

## Análisis mediante docking molecular del alliodorin sobre la enzima lacasa y su actividad inhibitoria sobre *Trametes versicolor*

## Analysis through molecular docking of alliodorin on the enzyme laccase and its inhibitory activity on *Trametes versicolor*

Herrera-Bucio, R.<sup>1</sup> , Villanueva-Mejía, F.<sup>2</sup> , Zamudio-Ojeda, A.<sup>3</sup> ,  
Guevara-Martínez, S.J.<sup>4</sup> , Morales-Palacios, F.G.<sup>5\*</sup> 

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica, s/n, 58030, Michoacán, México;

[rafael.herrera.bucio@umich.mx](mailto:rafael.herrera.bucio@umich.mx)

<sup>2</sup> TecNM/Instituto Tecnológico de Pabellón de Arteaga, Carretera a la estación de Rincón de Romos, km 1, 20670, Aguascalientes, México; [fvillamejia@gmail.com](mailto:fvillamejia@gmail.com)

<sup>3</sup> Department of Physics, School of Exact Sciences and Engineering, University of Guadalajara, Boulevard Gral. Marcelino García Barragán 1421, Olímpica, 44840, Jalisco, México; [adalberto.zojeda@academicos.udg.mx](mailto:adalberto.zojeda@academicos.udg.mx)

<sup>4</sup> Department of Pharmacology, School of Exact Sciences and Engineering, University of Guadalajara, Boulevard Gral. Marcelino García Barragán 1421, Olímpica, 44840, Jalisco, México; [santiago.guevara@academicos.udg.mx](mailto:santiago.guevara@academicos.udg.mx)

<sup>5</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica, s/n, 58030, Michoacán, México  
[0202408e@umich.mx](mailto:0202408e@umich.mx)



### Please cite this article as/Como citar este artículo:

Herrera-Bucio, R., Villanueva-Mejía, F., Zamudio-Ojeda, A., Guevara-Martínez, S.J., Morales-Palacios, F.G. (2025). Análisis mediante docking molecular del alliodorin sobre la enzima lacasa y su actividad inhibitoria sobre *Trametes versicolor*. *Revista Bio Ciencias*, 12, e1861. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1861>

### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: December 17<sup>th</sup> 2024.

Accepted/Aceptado: May 16<sup>th</sup> 2025.

Available on line/Publicado: June 14<sup>th</sup> 2025.

## RESUMEN

Este estudio examinó el empleo de docking molecular, para predecir la actividad biológica de una molécula, mediante el acoplamiento/interacción de esta sobre un sistema biológico (enzima). Como es el caso del compuesto aislado del árbol de *Cordia elaeagnoides* denominado alliodorin, con el cual se determinó su posible uso como conservante o antifúngico. Esto al realizarse un análisis *in silico* sobre la enzima lacasa, la cual es la principal enzima segregada por el hongo xilófago *Trametes versicolor* y la que lleva a cabo los procesos de degradación de los principales componentes de la madera (lignina, celulosa y hemicelulosa), siendo este mecanismo por el cual el hongo obtiene nutrientes para su desarrollo. Por lo tanto, se considera que al inhibir/inactivar a la enzima lacasa se inhibe al hongo *T. versicolor*, lo cual fue demostrado posteriormente al realizarse las pruebas de inhibición mediante el método de difusión en placa con el alliodorin sobre *T. versicolor*.

**PALABRAS CLAVE:** Docking, *in-silico*, productos naturales, enzima, lacasa, hongos.

### \*Corresponding Author:

**Fredy Geovannini Morales-Palacios.** Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica, s/n, 58030, Michoacán, México. Teléfono: (443)1619176 E-mail: [0202408e@umich.mx](mailto:0202408e@umich.mx)

---

## ABSTRACT

---

This study examined the use of molecular docking to predict the biological activity of a molecule by assessing its binding or interaction with a biological system (enzyme). The case in point is the compound isolated from the *Cordia alliodora* tree, named alliodorin, whose potential use as a preservative or antifungal agent was determined. An *in-silico* analysis was performed on the enzyme laccase, the primary enzyme secreted by the wood-decaying fungus *Trametes versicolor*. Laccase degrades key components of wood (lignin, cellulose, and hemicellulose), a mechanism through which the fungus obtains nutrients for its development. Therefore, it is hypothesized that inhibiting or inactivating laccase would inhibit the growth of *T. versicolor*. This hypothesis was later confirmed through inhibition tests using the disk diffusion method, demonstrating the inhibitory effect of alliodorin on *T. versicolor*.

---

**KEY WORDS:** Docking, in-silico, natural products, enzyme, laccase, fungal

---

### Introducción

Cualquier acción biológica se origina en la formación de un complejo entre una molécula y su sitio receptor en una macromolécula biológica, como una enzima. Así, la especificidad de la respuesta a una molécula se determina en gran medida por la capacidad de los diversos receptores celulares para reconocerla como agonista o antagonista, lo que permite evocar o inhibir una respuesta (García *et al.*, 2004; Warshel, 2014). La mayoría de los procesos biológicos dependen de las interacciones entre receptores moleculares y sus ligandos, lo que resalta la importancia del reconocimiento molecular en eventos biomoleculares, tales como las interacciones entre enzimas y sustratos, proteínas e inhibidores, así como ácidos nucleicos e inhibidores (Mohan *et al.*, 2005; Heldin *et al.*, 2016).

En los últimos años, se han realizado importantes avances en los cálculos teóricos que han promovido el uso y la popularidad de los estudios *in silico* (computacionales) para el análisis de moléculas de interés biológico. Estos estudios se han convertido en una parte integral de la investigación tanto industrial como académica, enfocada en el diseño y descubrimiento de moléculas con actividad biológica (Velásquez *et al.*, 2013; Macalino *et al.*, 2018). Un ejemplo notable es el docking molecular, una herramienta valiosa para comprender sistemas biológicos y las interacciones intra- o intermoleculares que pequeñas moléculas pueden tener en estos sistemas (receptor-ligando). Este enfoque permite identificar sitios específicos y/o interacciones que pueden dar lugar a efectos biológicos significativos (Honarparvar *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2015).

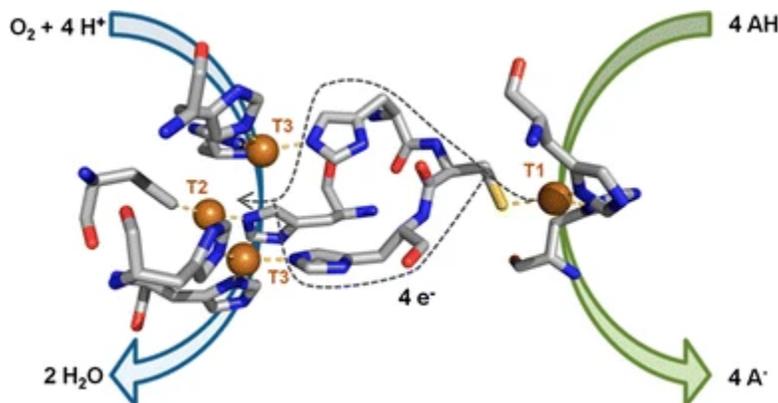
A través de este tipo de análisis teóricos, se ha obtenido valiosa información sobre el mecanismo y los sitios de acción de la enzima lacasa, la cual es la principal enzima producida por el hongo xilófago *Trametes versicolor*. Este hongo, conocido por su capacidad de causar pudrición blanca, desarrolla cuerpos fructíferos o setas (basidiomas) que crecen en todo el árbol y presentan anillos concéntricos de diversos colores que varían desde el pardo hasta el blanco y del marrón al ocre, mostrando a veces iridiscencias dependiendo del grado de humedad del ambiente (Bari *et al.*, 2015).

*T. versicolor* es uno de los degradadores más importantes de madera y se considera especialmente agresivo, ya que puede descomponer los principales componentes de la madera —lignina, celulosa y hemicelulosa— para obtener nutrientes necesarios para su crecimiento. Por estas razones, la norma Annual Book of Standards (ASTM, 1994) lo recomienda para ensayos de durabilidad (Archibald *et al.*, 1997; Tišma *et al.*, 2021).

El mecanismo de degradación de los componentes de la madera por la lacasa es un proceso de óxido-reducción, mediado por los cuatro átomos de Cu que componen esta enzima. Estos se clasifican en tres tipos (T1, T2 y T3), cada uno con propiedades diferentes. El Cu tipo 1 (T1) actúa como el primer aceptor de electrones de los sustratos, mientras que los Cu T2 y T3 forman un clúster trinuclear (TNC) donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno (Gochev & Krastanov, 2007; Strong & Claus, 2011; Singh & Gupta, 2020).

El mecanismo de este proceso inicia con el T1, que recibe los electrones, los cuales se transfieren secuencialmente al centro T2-T3. Al recibir cuatro electrones, este centro reduce una molécula de oxígeno a agua (Augustine *et al.*, 2008; Götze & Bühl, 2016) (Figura 1). Por lo tanto, esta enzima muestra una amplia especificidad de sustratos, ya que cataliza la oxidación de difenoles, aminofenoles, ácidos metoxifenólicos, iones orgánicos, diaminas, arilaminas, aminas aromáticas y dímeros de lignina, tanto fenólicos como no fenólicos (Madhavi & Lele, 2009; Chiranjeevi *et al.*, 2014; Janusz *et al.*, 2020).

Una vez identificado este mecanismo de óxido-reducción, diferentes autores mencionan tres sitios o cavidades importantes en la lacasa: (1) la cavidad del Cu T1, donde se oxidan los compuestos; (2) la cavidad o entrada de oxígeno, a través de la cual se transporta el oxígeno al TNC para su reducción; y (3) la cavidad o salida de agua, que permite la liberación de agua al finalizar el mecanismo. A partir de lo anterior, algunos estudios sugieren que la inhibición o desactivación de la enzima lacasa puede ser provocada por moléculas que se anclan en el sitio T1 y en el sitio de entrada del oxígeno, ya que estas pueden interrumpir el mecanismo de óxido-reducción (Martínez-Sotres *et al.*, 2015; Götze & Bühl, 2016). En este trabajo, se realizó un análisis mediante docking molecular con el compuesto alliodorin, con el objetivo de determinar la actividad inhibitoria de este compuesto sobre la enzima lacasa y, por ende, sobre el hongo *T. versicolor*.



**Figura 1. Mecanismo de la lacasa, iniciando por la oxidación y obtención de electrones de sustratos (lignina, celulosa y hemicelulosa) en Cu tipo 1 y continuando con la reducción de los electrones y oxígeno en el TNC para generar agua (Pardo & Camarero, 2015).**

Fuente: Pardo & Camarero, 2015.

## Material y Métodos

### Modelado y docking molecular

Inicialmente, se llevó a cabo la construcción del modelo virtual del compuesto alliodorin utilizando el software Gaussian 16. Se realizó un análisis conformacional mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT), empleando el funcional híbrido B3LYP y un conjunto de bases 6-311G\*\* (Frisch *et al.*, 2016). La estructura tridimensional de la enzima lacasa del hongo *T. versicolor* se obtuvo del Protein Data Bank (PDB), con el código 1GYC (Piontek *et al.*, 2002; Roy, 2022). El acoplamiento molecular se realizó utilizando el software de código abierto AutoDock 4.2 (Morris *et al.*, 2009; Reynaldi *et al.*, 2024).

En primer lugar, se llevó a cabo un acoplamiento a ciegas utilizando AutodockTools. Se agregaron átomos de hidrógeno polares, se asignaron cargas parciales de Kollman y se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano (LGA) para la búsqueda conformacional del complejo proteína-ligando. Este proceso incluyó una población inicial aleatoria de conformaciones del sustrato con hasta 250 orientaciones arbitrarias, una tasa de mutación del 0.02 y una tasa de cruce del 0.8. Las simulaciones consideraron 2.5 millones de evaluaciones de energía con un máximo de 27,000 generaciones. Cada simulación se ejecutó 1000 veces, generando 1000 conformaciones para calcular la energía de unión del complejo y determinar si el alliodorin interactúa con los sitios de interés identificados en una búsqueda libre (Morris *et al.*, 1998; El-Hachem *et al.*, 2017).

Adicionalmente, el proceso asigna automáticamente el número de torsiones permitidas para el alliodorin, favoreciendo poses más flexibles en el docking molecular. Se consideraron las especificaciones de interacción en la proteína 1GYC, centrándose en un cubo compuesto por 126 x 126 x 126 puntos de red, con un espaciamiento de 0.375 Å entre cada punto. Es importante señalar que el campo de fuerza implementado por AutoDock no incluye parámetros para átomos de Cu o sus formas iónicas, por lo que se modificó el archivo AD4\_parameters.dat para incluir los parámetros de Cu, siguiendo las indicaciones de la guía del usuario de AutoDock 4.2. Por último, se visualizaron las interacciones con los aminoácidos en los sitios de unión utilizando BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

## Ensayos antifúngicos

Los ensayos antifúngicos se realizaron mediante el método de difusión en placa, empleando agar papa dextrosa (3.9%) e incorporándose el alliodorin en concentraciones de 50, 75, 100, 150 mg/L. Posteriormente a la solidificación del medio, se inoculó con el micelio del hongo *T. versicolor* (número de comprobante ATCC-32745) y se incubó durante siete días a  $28 \pm 2$  °C. De igual manera se realizó una prueba control la cual consistió en agar sin tratamiento, siendo este considerado como el 0% de inhibición para comparar con las pruebas con tratamiento. Cada tratamiento se repitió tres veces y el porcentaje de inhibición se calculó utilizando la fórmula según (Rutiaga-Quiñones, 2001; Martínez-Sotres *et al.*, 2015):

$$\% \text{ inhibicion} = \left( \frac{\text{crecimiento control} - \text{crecimiento tratamiento}}{\text{crecimiento control}} \right) * 100$$

Esta fórmula compara el diámetro promedio del crecimiento del hongo de cada tratamiento con el control y por ende expresa el porcentaje de inhibición.

## Resultados y Discusión

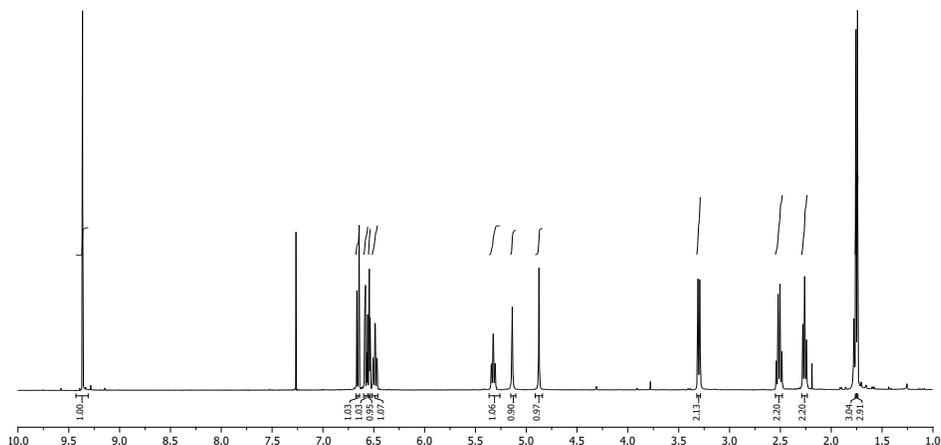
### Aislamiento del alliodorin

El aislamiento del alliodorin fue realizado por nuestro grupo de trabajo, y ya ha sido reportado previamente (Guevara-Martínez *et al.*, 2024). Este compuesto se obtuvo mediante extracciones de la harina de duramen del árbol *Cordia alliodora*, utilizando un equipo Soxhlet con el disolvente tetrahidrofurano (THF). Posteriormente, se procedió a la evaporación del disolvente para obtener el extracto crudo. Este extracto se sometió a purificación en una columna cromatográfica con una polaridad de 9:1 (Hex: AcOEt), logrando identificar un compuesto a través de cromatografías de capa fina. Finalmente, se realizaron espectroscopías de NMR <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C para caracterizar el compuesto (Figuras 2 y 3).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.74 (s, 3H, H-10'), 1.75 (s, 3H, H-9'), 2.26 (t, J = 7.2 Hz, 2H, H-5'), 2.51 (q, J = 7.3 Hz, 2H, H-4'), 3.30 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-8'), 4.87 (s, 1H, OH), 5.14 (s, 1H, OH), 5.32 (tq, J = 8.5, 1.2 Hz, 1H, H-7'), 6.49 (tq, J = 7.3, 1.3 Hz, 1H, H-3'), 6.54 (d, J = 3.0,

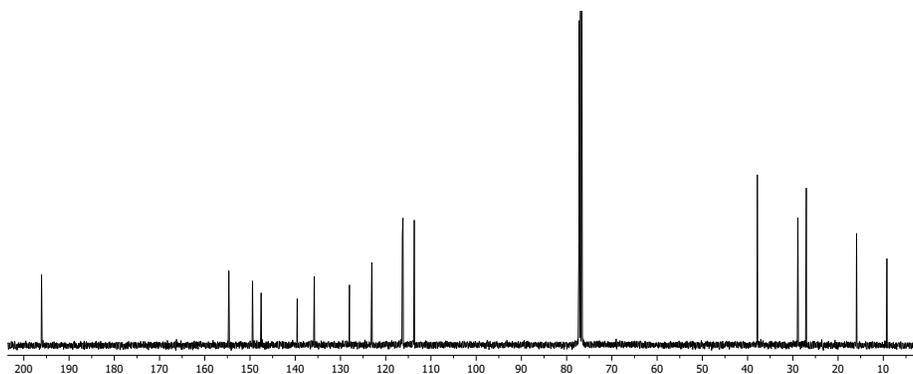
Hz, 1H, H-6), 6.57 (dd,  $J = 8.4, 3.0$  Hz, 1H, H-4), 6.65 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-3), 9.36 (s, 1H, H-1').  
 $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.28 (C-10'), 15.98 (C-9'), 27.09 (C-4'), 28.95 (C-8'), 37.91 (C-5'),  
113.72 (C-6), 116.22 (C-3), 116.35 (C-4), 123.10 (C-7'), 128.05 (C-6'), 135.82 (C-1), 139.58 (C-  
2'), 147.56 (C-5), 149.47 (C-2), 154.70 (C-3'), 196.09 (C-1'), Rf: 0.22 (Hex: AcOEt, 8:2).

Con los resultados obtenidos de NMR, se realizó una búsqueda en la literatura, encontrándose un compuesto con desplazamientos de NMR- $^{13}\text{C}$  similares reportado por Manners (1983), e identificado como 8-(2,5-Dihroxifenil)-2,6-dimetilocta-2,6-dienal o aliodorin (Figura 4).



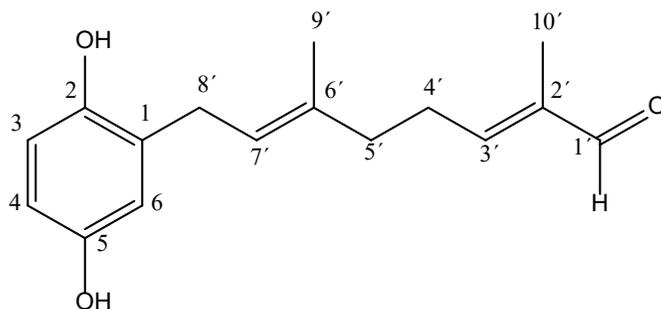
**Figura 2. Espectro NMR  $^1\text{H}$  de aliodorin, obtenido con  $\text{CDCl}_3$ .**

Fuente: Elaboración propia, visualizado en MestReNova.



**Figura 3. Espectro NMR  $^{13}\text{C}$  de aliodorin, obtenido con  $\text{CDCl}_3$ .**

Fuente: Elaboración propia, visualizado en MestReNova.



**Figura 4. Compuesto aislado del extracto de THF de *C. elaeagnoides* denominado alliodorin.**

Fuente: Elaboración propia, visualizado en ChemDraw Professional.

### **Análisis de docking del complejo alliodorin-lacasa**

Los resultados obtenidos en este trabajo se basan en la descripción del mecanismo de inhibición de la lacasa, como se describió en la parte introductoria. Además, algunos estudios que han investigado la inhibición de la lacasa sugieren que los compuestos inhibidores son moléculas pequeñas que pueden unirse a los iones de Cu del clúster trinuclear (TNC), interrumpiendo así el proceso interno de transferencia de electrones. Entre los inhibidores que han demostrado esta actividad se encuentran la azida sódica (Johannes & Majcherczyk, 2000), haluros pequeños, metales pesados y EDTA (Xu, 1996; Sun *et al.*, 2023).

Sin embargo, compuestos voluminosos de origen natural, como la medicarpina (aislada de *Dalbergia congetiflora* Pittier), también han demostrado su capacidad para inhibir la actividad de la lacasa (Martínez-Sotres *et al.*, 2015). En ese estudio, se sugiere que el efecto inhibitor se debe al bloqueo de la entrada de oxígeno hacia el TNC y a la obstrucción de la cavidad T1 por parte de la medicarpina. Además, se destaca la importancia de la unión y/o interacción con los aminoácidos que rodean los átomos de Cu del TNC y el Cu T1. Estos aminoácidos incluyen ALA80, GLN102, SER110, HIS111, SER113, TYR116, PHE162, PRO163, ASP206, ASN208, ASP224, ASN264, PHE265, ALA393, LEU399, ASP424, HIS454, ILE455 y HIS458 (Götze & Bühl, 2016; Martínez-Sotres *et al.*, 2015).

Considerando lo anterior, se llevó a cabo un docking ciego, permitiendo que el ligando (alliodorin) interactuar libre y aleatoriamente con toda la proteína (lacasa: 1GYC), sin restricciones. El objetivo era determinar si el ligando podría interactuar con los sitios previamente reportados y formar interacciones con aminoácidos de interés. Los resultados de la simulación revelaron tres sitios principales de anclaje del alliodorin sobre la lacasa: el sitio T1, el canal de entrada de oxígeno y un sitio cercano al TNC (Figura 5).



**Figura 5. Principales sitios de anclaje del alliodorin en la proteína lacasa (1GYC): en amarillo, anclaje en el sitio T1 (-6,19 kcal/mol); en rojo, sitio cerca del TNC (-7,35 kcal/mol); y en azul, anclaje en la entrada del canal de oxígeno (-7,31 kcal/mol).**

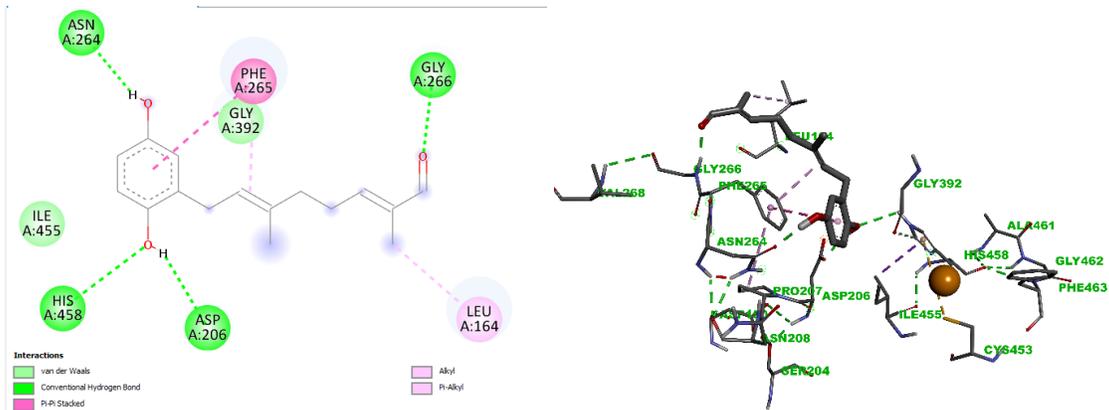
Fuente: Elaboración propia, visualizado con BIOVIA Visualizer.

Es importante resaltar que los resultados de este trabajo se compararon con los previamente reportados para la medicarpina, un compuesto de origen natural conocido por su actividad inhibitoria sobre la enzima lacasa y el hongo *T. versicolor* (Martínez-Sotres *et al.*, 2012). La energía de acoplamiento en el sitio T1 con alliodorin fue de -6.19 Kcal/mol, inferior a la reportada para la medicarpina, que fue de -7.35 Kcal/mol. Sin embargo, en la cavidad de entrada de oxígeno, el alliodorin mostró una energía de acoplamiento más favorable que la medicarpina, con valores de -7.31 Kcal/mol y -7.24 Kcal/mol, respectivamente. Además, se identificó otro sitio de anclaje no reportado para la medicarpina, que presentó la mejor energía de acoplamiento para el alliodorin, de -7.35 Kcal/mol (Figura 5).

Al confirmarse el anclaje de alliodorin en los sitios de interés de la lacasa, se procedió a la descripción de las interacciones a nivel molecular. Los resultados del acoplamiento molecular mostraron el anclaje en la cavidad T1, con una notable proximidad al Cu, formando un puente de hidrógeno con His458, y estableciendo interacciones a través de fuerzas de Van der Waals con Ile455, lo que indica que estos aminoácidos rodean al Cu T1 (Figura 6). De particular interés fue el anclaje del alliodorin en un sitio cercano al TNC, el cual dio lugar a interacciones de Van der Waals con dos de los átomos de Cu, así como con los aminoácidos que los cubren, como His111, His109 e His452. Además, se observaron fuertes interacciones (puentes de hidrógeno) con Ser113, Arg157 y Glu460 (Figura 7).

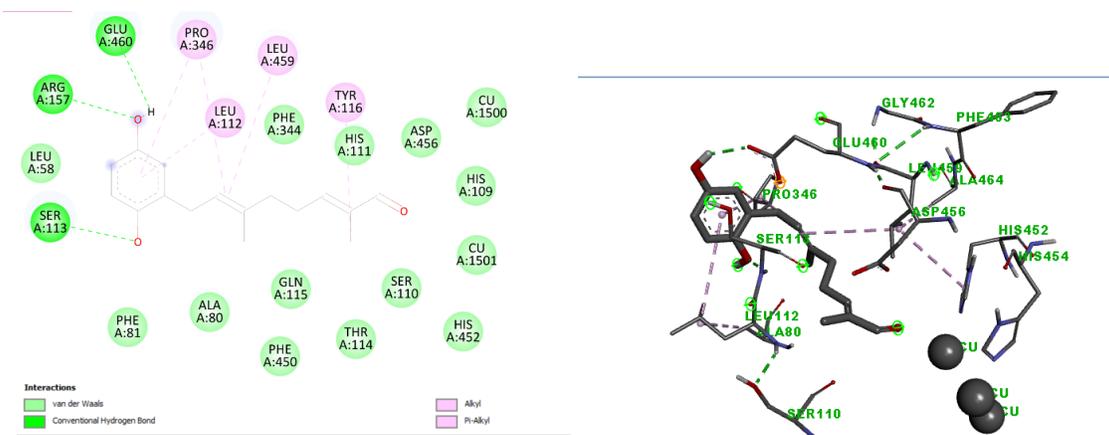
Con base en estos hallazgos y la información reportada, es evidente que el alliodorin interactúa con los sitios de interés para la inactivación de la enzima lacasa, ofreciendo mejores interacciones que las observadas para la medicarpina. Esto sugiere que el mecanismo de

inhibición del alliodorin implica la obstrucción del sitio T1 y la inactivación del TNC a través de interacciones con los aminoácidos cercanos a los átomos de Cu, de forma similar a la medicarpina, pero con resultados superiores. Esta conclusión se sustenta en las fuertes interacciones y los puentes de hidrógeno observados en los complejos formados entre el alliodorin y la enzima lacasa.



**Figura 6. Interacción del alliodorin en el sitio de anclaje cerca de T1 con los aminoácidos His458 (enlace de hidrógeno) e Ile455 (fuerzas de Van der Waals), que rodean a Cu T1.**

Fuente: Elaboración propia, visualizado con BIOVIA Visualizer.



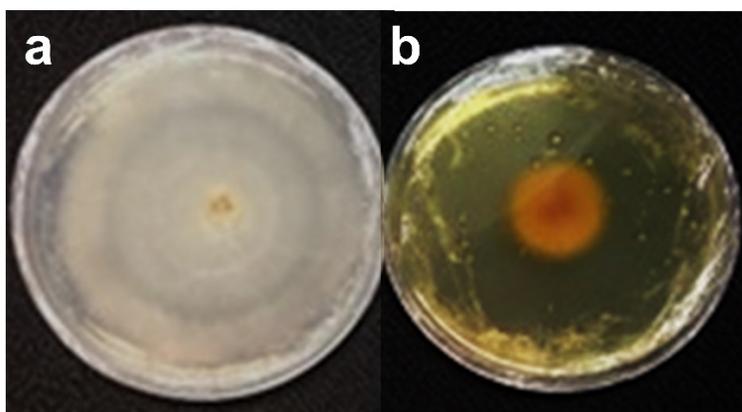
**Figura 7. Interacciones de Van der Waals del alliodorin con dos átomos de cobre del TNC y los aminoácidos His452, Ser110 e Ile455, que rodean el Cu en un sitio muy cercano al TNC.**

Fuente: Elaboración propia, visualizado con BIOVIA Visualizer.

## Actividad Antifúngica

Tras obtener resultados prometedores en el docking molecular del aliodorin, se procedió a realizar las pruebas biológicas. Esta secuencia se llevó a cabo de esta manera debido a que los compuestos de origen natural se aíslan en pequeñas cantidades y es necesario alcanzar un cierto grado de pureza. Una vez identificado el compuesto aliodorin, se continuó con el docking para verificar su posible actividad biológica sobre la lacasa y, por ende, sobre el hongo xilófago *T. versicolor*.

Los ensayos de inhibición se realizaron mediante el método de difusión en placa, aprobado por las normas ASTM para pruebas de durabilidad en laboratorio con hongos xilófagos. Aunque el método está diseñado para emplear cubos de madera inoculados con el micelio del hongo en agar y evaluar su resistencia a través de la pérdida de peso (Mielnichuk & Lopez, 2007; de Castro *et al.*, 2019), esta metodología se ha modificado para realizar pruebas directamente con metabolitos secundarios (extraíbles) y evaluar el crecimiento/inhibición del micelio del hongo (Velásquez *et al.*, 2006; Vega-Ceja *et al.*, 2022; Vovchuk *et al.*, 2024) (Figura 8).

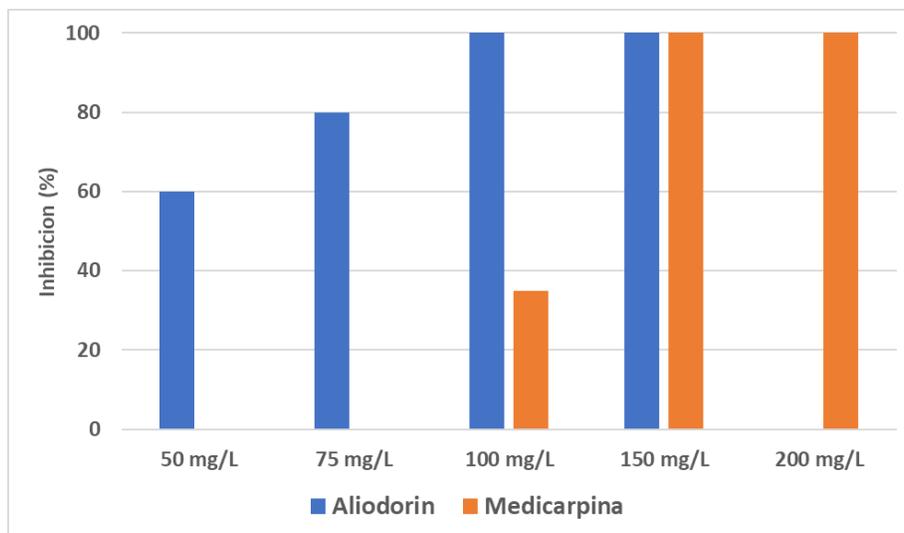


**Figura 8. Pruebas de inhibición mediante el método de difusión en placa: (a) crecimiento de control del hongo *T. versicolor*; (b) prueba de inhibición a una concentración de 75 mg/L (80 % de inhibición).**

Fuente: Elaboración propia.

Las concentraciones utilizadas se basaron en estudios anteriores con la medicarpina

(Martínez-Sotres *et al.*, 2012), pero se eligieron niveles menores debido a que los resultados del docking indicaron una mayor efectividad del alliodorin. Así, los ensayos se realizaron con concentraciones de 50, 75, 100 y 150 mg/L. Los resultados mostraron una completa inhibición del hongo en las concentraciones de 100 y 150 mg/L, mientras que a 75 mg/L la actividad inhibitoria se redujo a un 80% sobre el micelio del hongo *T. versicolor* (Figura 9).



**Figura 9. Actividad inhibitoria (%) del alliodorin y la reportada para la medicarpina (Martínez-Sotres *et al.*, 2012).**

Fuente: Elaboración propia, visualizada con Excel

## Conclusiones

Esta investigación analizó el efecto inhibitorio del alliodorin, un compuesto aislado de *Cordia alliodora*, sobre la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor*. La metodología principal del estudio se centró en el uso del acoplamiento molecular para predecir y comprender esta actividad inhibitoria.

El acoplamiento molecular se empleó con éxito para predecir la interacción entre el alliodorin y la lacasa. Este enfoque *in silico* permitió identificar tres sitios principales de unión para el alliodorin en la enzima lacasa: el sitio T1, el canal de oxígeno y un sitio cercano al cúmulo de cobre trinuclear (TNC).

Los resultados del acoplamiento sugieren un mecanismo de inhibición donde el alliodorin interactúa con residuos de aminoácidos clave que rodean los iones de Cu en estos sitios de unión, interfiriendo así con las reacciones redox de la enzima y la unión del sustrato. Esto concuerda con la literatura existente sobre los mecanismos de inhibición de la lacasa, donde el bloqueo del sitio T1 o del canal de oxígeno puede inactivar la enzima. Es importante destacar que los resultados *in silico* del estudio sugieren que el alliodorin podría ser un inhibidor más eficaz que la medicarpina, un inhibidor de la lacasa previamente estudiado.

Los ensayos antifúngicos *in vitro* utilizando el método de difusión en placa confirmaron la actividad inhibitoria del alliodorin contra *T. versicolor*. Los resultados experimentales respaldan las predicciones *in silico*, demostrando que el alliodorin inhibe eficazmente el crecimiento de *T. versicolor* a ciertas concentraciones. La identificación de las ubicaciones precisas donde el alliodorin interactúa con la lacasa fue un logro significativo, ya que contribuye a una mejor comprensión del mecanismo de acción. Los datos del acoplamiento permitieron proponer el mecanismo de inhibición, sugiriendo que la interacción del alliodorin con sitios específicos interrumpe la función de la lacasa. Además, los resultados *in silico* orientaron la elección de las concentraciones utilizadas en los ensayos antifúngicos *in vitro*.

En resumen, este estudio integró con éxito el acoplamiento molecular *in silico* con experimentos *in vitro* para dilucidar el mecanismo inhibitorio del alliodorin contra la lacasa de *T. versicolor*. Los hallazgos destacan el valor del acoplamiento molecular como una herramienta valiosa en el descubrimiento de fármacos y el potencial del alliodorin como agente antifúngico natural. Investigaciones futuras podrían centrarse en refinar los parámetros de acoplamiento, explorar otras cepas de *T. versicolor* e investigar el potencial del alliodorin en aplicaciones del mundo real.

## Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, F.G.M-P., S.J.G-M., R.H-B.; escritura y preparación del manuscrito, F.V-M., F.G.M-P., S.J.G-M., R.H-B.; redacción, revisión y edición, F.V-M., F.G.M-P., S.J.G-M., A.Z-O., R.H-B; Visualización, F.V-M., F.G.M-P. and S.J.G-M.; Administración de proyecto, F.G.M-P. and R.H-B.; Supervisión, A.Z-O., F.G.M-P. and R.H-B.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

## Financiamiento

Esta investigación no recibió financiamiento externo

## Agradecimientos

Fredy Geovannini Morales-Palacios, agradece al CONACHyT por su beca postdoctoral. Francisco Villanueva-Mejía agradece al Centro Nacional de Supércomputo del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica los recursos computacionales para realizar esta investigación, bajo el número TKII-E-0524-I-230524-42/PR-62.

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés

## Referencias

- Archibald, F. S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M. G., & Reid, I. D. (1997). Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *In Journal of Biotechnology*, 53 (2-3), 215-236. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01675-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01675-1)
- American Society for Testing and Materials [ASTM] . (1994). 81, Standard Test Method for Accelerated Laboratory Test of Natural Decay Resistance of Woods, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 04.09. Philadelphia: American Society for Testing and Materials-ASTM, 324–328.
- Augustine, A. J., Kragh, M. E., Sarangi, R., Fujii, S., Liboiron, B. D., Stoj, C. S., Kosman, D. J., Hodgson, K. O., Hedman, B., & Solomon, E. I. (2008). Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* laccase: Allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites. *Biochemistry*, 47(7), 2036–2045. <https://doi.org/10.1021/bi7020052>
- Bari, E., Nazarnezhad, N., Kazemi, S. M., Tajick Ghanbary, M. A., Mohebby, B., Schmidt, O., & Clausen, C. A. (2015). Comparison between degradation capabilities of the white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in beech wood. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.033>
- Chiranjeevi, P. V., Rajasekara, M., & Sathish, T. (2014). Enhancement of Laccase Production from *Pleurotus ostreatus* PVC-RSP-7 by altering the Nutritional Conditions using Response Surface Methodology. *In BioResources*, 9(3), 4212-4225. <https://doi.org/10.15376/biores.9.3.4212-4225>
- de Castro, V. R., de Castro Freitas, M. P., Zanuncio, A. J. V., Zanuncio, J. C., Surdi, P. G., Carneiro, A. de C. O., & Vital, B. R. (2019). Resistance of in natura and torrefied wood chips to xylophage fungi. *Scientific Reports*, 9(1), 11068. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47398-9>
- El-Hachem, N., Haibe-Kains, B., Khalil, A., Kobeissy, F. H., & Nemer, G. (2017). AutoDock and AutoDockTools for protein-ligand docking: beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) as a case study. *Neuroproteomics: Methods and Protocols*, 391-403. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6952-4\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6952-4_20)
- Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *In Molecules*, 20(7), 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G. A., & Nakatsuji, H. (2016). Gaussian 16, revision a. 03, gaussian, inc., wallingford ct. Gaussian16 (Revision A. 03).

- García, M., L., B., De Pascual-Teresa, M., & Fernández, B. (2004). Estudio teórico del modo de unión entre CDK2 y butirolactona I \*. Buy RoboPDF. In An. R Acad. Nac. Farm, 70. Artículo Original. [www.robopdf.com](http://www.robopdf.com)
- Gochev, V. K., & Krastanov, A. I. (2007). Fungal Laccases (Review). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13, 75-83
- Götze, J. P., & Bühl, M. (2016). Laccase Redox Potentials: PH Dependence and Mutants, a QM/MM Study. *Journal of Physical Chemistry B*, 120(35), 9265–9276. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.6b04978>
- Guevara-Martínez, S. J., Villanueva-Mejía, F., Zamudio-Ojeda, A., Herrera-Bucio, R., & Morales-Palacios, F. G. (2024). Isolation of the Antifungal Compound Alliodorin from the Heartwood of *Cordia elaeagnoides* A. DC. and the In Silico Analysis of the Laccase. *Plants*, 13(10), 1294. <https://doi.org/10.3390/plants13101294>
- Heldin, C.-H., Lu, B., Evans, R., & Gutkind, J. S. (2016). Signals and receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4), a005900. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005900>
- Honarparvar, B., Govender, T., Maguire, G. E. M., Soliman, M. E. S., & Kruger, H. G. (2014). Integrated approach to structure-based enzymatic drug design: Molecular modeling, spectroscopy, and experimental bioactivity. In *Chemical Reviews*, 114(1), 493–537. <https://doi.org/10.1021/cr300314q>
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 966. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
- Johannes, C., & Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. In *Journal of Biotechnology*, 78(2), 193-199. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00208-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00208-X)
- Macalino, S. J. Y., Basith, S., Clavio, N. A. B., Chang, H., Kang, S., & Choi, S. (2018). Evolution of in silico strategies for protein-protein interaction drug discovery. In *Molecules*, 23(8), 1963. <https://doi.org/10.3390/molecules23081963>
- Madhavi, V., & Lele, S. S. (2009). Laccase: properties and applications. *BioResources*, 4(4). <https://doi.org/10.15376/biores.4.4.1694-1717>
- Manners, G. D. (1983). The hydroquinone terpenoids of *Cordia elaeagnoides*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1, 39–43.
- Martínez-Sotres, C., López-Albarrán, P., Cruz-de-León, J., García-Moreno, T., Rutiaga-Quiñones, J. G., Vázquez-Marrufo, G., Tamariz-Mascarúa, J., & Herrera-Bucio, R. (2012). Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 69, 38–40. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.11.016>
- Martínez-Sotres, C., Rutiaga-Quiñones, J. G., Herrera-Bucio, R., Gallo, M., & López-Albarrán, P. (2015). Molecular docking insights into the inhibition of laccase activity by medicarpin. *Wood Science and Technology*, 49(4), 857–868.
- Mielnichuk, N., & Lopez, S. E. (2007). Interaction between *Epicoccum purpurascens* and xylophagous basidiomycetes on wood blocks. *Forest Pathology*, 37(4), 236–242. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00496.x>
- Mohan, V., Gibbs, A. C., Cummings, M. D., Jaeger, E. P., & Desjarlais, R. L. (2005). Docking: Successes and Challenges. In *Current Pharmaceutical Design*, 11. <https://doi.org/10.1080/13816820500042888>

- [org/10.2174/1381612053382106](https://doi.org/10.2174/1381612053382106)
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Pardo, I., & Camarero, S. (2015). Laccase engineering by rational and evolutionary design. *In Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 897–910. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1824-8>
- Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37663–37669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204571200>
- Reynaldi, M. A., Faradilla, A., Sari, R., Riza, H., & Najini, R. (2024). Comparative Analysis of the Autodock 4.2 and Autodock Vina Methods in Predicting Thiazolidinedione Interactions with PPARG Receptor. *Ad-Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1). <https://doi.org/10.24252/djps.v7i1.47852>
- Roy, J. D. (2022). In silico study of bioremediation property of microbial laccase enzymes 3CG8 and 1GYC. *Journal of Applied and Fundamental Sciences*, 8(1), 13-38.
- Rutiaga-Quiñones, J. G. (2001). Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. Buchverl. Gräffelfing.
- Singh, D., & Gupta, N. (2020). Microbial Laccase: a robust enzyme and its industrial applications. *Biologia*, 75(8), 1183-1193. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00414-9>
- Sun, X. B., Yang, Z. H., Jin, D. J., Qiu, Y. G., & Gu, W. (2023). Design, synthesis and antifungal evaluation of novel nopol derivatives as potent laccase inhibitors. *Pest Management Science*, 79(7), 2469-2481. <https://doi.org/10.1002/ps.7426>
- Strong, P. J., & Claus, H. (2011). Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *In Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(4), 373–434. <https://doi.org/10.1080/10643380902945706>
- Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Šelo, G., Tolj, I., Šperanda, M., Bucić-Kojić, A., & Planinić, M. (2021). *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. *In Bioresource Technology*, 330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124997>
- Vega-Ceja, J. E., Jiménez-Amezcu, R. M., Anzaldo-Hernández, J., Silva-Guzmán, J. A., Torres-Rendón, J. G., Lomelí-Ramírez, M. G., & García-Enriquez, S. (2022). Antifungal Activity of *Datura stramonium* L. Extractives against Xylophagous Fungi. *Forests*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/f13081222>
- Velásquez, J., Toro, M. E., Rojas, L., & Encinas, O. (2006). Actividad antifúngica in vitro de los extractivos naturales de especies latifoliadas de la Guayana Venezolana. *Madera y Bosques*, 12(1), 51–61. <https://doi.org/10.21829/myb.2006.1211250>
- Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J., & Vivas-Reyes, R. (2013). Método acoplado

- Autodock-PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Revista Colombiana de Química*, 42(1), 101–124.
- Vovchuk, C. S., González Garelo, T., Careaga, V. P., & Fazio, A. T. (2024). Promising Antifungal Activity of *Cedrela fissilis* Wood Extractives as Natural Biocides against Xylophagous Fungi for Wood Artwork of Cultural Heritage. *Coatings*, 14(2), 237. <https://doi.org/10.3390/coatings14020237>
- Warshel, A. (2014). Multiscale modeling of biological functions: From enzymes to molecular machines (nobel lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(38), 10020–10031. <https://doi.org/10.1002/anie.201403689>
- Xu, F. (1996). Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition. *Biochemistry*, 35(23), 7608-7614. <https://doi.org/10.1021/bi952971a>