovative three-step microwave-promoted synthesis of N-propargyltetrahydroquinoline

- and 1,2,3-triazole derivatives as a potential factor Xa (FXA) inhibitors: Drug design, synthesis, and biological evaluation. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030491>
- Scardino, V., Di Filippo, J. I., & Cavasotto, C. N. (2023). How good are AlphaFold models for docking-based virtual screening? *IScience*, 26(1), 105920. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105920>
- Sharma, G., & Vimal, A. (2023). Bromelain: An Enzyme Expanding its Horizon from Food to Pharmaceutical Industry. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 24(14), 1715–1726. <https://doi.org/10.2174/1389201024666230331115338>
- Vélasquez-González, O. E., & Amézquita-Morataya, L. (2022). Cristalogenésis biológica y cristalografía en la elucidación de la estructura tridimensional de las proteínas. Revisión narrativa. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 9(2), 199–214. <https://doi.org/10.36829/63CTS.v9i2.1032>
- Wang, J., Miller, D. D., & Li, W. (2022). Molecular interactions at the colchicine binding site in tubulin: An X-ray crystallography perspective. *Drug Discovery Today*, 27(3), 759–776. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.12.001>
- Xie, J.-J., & Liu, H.-W. (2023). Analytical study of Bragg resonances by a finite periodic array of congruent trapezoidal bars or trenches on a sloping seabed. *Applied Mathematical Modelling*, 119, 717–735. <https://doi.org/10.1016/j.apm.2023.03.010>
- Xie, Y., Liu, H., Feng, H., Xie, F., Fan, Z., Wang, H., Chen, R., Liu, Q., Yi, D., & Liang, E. (2023). Variably polarized X-ray sources for LPD calibration. *Experimental Astronomy*. <https://doi.org/10.1007/s10686-023-09905-9>
- Yang, D., Phillips, N. W., Song, K., Barker, C., Harder, R. J., Cha, W., Liu, W., & Hofmann, F. (2022). In situ Bragg coherent X-ray diffraction imaging of corrosion in a Co-Fe alloy microcrystal. *CrystEngComm*, 24(7), 1334–1343. <https://doi.org/10.1039/D1CE01586A>

Recibido: 28 de diciembre, 2023

Revisado: 22 de enero, 2024

Aceptado: 30 de enero, 2024