



**METABOLISMO DE LA FORMAMIDA  
Y SU RELACIÓN CON ENZIMAS DE *Bacillus thuringiensis***

**JOULIN TATIANA GÜIZA CONTRERAS**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ**

2021



**METABOLISMO DE LA FORMAMIDA  
Y SU RELACIÓN CON ENZIMAS DE *Bacillus thuringiensis***

**JOULIN TATIANA GÜIZA CONTRERAS**

**SANDRA MÓNICA ESTUPIÑÁN TORRES  
ORIENTADOR INTERNO**

**SILVIO ALEJANDRO LÓPEZ PAZOS  
ASESOR EXTERNO  
UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ**

2021



**METABOLISMO DE LA FORMAMIDA  
Y SU RELACIÓN CON ENZIMAS DE *Bacillus thuringiensis***

**NOTA:** \_\_\_\_\_

**JURADOS:**

---

---

**ASESORES:**

**SANDRA MONICA ESTUPIÑAN TORRES**

**SLIVIO ALEJANDRO LOPEZ PAZOS**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ**

**2021**

**DEDICATORIA**

*Dedico el presente trabajo de grado a mis padres, hermano y familia*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco inmensamente a mis padres y hermano por brindarme todo su amor y enorgullecerse de mí y de lo que he logrado, y por ellos seguiré dando lo mejor de mí

También quiero agradecer a mis maestros por brindarme todo su conocimiento y formarme como futura bacterióloga, especialmente quiero agradecer a mis asesores de trabajo de grado ya que sin ellos esto no sería posible.

Al profesor Silvio Alejandro López le agradezco sus enseñanzas, su incondicional guía y su paciencia durante la realización de este proyecto

A la profesora Sandra Mónica le agradezco por siempre estar dispuesta a brindarme su apoyo y ayuda y admiro su gran calidad humana

Muchas gracias a todos.





## TABLA DE CONTENIDO

<b>Resumen:</b>	9
<b>INTRODUCCION</b>	11
<b>OBJETIVOS</b>	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
<b>1. ANTECEDENTES</b>	14
<b>2. MARCO REFERENCIAL</b>	25
La formamida: generalidades	25
La formamida y el origen de la vida	26
<i>Bacillus thuringiensis</i>	34
<b>3. DISEÑO METODOLOGÍCO</b>	36
3.1 Tipo de investigación	36
<b>3.1.2 Población</b>	36
<b>3.1.3 Muestra</b>	36
3.2.1 Hipótesis	36
<b>3.2.2 Variables</b>	36
<b>3.2.3 Indicadores</b>	37
3.3 Técnicas y procedimientos	37
<b>4. RESULTADOS</b>	38
<b>5. DISCUSION</b>	44
<b>6. CONCLUSIÓN</b>	48
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	49

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Se muestra la recreación de la sopa primitiva realizada por Miller y Urey, esto tomando en cuenta que se imitaron las condiciones de la tierra primitiva. Se obtuvieron biomoléculas sencillas, aminoácidos y otros compuestos	24
<b>Figura 2.</b> Ruta metabólica propuesta por Sponer, et al. A partir de la formamida y mostrando como resultado la formación de purinas (17).	25
<b>Figura 3.</b> Ruta metabólica propuesta por Wang et al. A partir de la formamida y denotando la importancia del anillo de imidazol de 5 carbonos (24)	26
<b>Figura 4.</b> Según el estudio de Saladino et al. La formamida estaría implicada en el metabolismo de azúcares, aminoácidos, ácido carboxílico y bases nitrogenadas entre otros compuestos de importancia para el origen de la vida (4)	28
<b>Figura 5.</b> Años de publicación de los artículos usados para este proyecto	34
<b>Figura 6.</b> Revistas a partir de las que se tomaron los artículos para revisar bibliográfica	35
<b>Figura 7.</b> Artículos publicados por tema	36
<b>Figura 8.</b> Proteína modelada resultante de la alineación de Urea Carboxilasa y el cromosoma Bt. HD-1	39
<b>Figura 9.</b> Proteína modelada resultante de la alineación de Formamida amido-hidrolasa con el cromosoma de Bt. HD-1	39
<b>Figura 10.</b> Proteína modelada resultante de la alineación de Formamida deformilasa con cromosoma de Bt HD-1	40

## INDICE DE TABLAS

1. Generalidades bioquímicas de la formamida
2. Listado de enzimas degradadoras de la formamida
3. Listado de enzimas alineadas con secuencia del cromosoma de *Bacillus thuringiensis kurstaki*  
HD-1



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**METABOLISMO DE LA FORMAMIDA**  
**Y SU RELACIÓN CON ENZIMAS DE *Bacillus thuringiensis***

**Resumen**

Este proyecto pretende establecer los orígenes y metabolismo de la formamida, un compuesto químico derivado del ácido fórmico usado en la industria para la fabricación de plaguicidas, ya que actualmente representa un riesgo para el medio ambiente debido a su prolongada presencia en el suelo y un tiempo de degradación lento, lo que la hace un compuesto de importancia en áreas de la ciencia como la biorremediación. La formamida ha sido uno de los ingredientes de los pesticidas durante años e incluso a aquellos pesticidas que incluían la formamida en su formulación se les clasifica en un grupo diferenciado de otros plaguicidas químicos (Plaguicidas a base de Formamidinas) (1). La revisión literaria y el uso de herramientas bioinformáticas permitirán comprender las vías de síntesis y degradación de la misma y conocer el origen primigenio de la formamida y su papel en el origen de la vida, teniendo en cuenta los resultados obtenidos se buscará en el genoma de *Bacillus thuringiensis* un microorganismo ampliamente usado en la creación de biopesticidas; enzimas genética o funcionalmente similares que actúen en procesos de catálisis de la formamida, puesto que se quiere explorar el potencial de este microorganismo en técnicas de biorremediación para eliminar los residuos de formamida dejados por los plaguicidas químicos utilizados en los cultivos. Cabe destacar que *Bt* ya ha sido

utilizado en la degradación de diferentes compuestos entre ellos los metales pesados y otros ingredientes utilizados en los pesticidas químicos (2).

Palabras clave: Formamidas, *Bacillus thuringiensis*, degradación, biorremediación, bioinformática

Estudiante: Joulin Tatiana Guiza Contreras

Docentes:

Sandra Mónica Estupiñan Torres- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Silvio Alejandro López Pazos- Universidad Antonio Nariño

Fecha: septiembre 3 de 2021

## INTRODUCCION

Durante años, los científicos han estudiado el origen de la vida ansiando saber cuál fue la sustancia precursora que dio origen desde organismos simples como las arqueas, hasta organismos tan complejos como lo es el ser humano. Con los continuos avances en investigación, se ha llegado a pensar que la formamida probablemente sea ese compuesto que dio origen al ARN y ADN (3), ya que diversos ensayos científicos han demostrados que cuando la formamida es expuesta a determinadas condiciones (temperatura, medio externo, presencia de agua, etc.) puede dar origen nucleosidos y posteriormente a nucleótidos que son componentes fundamentales para la síntesis de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Por otro lado, como es sabido, los elementos que conforman a la formamida ( $\text{CH}_3\text{NO}$ ) son los más abundantes sobre la tierra y fuera de ella (4), hecho que da más fuerza a la hipótesis de que esta sustancia es precursora de vida.

Los ensayos científicos realizados en años anteriores y que han tenido como eje central la acción de enzimas provenientes de diferentes microorganismos sobre la formamida, han logrado desvelar las rutas metabólicas que llevan a la degradación y/o síntesis de esta sustancia química en las que se encuentran implicadas enzimas como la formamida amido-hidrolasa presente en *Bacillus subtilis* cuya actividad biodegradante divide a la formamida en formato y  $\text{NH}_3$  (5); o la urea carboxilasa de *Oleomonas saraganensis* que ayuda a la utilización de la formamida como fuente de nitrógeno para la bacteria (6), así como estas se han descubierto diversas enzimas de importancia en el metabolismo de la formamida, lo que permite conocer los procesos de su metabolismo y ayuda a la comunidad científica a tener bases en el camino hacia los procesos de degradación de compuestos como la formamida.

En este proyecto se ha decidido utilizar el microorganismo *Bacillus thuringiensis* ya que es una bacteria cuyas propiedades como bioplaguicida han sido ampliamente estudiadas y cuyas enzimas y/o proteínas podrían utilizarse con el objetivo expuesto. En los últimos años ha sido estudiada una amplia gama de microorganismos del suelo con el fin de evaluar sus propiedades y su posible actuación como agentes de biorremediación frente a los pesticidas utilizados en campos agrícolas (1), *B. thuringiensis* un bacilo Gram positivo que cuyas proteínas son de gran importancia medio ambiental no solo como una bacteria capaz de biodegradar sustancias contaminantes sino también como un “bioestimulante para mejorar y mantener las poblaciones microbianas y sus actividades enzimática” (7).

Actualmente la agroindustria se encuentra a la expectativa de productos innovadores que sean amigables con el ambiente y de fácil degradación ya que esto podría ayudar a aminorar el daño hecho por productos químicos a la madre tierra dejados años atrás, si bien no se han llegado a utilizar los biopesticidas en un 100% en los campos de cultivo, el público consumidor se ha mostrado optimista y dispuesto a poner en uso estas alternativas a los plaguicidas convencionales, ya que según cifras dadas en el año 2017 este mercado tenía un incremento anual del 16% representando el 8% del comercio de plaguicidas y siendo *Bt* el mayor exponente (2)

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar enzimas primigenias del metabolismo de la formamida y su relación con *Bacillus thuringiensis*

### **Objetivos específicos**

- Revisar literatura sobre el origen primigenio del metabolismo de la formamida
- Determinar las enzimas relacionadas con el metabolismo de la formamida
- Identificar enzimas relacionadas con el metabolismo de la formamida en *Bacillus thuringiensis*





## 1. ANTECEDENTES

La formamida es un compuesto químico de clase amida que deriva del ácido fórmico, se utiliza en una amplia variedad de procesos industriales y debido a esto ha llegado a ser un creciente problema medio ambiental, ya que puede estar presente durante largos periodos de tiempo en aguas residuales representando un riesgo para la salud humana. Es por ello que es fundamental entender el metabolismo de la formamida, para comprender sus propiedades biológicas y saber cómo contrarrestar la contaminación causada por esta sustancia. Actualmente se pretende utilizar microorganismos como *Bacillus sp.* entre otros y/o sus enzimas como posibles agentes degradantes de la formamida con el fin de evitar así el aumento de la contaminación causada por esta sustancia química; esto basado en que, según el estudio de Watson, el género *Bacillus* posee enzimas capaces de degradar la formamida mediante procesos oxidativos (2).

La formamida también conocida como metanamida “abarca un grupo de insecticidas, acaricidas y fungicidas, que han sido ampliamente utilizados desde mediados de los años 50 en los campos agrícolas, ya que son eficientes a la hora de eliminar las plagas (1). A la par de su uso, se comenzó a estudiar las posibilidades de que diversos microorganismos, en especial bacterias, pudieran asimilar y así eliminar del medio los residuos de formamida que quedarán en los suelos de cultivo, es así como en 1977, se comenzó a observar el metabolismo de bacterias que pudieran utilizar la formamida como fuente de carbono y/o energía entre ellas *Thiobacillus novellus*, un bacilo Gram negativo no esporulado, caracterizado por crecer en una amplia gama de medios con variados sustratos, versátil y fácilmente adaptable, según Chandra (8), *T. novellus* también utiliza productos intermedios de la formamida como fuente de carbono.

Una de las principales preocupaciones en el ámbito ambiental sobre el uso de la formamida además de su lenta degradación es el efecto nocivo que puede tener sobre diferentes especies del reino animal, esto basado en el estudio de Hollingworth (9), quien formula la hipótesis de que la formamida puede actuar de forma más rápida gracias a la inhibición de la monoamina-oxidasa ya que tendría un efecto más letal sobre los animales de prueba (roedores) y se comprobó afecta el

sistema neuromuscular de estos. Pese que a que la hipótesis fue incorrecta ya que las monoamina-oxidasas no tienen efecto alguno sobre el efecto dañino de la formamida si está demostrado que en concentraciones altas  $\text{CH}_3\text{NO}$  puede ser mortal

Las formamidinas son sustancias producto de la reacción de la formamida con otros sustratos, “son un grupo estructuralmente novedoso de pesticidas de creciente importancia en el control de ácaros, garrapatas del ganado y ciertos órdenes de insectos que se han vuelto resistentes a los acaricidas e insecticidas convencionales” (10) además de ser utilizados en otros escenarios como la industria farmacéutica y la biología molecular, estos productos suman según Gescher (11) una utilización anual de  $2 \times 10^5$  toneladas alrededor del mundo, esto tomando en cuenta que este era el uso estimado para el año 1993, actualmente se buscan alternativas enfocadas hacia la biorremediación que logren minimizar el impacto contaminante de la formamida y que sean amigables con el medio ambiente.

Estudios realizados en las últimas décadas han permitido desvelar parte de la ruta metabólica de la formamida en diferentes microorganismos cada uno con enzimas únicas que le permiten utilizar la formamida como fuente de nitrógeno, carbono o energía, esto dependiendo de las condiciones de crecimiento a las que se someten los microorganismos estudiados (oxígeno, pH, sustrato, temperatura, etc.) y haciendo un análisis minucioso de los resultados que permita conocer la cantidad de biomasa obtenida, la curva de crecimiento bacteriana y la ruta metabólica de la formamida en cada microorganismo. Por ejemplo, *Helicobacter pylori*, bacteria conocida por su capacidad para sobrevivir en ácido gástrico debido a su enzima ureasa ha demostrado poseer una formamida-amidasa que se encarga de hidrolizar otras amidasa y obtener como producto amoniaco ( $\text{NH}_3$ ), según Skouloubris (12) esta amidasa fue fruto de la evolución que dio como resultado una enzima especializada.

Las proteobacterias son uno de los principales filos de bacterias que comprenden un amplio abanico de patógenos y bacterias de vida libre, muchas de las cuales tienen un papel protagonista en la fijación del nitrógeno. Una de ellas *Oleomonas saraganensis*, es una bacteria

Gram-negativa aislada por primera vez en Japón, perteneciente a la subclase  $\alpha$  de las proteo bacterias posee una enzima urea carboxilasa (urea amidolasa) que según Kanamori (6) estaría involucrada en la asimilación de la formamida como fuente de nitrógeno por medio de una vía ATP dependiente. Por otro lado, *Ochrobactrum sp.* También posee enzimas capaces de utilizar la Dimetilformamida (DMF) como fuente de carbono y nitrógeno, la capacidad de degradación de este microorganismo ha sido puesta a prueba pues según Veeranagouda (13) se obtuvo un 95% de efectividad con DMF diluido 0.5% v/v, esto debido a que los intermedios catabólicos pueden mostrar sensibilidad al pH alcalino debido al amoniaco generado en el medio.

Desde un inicio la vida en la tierra ha sido una constante evolución esto tomando en cuenta el modelo darwiniano que implica que todos los seres vivos poseen un origen común, en esta área centro su estudio Constanzo et al. (14), pues según su estudio el origen de los ácidos nucleicos viene de un largo proceso de evolución que postula a la formamida como la probable sustancia que dio origen a la vida, es importante tener en cuenta que a partir de esta hipótesis se formularon las posibles rutas incluyendo una ruta acuosa y no acuosa que ha sido objeto de estudio. Además de las bacterias también las arqueas han sido estudiadas en la búsqueda por comprender el metabolismo de la formamida una de las arqueas en estudio fue *Methanocaldococcus jannaschii* caracterizada por ser metanogénica y termofílica que dispone de una formamida-hidrolasa dependiente de hierro que estaría “involucrada en el segundo paso de la biosíntesis de riboflavina” (15), y según Grochowski tendría regiones de histidina, glutamato y aspartato que servirían como ligandos de unión a metales como hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc (Zn), siendo la unión al hierro la más importante para realizar su actividad metabólica de hidrólisis para generar amoniaco (NH<sub>3</sub>) y CO<sub>2</sub>). (15)

DMF es utilizado como fuente de energía y nitrógeno por muchos microorganismos pero no todos ellos pueden catalizar DMF en grandes concentraciones lo que implica una baja eficiencia en cuanto a la degradación por parte de los microorganismos teniendo en cuenta las condiciones del medio y las concentraciones de DMF ensayadas, uno de los microorganismos que ha logrado catalizar altas concentraciones de esta sustancia es *Paracoccus sp.*, cocobacilo Gram-negativo

capaz de llevar a cabo procesos de desnitrificación y crecer en presencia o ausencia de  $O_2$ , según Swaroop (16) *Paracoccus* logró un crecimiento significativo en presencia de DMF a una concentración de 15.000 mg/L, utilizando tanto DMF como sus productos intermedios de degradación hasta llegar a  $NH_3$  y  $CO_2$  en 24 horas aproximadamente. Siendo una de las bacterias más eficaces contra la contaminación causada por el uso industrial de la formamida.

Por otro lado, se ha estudiado ampliamente el papel de la formamida como posible precursor de la vida primitiva, ya que en su fórmula podemos encontrar cuatro de los elementos más abundantes en el universo. N, C, H, O; esto sumado a que la formamida permite trabajar a altas temperaturas, es un excelente medio para una reacción no acuosa; son estas propiedades las que han dado lugar a la teoría que sugiere que “la formamida está involucrada en la síntesis de pirimidinas y formación de anillos de las purinas” (17). Esta teoría ha sido puesta a prueba en diversos ensayos científicos que buscan desvelar cuál fue la molécula precursora de la vida en la tierra que estaría involucrada en la generación espontánea del ARN llegando a realizar pruebas con posibles moléculas precursoras, se demostró según Saladino et al. (3) que al someter la formamida a altas temperaturas en presencia de catalizadores se da la generación de bases nucleicas, ácidos carboxílicos y aminoácidos.

Esto ha llevado al planteamiento de la pregunta ¿qué fue primero la genética o el metabolismo?, frente a esta incógnita se establece que “genética y metabolismo son ambos construidos alrededor de la química de los elementos más comunes del universo” (4), tomando en cuenta la anterior afirmación se sugiere la existencia de un precursor común implicado en el origen de la genética y el metabolismo según Saladino (3) la formamida habría proporcionado los componentes principales para la aparición del metabolismo ya que cumpliría con las condiciones para ser un precursor químico ideal (Distribución amplia por el universo, bajo peso molecular y composición elemental).

Para observar más a fondo la intervención de la formamida en la generación del ARN se estudia la ruta metabólica que habría dado lugar a las pirimidinas y purinas partiendo de la formamida que estaría dada por los siguientes pasos para esta última: “formilacion, deshidratación,

reducción de Leuckart, cierre del anillo de 5 y 6 miembros y desaminación” (18), Durante dichos pasos se tendrán ciertas condiciones controladas en ensayos in vitro que proporcionen el microambiente ideal para la generación de purinas y pirimidinas y como producto final cadenas simples de ARN, esto con el fin de demostrar la importancia de la formamida en los procesos que dieron origen a la vida. Como se dijo anteriormente la formamida puede reaccionar en soluciones no acuosas, pero ¿cómo actúa la formamida en presencia del agua?, respecto a esta pregunta es importante resaltar que la barrera energética de una sustancia juega un papel importante durante las reacciones a las que sea sometida, por lo que no es recomendable someter la formamida en soluciones acuosas ya que según Nguyen (19) la barrera energética de la formamida disminuye en presencia de moléculas de agua.

*Bacillus thuringiensis*, bacilo Gram positivo ha sido ampliamente utilizado para el control de plagas, si bien es cierto que no es el único agente microbiano utilizado como control de plagas si se ha convertido en el más usado, pero esto también ha dado pie a la generación de resistencias por parte de las especies contra las que normalmente actúa y dado que son muchas las propiedades de esta bacteria, no todas ellas están descritas es por ello que Portela-Dussan, et al (20), en su artículo propone la utilización de la biotecnología en conjunto con las propiedades de *Bt*. Para afrontar esta problemática. Por otro lado, la biotecnología y los avances de la ciencia han permitido explorar más las características de *Bt*. Encontrando así otros usos para este maravilloso microorganismo es así como lo propone De la Fuente, et al. (21) En su revisión ya que en el listado de usos del bacilo Gram positivo se encuentran: Producción de bacteriocinas de las cuales las más usadas han sido Thuricin CD y Thuricin H que son utilizadas con fines de seguridad alimentaria en el mundo.

La síntesis prebiótica es una hipótesis que afirma que la vida en la tierra se generó de forma espontánea gracias a las particulares condiciones dadas en el medio hace miles de millones de años, es debido a esto que la teoría que sugiere que la formamida pudo ser un precursor prebiótico ha tomado fuerza pues se ha encontrado esta sustancia en satélites, planetas y meteoritos. No solo es importante la formamida sino también los productos derivados de

reacciones con otros catalizadores, en un estudio realizado por Nguyen se dijo: “Las fragmentaciones foto inducidas de la formamida han atraído un gran interés en parte debido al hecho productos de bajo peso molecular de degradaciones parciales de formamida como: CO, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub> y HNCO son intermedios obvios de la síntesis prebiótica” (22) “Teniendo en cuenta los productos de la degradación de la formamida las enzimas que actúan en estos procesos se toman como punto de partida para innovar en estrategias de biorremediación ya que es uno de los componentes de los pesticidas que son uno de los orgánicos persistentes contaminantes que son motivo de preocupación debido a su aparición” (7).

Por otro lado se debe resaltar que la formamida no solo actúa como reactivo o componente en una reacción o elaboración de un producto sino también a partir de ella y su estudio se han descubierto enzimas, una de ellas la N- bencilformamida, que se caracteriza según Hashimoto (23) por ser producto de una reacción inversa entre la bencilamina y el formiato, uno de ellos derivado de la formamida. La enzima N- bencilformamida o formamida deformilasa hace parte de una gran familia de amino-hidrolasas y deformilasas inversas de las que no se habían informado hasta el 2013, por lo que su estudio más en profundidad brindaría más información acerca del metabolismo de la formamida y esto a su vez podría ser usado en las estrategias de biorremediación ambiental.

Como es bien sabido y evidenciado la formamida está involucrada en la síntesis de ácidos nucleicos, se ha puesto especial interés en la adenina, una de las cinco bases nitrogenadas representada por la letra “A” y un componente fundamental de la adenosina trifosfato (ATP), está compuesta por un anillo 5-aminoimidazol y una purina en la que un hidrógeno se ha sustituido por un grupo amino (NH<sub>2</sub>), según Wang (24) la adenina habría sido producto de la evolución de la pirimidinas, lo que sugiere que las purinas han sido fruto de un largo proceso evolutivo que dio origen al código genético. Pero no solo se ha demostrado la generación de la adenina a partir de la formamida sino también la generación de las cuatro bases nitrogenadas restantes que componen ADN y ARN (timina, citosina, guanina y uracilo) esto tomando en cuenta que según Ferus (25) la formamida es puesta en el medio con diferentes catalizadores y variadas

condiciones entre ellas radiación UV, calentamiento a altas temperaturas e irradiación de luz solar, entre otros).

Además de ser un componente esencial para la creación del ADN y ARN, la formamida también es una importante fuente de nitrógeno para los microorganismos cuyos medio se caracterizan por bajas concentraciones de nitrógeno, es aquí cuando la evolución bacteriana y la adaptación juegan un rol relevante en la supervivencia, pues es así el caso de la *Arthrospira sp.*, una cianobacteria que es comúnmente encontrada en lagos, que según el estudio de Deschoenmaeker, es un microorganismo que cambia sus procesos de absorción de nitrógeno dependiendo de la ausencia o presencia de este, permitiéndose así asimilar otras sustancias como la formamida para compensar la falta del nitrógeno en el medio, esta investigación permitió llegar a la conclusión de que en ausencia de oxígeno *Arthrospira* aumento la síntesis y acumulación del glucógeno, que favorecería la reprogramación celular durante el agotamiento (26). Demostrando que estos microorganismos se adaptan al medio y a la privación de nutrientes de importancia para su crecimiento.

*B. thuringiensis*, en palabras de Alameida (27) “es un microorganismo que cobro impulso con el fin de combatir invertebrados de interés humano con la creciente demanda de alimentos libres de pesticidas químicos y con la implementación de métodos menos dañinos para el medio ambiente”, pues gracias a su especificidad ha logrado combatir sin excepción a los géneros de insectos coleóptera y díptera, esto dado que sus toxinas Cry se han caracterizado por ser proteínas de alta especificidad y letalidad como lo explica Deist et al, en su estudio donde detalla la selectividad de estas reconocidas toxinas ya modificadas sobre especies como *Pectinophora gossypiella*, *Manduca sexta* y *Spodoptera exigua* entre otros insectos y dando también a conocer el lugar exacto de la modificación de la toxina que permite su accionar sobre el insecto (28).

Así como se van modificando las estructuras de las proteínas Cry también se van mejorando las falencias que impiden una óptima eficacia del producto, una de ellas la inestabilidad de la toxina



frente a la luz UV, por lo que se han venido utilizando diversos materiales que la protejan, uno de ellos la melanina ya que esta absorbe la radiación y según Sansinenea et al. (29) ayudaría a mejora de la actividad en campo y sería de fácil manipulación y producción, Por otro lado es también posible que las mismas toxinas logren evolucionar haciéndose más resistentes, esto teniendo en cuenta que “por su codificación genética, esta bacteria se ve afectada por fuertes presiones evolutivas y selectivas que conducen a una expansión de la gama de productos que puede ofrecer” (30).

La síntesis prebiótica depende de variables específicas que permitirán o no que se la reacción entre dos reactivos, entre ellas las barreras de energía, la presencia o ausencia de H<sub>2</sub>O creando un producto completamente nuevo y estable que pueda a su vez reaccionar con otras sustancias que se encuentren en este medio, por años y bajo diferentes condiciones se ha estudiado las reacciones de la formamida y sus productos intermedios tales como: CO, H<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> como productos principales, incluido el formaldehído, H<sub>2</sub>CO, que es un precursor de azúcares y ácido fórmico, HCOOH, un precursor de lípidos (31), por lo que se deduce que no es solo importante el papel de la formamida como reactivo sino como generador de productos que a su vez juegan un papel relevante en el origen de la vida.

La meta a lograr en el estudio de la formamida y el origen de la vida es demostrar que gracias a las condiciones naturales y/o espontaneas que se dieron en la tierra primitiva y la misma formamida como principal ingrediente se dio paso a estructuras más complejas que con el tiempo dieron paso a seres vivos con cierto grado de complejidad es así que según Ferus (32) “hasta ahora, sólo unos pocos experimentos han simulado las condiciones primordiales que demuestran con éxito una formación tan completa de al menos una serie de un grupo de biomoléculas en una olla (es decir, todas las bases nucleicas, aminoácidos seleccionados y azúcares, incluida la ribosa)”. Por otro lado el estudio realizado por Pietrucci, permite gracias a la bioinformática ver simulaciones que toman en cuenta las variables dependientes e independientes y obtener los resultados de las reacciones de decarboxilacion, deshidratación, entre otras de la formamida y sus subproductos (33).

Uno de los aspectos de importancia para este proyecto son los crecientes avances que se han dado, estudios donde se utilizan variedad de virus, hongos y bacterias como nuevos agentes de control biológico (34) por lo que también se debe pensar en más usos para Bt de modo que siga vigente en el mercado, uno de ellos es su uso como agente de biorremediación para residuos químicos de sustancias como la formamida que ha tenido gran importancia por ser una posible sustancia prebiótica en donde los expertos han tenido en cuenta aspectos que incluyen factores externos como la temperatura, la clase de reacción ( Decarboxilacion, oxidación, etc.) y la presencia o no de radicales libres pues Nguyen (35) también ha logrado demostrar la importancia de estos últimos en las reacciones que dan paso a los nucleósidos y luego a nucleótidos, logrando diferenciar entre las vías principales y las vías alternas que utiliza la formamida destacando las ruta del uracilo, citosina y timina ya que liberan una cantidad significativa de energía durante su reacción.

La fuente de energía de una reacción es tan importante como los mismos reactivos en dicha reacción por lo que además del estudio de las reacciones de la formamida con diferentes sustancias es parte de la incógnita del origen de la vida la fuente de energía que dio paso a los productos generados a partir de la formamida, es por ello que Saladino en sus diversas investigaciones sobre la formamida plantea la hipótesis de que los rayos de boro son la posible fuente de energía de la reacción prebiótica. Partiendo de esta fuente de energía también se propone explicar su aparición luego del Bing Bang a partir de dos hipótesis: “ a) la reacción de paliación B, que consiste en la colisión entre Rayos Cósmicos Galácticos (GCR) de alta energía y elementos más pesados (como carbono y oxígeno o boro) la reacción de GCR de baja energía con hidrógeno interestelar y helio en objetos pre-estelares (36). Permittiendo no solo conocer una posible fuente de energía sino el origen de esta también, dando un paso más cerca a establecer de forma clara todos los pasos hasta llegar al origen de la vida en el planeta tierra.

En la actualidad las simulaciones generadas por computador no solo permiten jugar con las condiciones sino también observar como los elementos puestos en el medio interactúan entre si y

dan paso a infinidad de resultados que día a día brindan nuevos conocimientos, por ejemplo, en el estudio de Bhushan et al. Se nombran aquellos elementos como sílice, aluminio, zeolitas, CaCO<sub>3</sub>, polvo cósmico, arcilla, caolín minerales de fosfatos, entre otros que pudieron estar en contacto con la formamida en la tierra primitiva actuando como catalizadores de las reacciones que darían origen a las bases nitrogenada (37). Cabe resaltar que se ha demostrado que las reacciones dadas en conjunto con la formamida también “dependían de la gran variabilidad y adaptabilidad de la tierra primitiva” (38).

El amitraz, conocido plaguicida químico, parte de la familia de plaguicidas de formamidina ha sido objeto de estudio ya que Dhooria (39) ha recopilado en su estudio varios casos documentados en la literatura que hablan de los efectos de este plaguicida que al ser ingerido da como resultado un rápido inicio de síntomas como hipotensión, hipotermia, vómitos, hiperglicemia; todo esto dado por la rápida metabolización de la N-metil formamida. Es por ello que se dio paso a alternativas que no representaran problemas para la salud como Bt, pero surge la pregunta que postula Palma (40) en su estudio: ¿Son los biopesticidas basados en Bt tan efectivos como deberían?, pues aunque son varias las ventajas ya que ofrece seguridad también son otras las falencias, por lo que se ha “incentivado al desarrollo de encapsulamientos orientados a proteger y ampliar la vida útil de las formulaciones pulverizables” (40)

Uno de los materiales o elementos que se cree contribuyeron a la creación de los nucleótidos en conjunto con la formamida son los meteoritos, entre ellos, según Rotelli (41) los meteoritos hechos de condrita carbonosa se ha comprobado podrían estar implicados procesos de catálisis en medios acuosos que darían origen a los nucleótidos, ácidos carboxílicos y otras sustancias más complejas que hacen parte del ciclo de Krebs como se conoce hoy en día, cabe destacar que esto también depende del tipo de condrita y otras condiciones como la temperatura y el tipo de agua que utilice. Así como las anteriormente mencionadas esta es otra de las posibles rutas que pudieron darse para crear vida en la tierra primitiva siendo la formamida el precursor prebiótico. Por otro lado *Bt* se ha caracterizado por su versatilidad ya que en los últimos años se ha vuelto tema central de varios artículos científicos que tratan temas desde la promoción del crecimiento

vegetal, biorremediación de metales pesados hasta producción de bacteriocinas que ofrezcan seguridad alimentaria (2). Sin embargo para el año 2017 se vio envuelto en controversia y un debate a quienes están en contra y de acuerdo con el uso de *Bt* en los cultivos y alimentos, ya que se presentó un incidente de intoxicación alimentaria lo que llevo a la revisión de la Autoridad europea de seguridad alimentaria que argumentaba que este bacilo representaba un riesgo para la salud equiparable al que puede causar *B. cereus*” (42).

Entre aquellas bacterias que degradan la formamida se encuentran aerobias y anaerobias siendo estas últimas las que necesitarían de la “ayuda de lodos y otros sustratos para degradar la formamida eficazmente esto sin conseguir resultados que muestren una alta efectividad” (43). Por otro lado así como han sido estudiados los procesos de degradación de la formamida también lo han sido los procesos que la involucran en la síntesis de prebióticos pues Saladino et al. (44) afirma que las reacciones de condensación de la formamida son catalizadas por una serie de minerales, incluidos los silicatos, fósforofatos, sulfuros, zirconia y boratos, y por polvos cósmicos y meteoritos. Sin embargo, una discusión crítica del poder catalizador de los minerales probados, y las condiciones geoquímicas bajo las cuales ocurriría la condensación, todavía no son claras.

En recientes investigaciones se ha dado más relevancia al uso de *Bt* como biofertilizante y bioestimulador, pues se han demostrado sus efectos benéficos sobre los cultivos de soja, arroz ya que tendría la capacidad que aumenta la ingesta y el transporte de nutrientes hacia las raíces de las plantas (45). Para el año 2020 se publicó un estudio que permitió conocer más a fondo el mecanismo de acción de las toxinas Cry al cual su autor bautizo como “Lisis-coloide osmótica” que establecería “la unión de la toxina al receptor en el intestino del insecto sería necesaria pero no suficiente para causar toxicidad” (46) por lo que intervendrían otros factores.

Actualmente se sabe que fueron varios los factores que influyeron y estuvieron presentes en el escenario prebiótico y uno de los que no mucho se ha hablado es la irradiación, pues según datos mostrados por Pastorek et al. (47) la radiación ionizante habría jugado un papel clave en la sintetización de las primeras moléculas complejas, pues se estima que la radiación era de niveles

$4 \times 10^3$  veces más alto que hoy en día. “La formamida en combinación con arcillas y un ambiente irradiado daría como resultado sustancias como la urea” (47).

Por último *Bt* es una bacteria de gran importancia en la industria ya que son sus toxinas han representado un gran paso hacia estrategias de sostenibilidad ambiental, estas toxinas son ampliamente conocidas por su mecanismo de acción que empieza “cuando un cristal de Bt llega al intestino del insecto, se solubiliza para liberar una o más protoxinas. Estas protoxinas luego son proteolizadas y activadas por proteasas del intestino medio. Y las toxinas pueden unirse y romper las membranas celulares. La unión e inserción de toxinas en la membrana desencadena la formación de poros y, en consecuencia, la muerte del insecto” (48) debido a que no puede alimentarse y muere.

## 2. MARCO REFERENCIAL

### **La formamida: generalidades**

La formamida es un compuesto químico derivado del ácido fórmico cuya fórmula molecular es:  $\text{CH}_3\text{NO}$  (11) siendo uno de los solventes más utilizados en la industria, es un líquido incoloro, higroscópico y viscoso, cuyas características bioquímicas son descritas a continuación:

**Tabla 1.** Generalidades bioquímicas de la formamida (32)

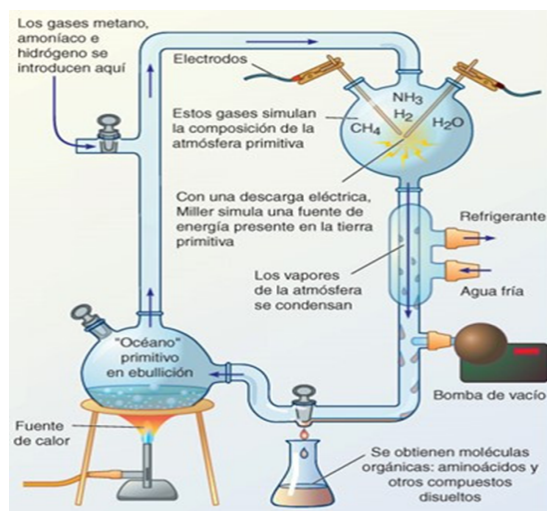
<b>Características</b>
Masa molecular: 45.0
Se descompone a 210°C
Punto de fusión: 2.5°C
Densidad relativa (agua = 1): 1.13
Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1.0
Solubilidad en agua: miscible
Presión de vapor, Pa a 20°C: 8
Densidad relativa de vapor (aire = 1): 1.6
Punto de inflamación: 120°C c.c.
Temperatura de auto ignición: >500°C
Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow: -1.51
Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 2.7 - 19

Este es un compuesto químico ampliamente utilizado en la industria y en la agricultura cuyo uso ha venido en aumento, al ser un compuesto complejo su degradación es lenta por lo que se necesitaría de tratamientos para eliminarla además de representa un riesgo de intoxicación para los seres humanos (49).

### **La formamida y el origen de la vida**

La respuesta a la incógnita del origen de la vida ha sido algo que el hombre ha buscado resolver durante años e incluso siglos, alrededor de esta pregunta se han generado diferentes hipótesis desde variados puntos de vista. Entre ellas encontramos teorías tales como: La teoría de Oparin del caldo primordial, la teoría de las micro esferas de proteínoides de Fox, teoría de la panspermia y la teoría del mundo del ARN (50) Una de ellas y de especial interés para la comunidad científica es la teoría que involucra la sopa primordial que fue puesta a prueba por

Miller y Urey, pues esta teoría explica el origen de la vida en la tierra mediante la mezcla de gases simples ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NH}_3$ ) interactuando en una atmósfera reductora, ya que según esta hipótesis así se lograría reproducir las condiciones de la tierra primitiva y así se daría la formación de biomoléculas sencillas que con tiempo e interacciones químicas más complejas darían lugar a compuestos más complejos que darían origen a la vida (50). A partir de esta hipótesis formulada en el año 1953 y conforme se realizaron avances científicos que permitieron realizar simulaciones computacionales se estudió cual fue el precursor que dio paso a la generación de las bases nucleicas. (Figura 1)



**Figura 1.** Se muestra la recreación de la sopa primitiva realizada por Miller y Urey, esto tomando en cuenta que se imitaron las condiciones de la tierra primitiva. Se obtuvieron biomoléculas sencillas, aminoácidos y otros compuestos

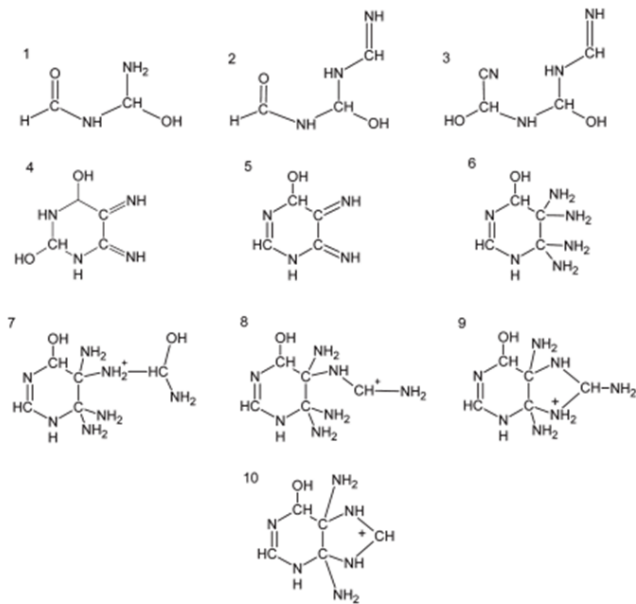
Conforme se han realizado ensayos científicos imitando la sopa primordial se encontraron elementos y a su vez moléculas que serían candidatas como precursores de vida; entre ellas una de las que más se ha estudiado es la formamida y sus derivados ya que siendo una de las sustancias más abundantes en la tierra y fuera de ella (Meteoritos, cometas, etc.) (17), cuenta con varias de las características de un precursor ideal tales como las reacciones controladas a altas temperaturas, su estabilidad durante reacciones químicas y puede ser catalizada por una amplia gama de sustancias que pudieron estar presentes en la tierra primitiva (17), Una amplia

distribución por el universo, peso inferior a 300 Da y composición elemental (N, H, C, O). A continuación, se describirán las diferentes reacciones químicas que llevan a la producción de ácidos nucleicos a partir de la formamida en presencia de diferentes catalizadores y condiciones ambientales.

El código genético es almacenado en largas cadenas de ácidos nucleicos que están contenidos en las células de todo ser viviente en el planeta tierra, estos ácidos nucleicos a su vez están conformados por bases nitrogenadas, puentes desulfuro (13), grupos fosfato y un azúcar (ribosa o desoxirribosa), la formación de las bases nitrogenadas representa una parte importante de la evolución hacia la vida. Varias teorías sugieren que siendo el ARN una cadena sencilla fue esta la que se formó primero que el ADN y tras un largo proceso de evolución se dio origen al ADN y a todas las formas de vida primitivas y actuales. Es por ello que diversos estudios se han especializado en la síntesis prebiótica que dé lugar a la producción de purinas (adenina y citosina) y pirimidinas (timina, guanina y uracilo) (33); todo esto a partir de las reacciones de la formamida y sus derivados.

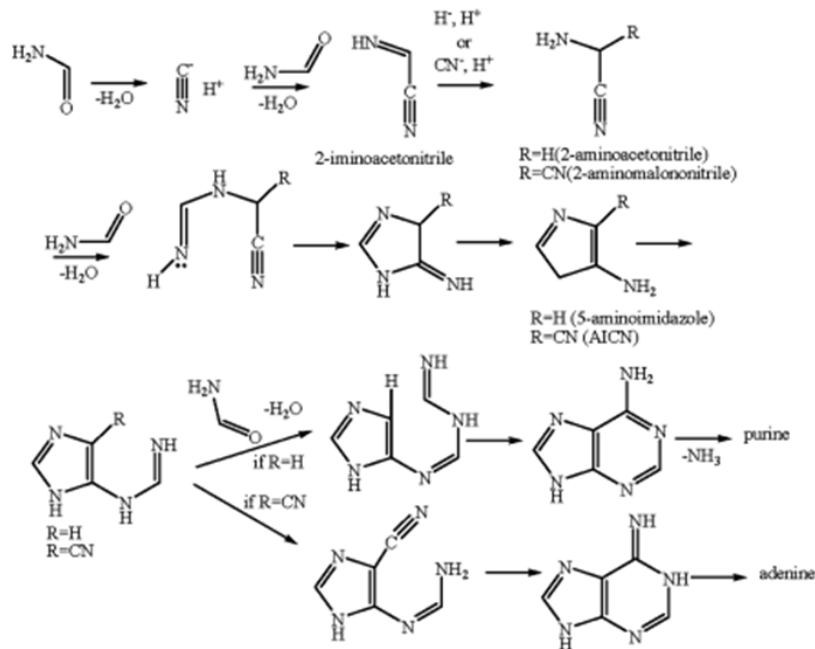
El ácido cianhídrico (HCN) es un derivado que se origina a partir de la deshidratación de la formamida, ya que según el estudio realizado por Spomer, et al, se observó que la reacción de dos moléculas de HCN y un dímero de formamida dan lugar a la formación de pirimidinas, mientras que las purinas se darían a partir de la ciclación de la pirimidinas y la formamida; esta es tan solo una de las rutas metabólicas propuestas que dan lugar a la aparición de las bases nitrogenadas. (17), sin embargo, HCN no es estable y no resiste altas temperaturas en comparación con la formamida, por lo que se dificulta la formación de las bases nitrogenadas en un entorno primitivo. Otra de las rutas para la formación de purinas consta de procesos tales como: formulación, deshidratación, reducción de Leuckart, cierre del anillo de 5 y 6 miembros y por último la desaminación, dando lugar a la posterior formación de adeninas y guanina (24).





**Figura 2.** Ruta metabólica propuesta por Sponer, et al. A partir de la formamida y mostrando como resultado la formación de purinas (17).

Los procesos anteriormente mencionados comienzan con la formilación y deshidratación de HCN seguido de la reducción de Leuckart (consiste en una reacción química que implica la conversión de un grupo carbonilo de una cetona o aldehído en una amina y cuya reacción es irreversible (18), es así como se da lugar a la formación del anillo de 5 y 6 miembros que componen las purinas seguido de esto se observa una desaminación y si se realiza esta reacción en medio acuoso será el agua como agente catalizador una molécula crucial para el cierre del anillo de 5 miembros; todo esto realizado en condiciones de altas temperaturas (19). Sin embargo, para la obtención de adenina según el estudio de Wang et.al proceso tiene ligeros cambios que incluyen una fase gaseosa de la formamida o bien puede utilizarse como precursor HCN ya que se demostró experimentalmente según el estudio de Saladino et al. Que se genera más adenina en presencia de HCN que de formamida demostrando así no solo la importancia de la formamida sino de sus derivados como precursores de la vida en la tierra



**Figura 3.** Ruta metabólica propuesta por Wang et al. A partir de la formamida y denotando la importancia del anillo de imidazol de 5 carbonos (24)

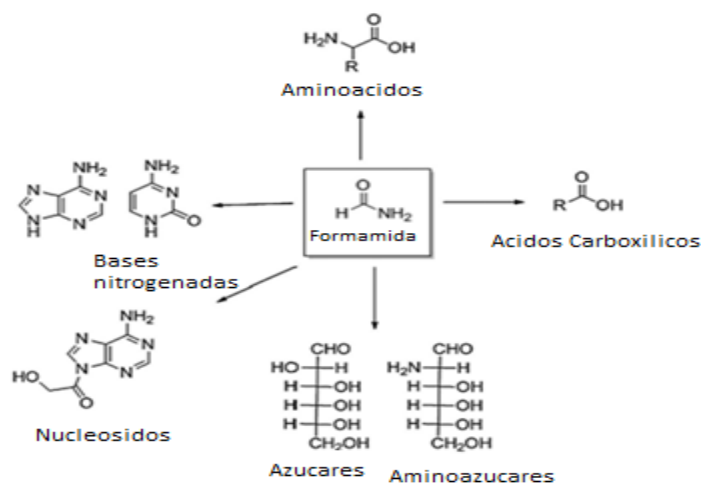
El anillo de imidazol constituye una parte importante de la formación de las nitrogenadas, este anillo se encuentra formado por 5 carbonos, nitrógeno e hidrógenos e incluye en su conformación un doble enlace. El imidazol es un compuesto aromático que se conoce desde mediados del siglo XIX al igual que algunos de sus derivados, es sólido, incoloro, altamente polar y soluble en agua (24).

Las barreras energéticas y los catalizadores juegan un rol importante pues en presencia o no de catalizadores se da lugar a diferentes compuestos complejos, entre los catalizadores más utilizados en los ensayos científicos encontramos moléculas como óxidos de manganeso, minerales, metales, polvo estelar, agua y la misma formamida como solvente entre otros. Muchos de los estudios han comparado el aumento o disminución de las barreras energéticas según el tipo de catalizador utilizado, encontrándose así que en un medio acuoso la barrera de energía aumenta mientras que en presencia de la formamida como solvente el gasto de energía disminuye (24). En otras condiciones como el aumento de temperatura de los  $100^\circ\text{C}$  a  $160^\circ\text{C}$ , la irradiación con rayos UV o Boro y la presencia del polvo estelar se da la formación de compuestos complejos y

en ausencia de uno de estos reactivos el producto cambia completamente o simplemente no se produce (22).

Según el estudio de Nguyen et al en el año 2013 “ Las fragmentaciones foto inducidas de formamida han atraído gran interés en parte debido al hecho de que productos de bajo peso molecular de degradaciones paralelas de formamida como CO, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub> y HNCO son intermedios representativos de la síntesis prebiótica” (22), siendo HCN el producto de degradación más estudiado por la comunidad científica debido a sus propiedades y su importante papel en la síntesis de las bases nitrogenadas y la facilidad con la que se obtiene a partir de moléculas de formamida y agua

No solo se ha estudiado el papel de la formamida en la generación de las bases nitrogenadas, sino además se cree que puede estar implicadas en las rutas metabólicas que conllevan a la formación de los enlaces fosfodiéster y se plantea la pregunta de si puede estar implicado en la síntesis del enlace b-glucosídico entre otros compuestos importantes en el metabolismo de la vida (33).



**Figura 4.** Según el estudio de Saladino et al. La formamida estaría implicada en el metabolismo de azúcares, aminoácidos, ácido carboxílico y bases nitrogenadas entre otros compuestos de importancia para el origen de la vida (4)

En la actualidad y con los avances de la tecnología se han llegado a hacer grandes descubrimientos, una de las herramientas más utilizadas en la actualidad para realizar los estudios sobre la síntesis prebiótica incluye matrices computacionales o programas que logran simular las condiciones que se le asignen, es así que a través de estas herramientas se logran simular las condiciones de la tierra hace millones de años y obtener resultados acerca de los posibles compuestos que se pudieron formar con el paso del tiempo.

### **Formamida como ingrediente de pesticidas**

Actualmente la carrera por la innovación y sostenibilidad mantiene a los académicos con la presión de crear o encontrar nuevas alternativas al uso de productos dañinos tanto para el planeta como para los seres humanos pues actualmente el planeta se encuentra en un punto de no retroceso lo que obliga a buscar nuevas opciones cuyo uso no afecte la supervivencia de la humanidad, es por ello que sobre aquellos temas que son un gran foco de contaminación (emisión de gases, deforestación, aspersion de pesticidas) diversos autores han comenzado a trabajar en el campo de la biorremediación. La aspersion de pesticidas, tema de gran interés para el presente proyecto ha abordado el tema de la formamida como contaminante de importancia, sin embargo, este no ha sido el único químico que ha venido sobresaliendo por ser un peligro latente, durante los últimos años se han venido estudiando y haciendo ensayos sobre el efecto de la biorremediación en sustancias como: los clorpirifos, fenantreno, fipronil, ácido fenobenzoico; químicos utilizados en fármacos, antiparasitarios y plaguicidas.

La formamida hace parte de la formulación de pesticidas clasificados dentro del grupo de formamidinas cuyo efecto sobre las plagas es letal al igual que el efecto que puede causar en el cuerpo pues ya para el año 1993 Gescher realizó un estudio sobre la toxicidad de la formamida sobre las personas expuestas, encontrándose así con efectos como irritación gástrica, hepato-toxicidad e incluso riesgo de padecer cáncer frente a estos efectos se llevó a la conclusión

de que la toxicidad esta intrínsecamente ligada al metabolismo de la formamida (11), lo que llevaría a otros autores a explorar el tema del metabolismo de la formamida.

El plaguicida Amitraz es uno de los plaguicidas químicos que contienen formamida en su formulación, es uno de los más conocidos y que más ha sido estudiado, para el año 2016 se dieron a conocer otros efectos de estos plaguicidas como los describen Dhooria y Agarwa (39): Afectación sensorial, hiperglicemia, hipotensión e hipotermia, efectos que estarían dados según la gravedad del caso que se estimaría por la dosis del componente activo del amitraz y la vía de exposición. Es así que el amitraz que venía siendo usado décadas atrás ha sido prohibido en varios países, entre ellos Colombia dada su peligrosidad para la seguridad alimentaria de sus ciudadanos, pues esta plaguicida se encuentra clasificado en la clase III de plaguicidas (levemente toxico) por la agencia de protección ambiental de estados unidos (EPA).

La formamida se convirtió en químico de gran interés a mediados de 1950 (1), ya para el año 1979 se comenzó a estudiar su mecanismo de acción sobre las plagas de los cultivos, lo que también termino ensayándose en ratones, encontrados que en los roedores tenía la capacidad de inhibir la monomamina-oxidasa una enzima que participa en la eliminación de neurotransmisores como la serotonina y dopamina (asociadas a la sensación de felicidad y placer respectivamente en humanos), si bien se demostró que este no es un factor importante en la letalidad si se demostró la responsabilidad de la formamida en la afectación de los neurotransmisores (9). Además de afectar a la monoamina oxidasa Evans y Gee (10) estudiaron los efectos de la formamida sobre los receptores de octopamina un neurotransmisor conocido en invertebrados centrando su estudios en los efectos de la formamida sobre la larva del gusano del tabaco y las luciérnagas, encontrando efectos letales que afectaban órganos internos de las dos especies mencionadas

### **Enzimas que degradan la formamida**

Durante la revisión bibliográfica propuesta se observó que son varios los estudios que apuntarían a que diferentes microorganismo tienen la capacidad de degradar la formamida lo que permite tener variadas posibilidades y técnicas de biorremediación utilizando gran variedad de

microorganismos, pero a pesar de que son muchos los estudios sobre los procesos metabólicos de bacterias degradadoras de formamida es poca la información encontrada sobre las enzimas que se encargarían de esta tarea, es así el caso de *Parococcus sp.*, cuyas enzimas le permiten obtener de la formamida nutrientes como carbono, nitrógeno e incluso la formamida sería fuente de energía para esta bacteria, ya que serían la formamida y sus derivados utilizados como sustratos, durante los ensayos realizados por Swaroop et al, (16) se evidencio que “después de la degradación al 70% de la formamida se registró un crecimiento significativo de cepas de *Parococcus sp.*

Ocurre lo contrario con la enzima Formamida deformilasa enzima que cataliza la hidrólisis de la bencilamida y el formiato a través de una reacción inversa para obtener como producto la N-bencilformamida (23) donde las condiciones de pH no varían durante la reacción y siendo el acetato y el propionato juegan el papel de sustrato activo durante la reacción inversa, mostrándose así a la formamida deformilasa como una enzima altamente eficiente para la degradación de la formamida y sus derivados. En caso de *Thiobacillus novellus*, se encontró la enzima formiato deshidrogenasa que sería la encargada de catalizar la formamida y el formiato, fuentes de carbono y energía para este microorganismo (8)

La urea carboxilasa es una enzima encontrada en la bacteria *Oleomonas saraganensis*, una proteo bacteria de la sub clase alfa, esta enzima es utilizada para la asimilación de la formamida como fuente de nitrógeno cuando el medio no provee este nutriente esencial para el crecimiento de la bacteria (6), como la urea carboxilasa otras de las bacterias en este listado son principalmente utilizadas para la catálisis de la formamida ya que esto permite al microorganismo tomar el nitrógeno que necesita. Por otro lado, como es el caso de la formamida hidrolasa proveniente de *Methanocaldococcus jannaschcii*, es una enzima dependiente de hierro que participa en varias transformaciones o procesos metabólicos (15) que aún se encuentran en investigación que permita establecer las rutas utilizadas por esta enzima.

Como se observó anteriormente la exploración de la degradación de la formamida es un tema actual que tiene mucho por ofrecer todavía y se está a la espera de que en un futuro cercano se puedan producir en masa un producto dedicado a la biorremediación que tenga como componente principal enzimas derivadas de bacterias.

### ***Bacillus thuringiensis***

Microorganismo identificado a principios del siglo XX debido a los efectos que producía sobre las plagas que afectaban la producción de la seda en Japón (27), desde entonces se ha venido estudiando el efecto tóxico de *B. thuringiensis* sobre las plagas de diferentes cultivos en el mundo, ya que representa una alternativa a los plaguicidas que normalmente se usan. Es un bacilo Gram positivo conocido por tener las conocidas proteínas Cry (20), cuyo efecto sobre los insectos que afectan a los cultivos provoca su muerte o intoxicación, sus mecanismos de acción han sido ampliamente descritos en diversos estudios que han analizado su potencial como agente plaguicida y no solo se han estudiado sus proteínas en el ámbito ambiental sino también en el de la salud, pues actualmente se ha venido analizando la capacidad citotóxica de algunas de sus proteínas contra los diferentes tipos de cáncer que aquejan al ser humano (27)

Durante el estudio de este microorganismo se ha llegado a conocer las especificidades según sus cepas y toxinas pues algunas son únicas según el tipo de plaga, las proteínas citotóxicas encontradas en cada una de ellas y los mecanismos de acción que permiten ver a *B. Thuringiensis* como una alternativa al uso de pesticidas químicos. Los mecanismos descritos apuntan a la destrucción de membrana, la pérdida del equilibrio osmótico y alteración del metabolismo, estos son: Modelo de enlace secuencial y modelo de vía de señalización (27), dichos mecanismos ayudan a esclarecer cómo actúa *B. thuringiensis* frente a determinadas plagas. También es importante resaltar que actualmente se han encontrado variadas clases de proteínas además de las Cry que tienen un papel biocida sobre los insectos y cuyos mecanismos de acción pueden ser similares o diferentes a los nombrados anteriormente.

Sobre los últimos datos acerca de los avances realizados con *Bt* se sabe que para 2017 se contaban con 98 formulaciones de bioplagicidas en el mercado, todas ellas con diferentes variantes de las proteínas Cry que hasta la fecha contaba con 74 familias identificadas, además de las proteínas Cry también se tenían datos de 138 proteínas Vip y 3 familias identificadas de la proteína Cyt (2) estos avances han logrado dar lugar a productos innovadores que proveen de nuevas herramientas al área de los bioplagicidas. *B. thuringiensis*, además al ser un producto proveniente de la naturaleza posee ventajas como: no toxicidad, ecológico, económico y practico; aspectos que le van dando seguridad frente al consumidor y herramientas para competir en un mercado acaparado por productos químicos.

Se debe tener en cuenta que cuando se comenzó a utilizar a *Bt* como control biológico de plagas, así como sus ventajas habían preocupaciones respecto a aspectos como: la implementación y la recepción del consumidor, con el pasar de los años estas debilidades se han vuelto fortalezas dando paso a la incertidumbre dada por la creciente resistencia de los insectos a distintas proteínas Cry, ya sea porque cambian los mecanismos de resistencias o porque cambian los receptores a los que se une la toxina para desencadenar su mecanismo de acción. Lo que ha obligado a crear nuevas cepas de *Bt* con el fin de obtener más genes insecticidas (2), esto con las esperanza de alargar la vida útil de *Bt* como agente de control biológico estrella; esto junto a otras estrategias como la implementación de cultivos transgénicos, fomentación del desarrollo de productos nuevos con *Bt* (40) ayudan a retrasar la resistencia y dan más tiempo de encontrar opciones mejores para el futuro.

Así como *B. thuringiensis* posee amplias ventajas ante los plaguicidas convencionales también cuenta con ciertas desventajas que deberían tender a la mejora si se realizan los estudios correspondientes, pues entre sus aspectos no tan buenos se pueden encontrar: Inestabilidad, perdida rápida de actividad insecticida en condiciones que involucren exposición a la luz ultravioleta (29)cambios de pH y temperatura (40).Debido a esto se han creados formulaciones que contengan la toxina encapsulada y protegida, uno de los materiales en estudio para las



toxinas es la melanina, ya que esta proveería protección contra los rayos UV y otros factores externos que pudieran afectar el efecto insecticida de la proteína Cry pero aún se tienen inconvenientes con otros posibles materiales a utilizar ya que se debe valorar que tan alto sería su impacto negativo en el medio ambiente (29).

### **3. DISEÑO METODOLÓGICO**

#### **3.1 Tipo de investigación**

El presente proyecto de investigación es de tipo mixto ya que en base a los objetivos propuestos se buscará describir a detalle el metabolismo de la formamida y con ello las enzimas asociadas en estos procesos, contará con variables independientes y dependientes que permitirán realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de las enzimas implicadas en el metabolismo de la formamida.

También se contará con herramientas de bioinformática que permitirá explorar en el genoma de *Bt* en busca de posibles enzimas que ayuden a la degradación de la formamida

##### **3.1.1 Población**

Enzimas o proteínas implicadas en el metabolismo de la formamida

##### **3.1.2 Muestra**

Enzimas o proteínas relacionadas con el metabolismo de la formamida que se encuentren en el genoma de *B. thuringiensis*

### **3.2.1 Hipótesis**

Nula: *B. thuringiensis* no tiene enzimas relacionadas al metabolismo de la formamida

Alterna: *B. thuringiensis* tiene enzimas relacionadas al metabolismo de la formamida

### **3.2.2 Variables**

Variable independiente: Rutas metabólicas asociadas a la formamida

Variable dependiente: Enzimas implicadas en el metabolismo de la formamida

### **3.2.3 Indicadores**

Enzimas asociadas a la formamida

Clase de proteínas asociadas a la formamida en *B. thuringiensis*

Numero de enzimas asociadas a la formamida en *B. thuringiensis*

## **3.3 Técnicas y procedimientos**

Formamida y su origen: Se realizó una revisión bibliográfica de más de 30 artículos experimentales y de revisión en bases de datos y/o revistas científicas (Springer, Life, Bio Chem A., Journal of Bacteriology, NCBI. PubMed, PMC, etc.) que proporcionaron las rutas metabólicas necesarias y los microorganismos poseedores de enzimas de degradación para encontrar las enzimas implicadas en la síntesis y/o degradación de la formamida en el genoma de Bt.

Enzimas: Para la elaboración del listado de las enzimas implicadas en el metabolismo de la formamida se utilizaron herramientas de bioinformática como BLAST (Protein-BLAST, BLASTx, tBLASTn, y tBLASTx ) que proporcionaron las secuencias de las enzimas y

permitieron la alineación con el genoma de *Bt* Kurstaki HD-1, adicionalmente utilizando la herramienta de Expasy (Protparam tool) se pudieron conocer características bioquímicas de las enzimas tales como: Punto isoeléctrico, índice de estabilidad, índice alifático, etc.

Enzimas relacionadas en *B. thuringiensis*: Se realizó una identificación de enzimas similares a partir de genoma de *B. thuringiensis* utilizando la herramienta de bioinformática BLAST-P lo que permitió obtener secuencias de las enzimas iniciales alineadas con secuencias en el cromosoma y plásmidos de *Bt*

Cabe tener en cuenta que para obtener las proteínas alineadas se tomaron en cuenta valores de cobertura e identidad (>60% y >40% respectivamente).

#### **4. RESULTADOS**

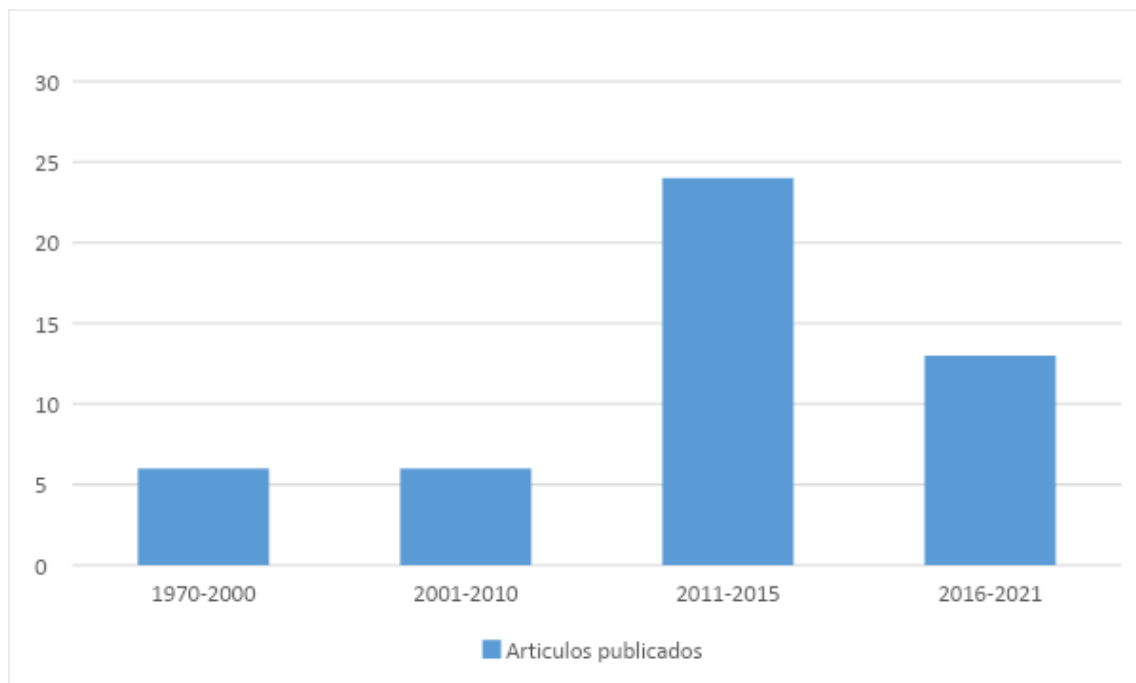
##### **Revisión literaria sobre la formamida, su origen, metabolismo y la importancia de *B. thuringiensis***

Con el objetivo de abordar el origen primigenio de la formamida para así llegar a comprender su metabolismo y su importancia se realizó una revisión literaria de artículos científicos que abordaran el tema en cuestión, esto llevo a la consulta de diversos autores y sus trabajos en donde la formamida era eje central y se hablaba ampliamente de la hipótesis de la formamida como sustancia prebiótica que dio bases a la vida en la tierra primitiva. También se realizó una revisión acerca de los trabajos de los autores que mostraban los usos que se le han dado a la formamida a lo largo de por lo menos 4 décadas y como estos terminarían afectando los suelos llevando a la comunidad científica a buscar alternativas que puedan remediar este daño y ser una alternativa al uso de este compuesto toxico para los humanos y el planeta entero.

Por otro lado, el uso de *Bt* como componente clave en la formulación de los bioplagicidas ha dado pie para explorar el potencial de este microorganismo ya que se están proponiendo otros

usos que además de ser innovadores proporcionarían seguridad al medio ambiente algo que es de vital importancia en la situación actual de la Tierra.

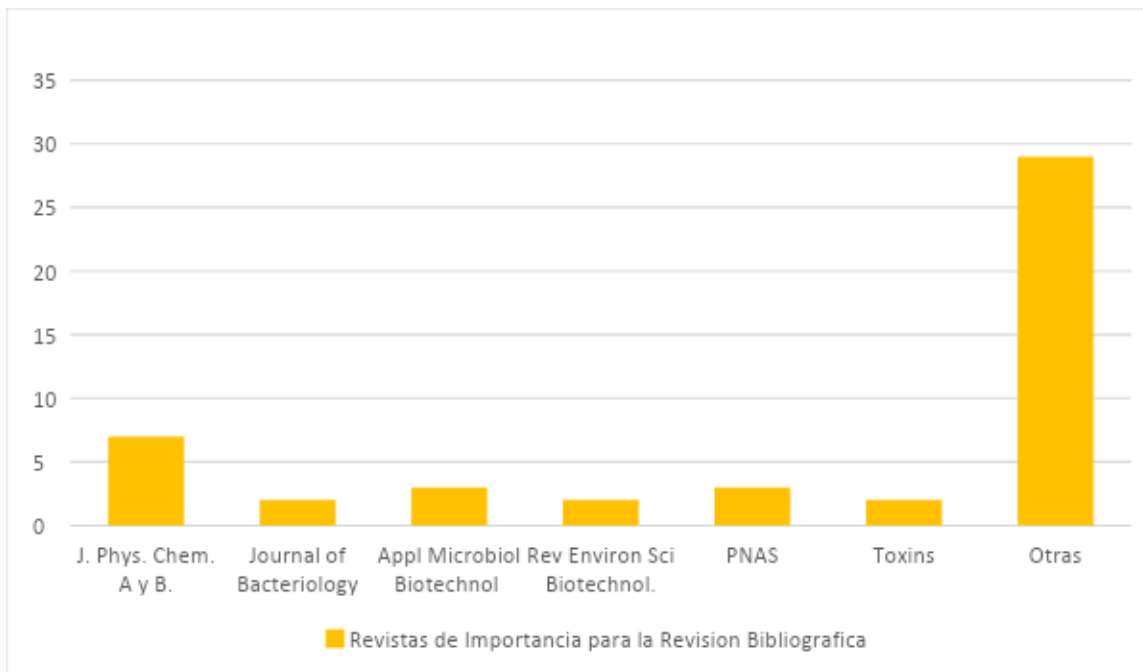
A continuación, se mostrará un análisis acerca de la revisión literaria esto con el fin de observar la notoriedad e importancia que han tenido con el paso de los años temas como: el origen de la formamida, su degradación y la importancia de *B. thuringiensis* en la agroindustria.



**Figura 5.** Años de publicación de los artículos usados para este proyecto

Abordando la temática de la formamida en conjunto con Bt se recopilaron un total de 50 artículos científicos, en la figura 5 se muestra sin discriminación temática el número de artículos publicados durante diferentes periodos de tiempo, notando que así que en el periodo comprendido entre 2011 – 2015 se publicaron 24 artículos sobre los temas afines al presente proyecto siendo el año 2013 el de más actividad e investigación por parte de los autores. Por otro lado, el periodo comprendido entre 1970-2000 representa en su totalidad artículos referentes al tema de la formamida, explorando especialmente en sus usos, toxicidad y metabolismo.

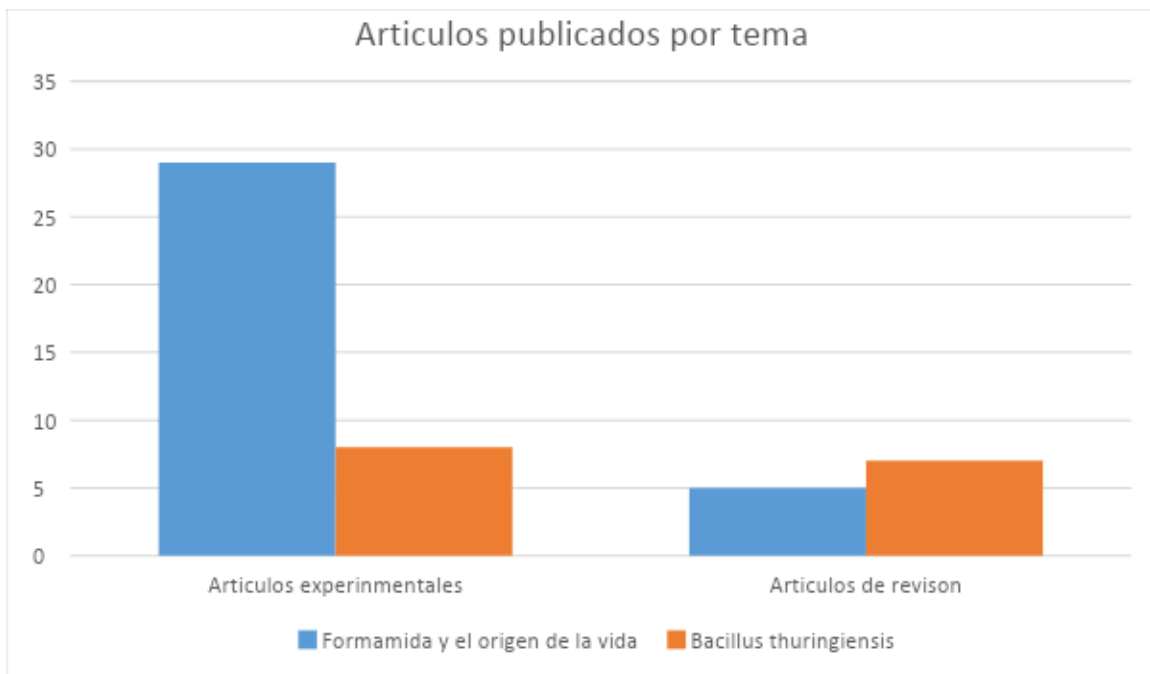
Para el periodo comprendido entre 2001-2010 se observan 6 publicaciones referentes tanto a temas derivados de la formamida como de *Bt*. Sin embargo, a partir del periodo de 2016-2021 se ve un aumento significativo en artículos referentes a *Bt* donde los autores explican lo complejo de su toxicidad hacia las plagas de los cultivos y como se han vuelto parte esencial de los biopesticidas, también se abordan temas como el uso de este microorganismo en aplicaciones médicas y de seguridad alimentaria entre otras.



**Figura 6.** Revistas a partir de las que se tomaron los artículos para revisar bibliográfica

Las revistas científicas han tomado gran importancia en el ámbito de las ciencias ya que permite la comunicación con lugares lejanos y estar a la vanguardia de las tendencias científicas, es por ello que las revistas científicas han tomado gran relevancia ya que al tener un lugar de privilegio en la comunidad científica sus publicaciones representan los mejores hallazgos y así mismo a los mejores autores. Al momento de realizar la revisión literaria estos datos fueron de vital importancia ya que se pudo conocer cuáles han sido las revistas que más han publicado estudios referentes al tema de estudio del metabolismo de la formamida y de *Bt*.

En la figura 6 observamos que la revista que más publicaciones ha tenido sobre los temas de interés del presente trabajo ha sido Journal Physical Chemistry de origen estado unidense mientras que revistas de igual importancia como Applied microbiology and biotechnology, Toxins, Journal of Bacteriology entre otras poseen entre 1 y 2 publicaciones referentes al tema de interés. También se debe destacar que, así como las revistas también hay autores destacados que han publicados varios de los artículos tenidos en cuenta tales como: Rafaelle Saladino, Hollingworth, Martin Ferus y Huyen Thi Nguyen quienes han estudiado minuciosamente estos temas y se han convertido en referentes de ellos.



**Figura 7.** Artículos publicados por tema

Para cumplir con el primer objetivo se dio especial atención a aquellos títulos referentes al tema de la formamida, su metabolismo y su papel en origen de la vida por lo que se puede evidenciar en la figura 7 que en su mayoría las referencias bibliográficas pertenecen a este tema, también se diferencia entre si las publicaciones fueron estudios experimentales o revisiones de otros artículos científicos, por lo que se puede observar en que el tema de la formamida en su mayoría los artículos fueron de tipo experimental mientras que para el tema de *Bacillus thuringiensis* se

tomaron referencias de artículos de revisión que ofrecen un panorama más amplio de todos los usos y aplicaciones referentes a este microorganismo

## Metabolismo de la formamida y enzimas relacionadas

A partir de la revisión literaria se encontraron 5 enzimas procedentes de diferentes microorganismos que se utilizaban para ayudar a la supervivencia de estos ya sea como fuente de nitrógeno u otras funciones de nutrición. Es así que entre las enzimas encontramos a: Urea carboxilasa procedente de *Oleomonas saraganensis* cuya función es la asimilación de nitrógeno a partir de formamida y acetanamidas (6), Formamida hidrolasa dependiente de hierro procedente de *Methanocaldococcus jannaschii* cuya función se cree que es importancia para el microorganismo ya que parece participar en varios procesos metabólicos (15) así como las enzimas anteriores la N- bencilformamida, la formamida amido-hidrolasa y la N-N Dimetilformamida se han visto comúnmente involucradas en la asimilación y degradación de la formamida y similares o derivados como fuente de nitrógeno

A continuación, se muestran las enzimas encontradas durante la revisión de literatura donde se muestran los microorganismos de origen entre otros aspectos bioquímicos relevantes para el proyecto (punto isoeléctrico, peso molecular, residuos de carga negativa y positiva, índice alifático, número de aminoácidos, etc.), esto realizado con la herramienta de bioinformática Expasy que permitió obtener estos datos al ingresar la secuencia de aminoácidos que conformaban la enzima.

**Tabla 2.** Listado de enzimas degradadoras de la formamida

Microorganismo	Enzima	Acceso NCBI	Punto Isoelectrico pl	Residuos de carga negativa (Asp+Glu)	Residuos de carga positiva (Arg+Lys)	Indice de inestabilidad	Indice alifatico	Gran promedio de hidropatia (GRAVY)	Peso molecular	Numero de Aminoacidos
<i>Oleomonas saraganensis</i>	Urea carboxilasa-Urea amidasa	BAD16654.1	5.60	132	108	38.42	94.65	0.058	125218.29	1171
<i>Bacillus cereus</i>	Formamida amido-hidrolasa	AQQ63224.1	4.78	44	25	37.85	100.95	0.026	33173.36	304
<i>methanocaldococcus jannaschii</i>	Formamida hidrolasa dependiente de hierro	<a href="#">Q57580</a>	6.68	33	32	23.50	107.38	-0.114	25305.48	225
<i>Bacillus subtilis</i>	N- bencilformamida o formamida deformilasa	QHF58973.1	5.55	79	61	31.40	89.28	-0.365	58457.37	529
<i>Rhodospirillaceae bacterium</i>	N-N dimetil-formamidasa	KAF0100558.1	6.15	87	76	34.90	70.60	-0.406	78968.56	716

Se debe resaltar que estas enzimas fueron sacadas de la consulta de artículos científicos donde se daba el microorganismo de origen, sin embargo, en el caso especial de la N-bencilformamida o formamida deformilasa enzima descrita en el artículo “A New Synthetic Route to N-Benzyl Carboxamides through the Reverse Reaction of N-Substituted Formamide Deformylase” no se obtiene un microorganismo de origen por lo que al buscar en la base de datos Protein de NCBI se usó como microorganismo de origen a *B. subtilis* ya que este posee la enzima y pertenece al mismo género de interés para este proyecto (*B. thuringiensis*)

Luego de tener el listado de enzimas se realizó la búsqueda con la herramienta Genoma de NCBI del microorganismo *Bacillus thuringiensis* cepa Kurstaki HD-1, y se procedió a buscar dentro de los 14 plásmidos y el cromosoma de esta bacteria secuencias similares o iguales a las de las enzimas encontradas durante la revisión de artículos científicos esto utilizando la herramienta de bioinformática tBLASTn, que permite al usuario pasar de una secuencia de aminoácidos a una de nucleótidos y además alinear estas secuencias con otras con el fin de observar similitudes basados en aspectos como la identidad y la cobertura.

**Tabla 3.** Listado de enzimas alineadas con secuencia del cromosoma de *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD-1

Enzima	B. thuringiensis serovar Kurstaki HD-1	Valor de cobertura	Valor de identidad	Valor e	Rango del Cromosoma	Punto Isoeléctrico pI	Residuos de carga negativa (Asp+Glu)	Residuos de carga positiva (Arg+Lys)	Índice de inestabilidad	Índice alifático	Gran promedio de hidropatía (GRAVY)	Peso molecular	Número de Aminoácidos
Urea carboxilasa	Cromosoma NZ_CP004870.1	63%	46,68%	<a href="#">2,00E-113</a>	3327473-3326169	5.06	65	44	41.60	92.18	-0.232	48459.35	435
Formamida amido hidrolasa	Cromosoma NZ_CP004870.1	98%	96,38%	1,00E-172	3264806-3263895	4.98	42	26	32.10	101.94	0.041	33058.24	304
Formamida deformilasa	Cromosoma NZ_CP004870.1	65%	47,83%	4,00E-161	4725568-4724006	5.34	84	60	41.99	91.13	-0.376	59145.09	521

En la tabla 3 se pueden observar los resultados de la alineación de las 5 enzimas de la tabla 2 con la secuencia del cromosoma Bt HD-1. Cabe destacar que de las 5 enzimas encontradas inicialmente solo 3 de ellas mostraron valores de cobertura e identidad superiores al 60% y 40%



respectivamente, esto con el fin de dar mayor seguridad sobre las secuencias resultantes. También se debe tener en cuenta que de las secuencias de los plásmidos no se obtuvieron resultados esto ya que en las secuencias de los plásmidos no se encontraban fragmentos que se pudieran alinear con las enzimas lo que solo permitió tener resultados de la alineación con el cromosoma de la bacteria. Esto sugiere que estas secuencias serian de carácter constitutivo y por consiguiente de importancia para la vida de la bacteria por lo que sería posible obtener estas enzimas de *B. thuringiensis* y posteriormente utilizarlas para procesos o productos para biorremediación.

## 5. DISCUSION

Durante la revisión bibliográfica se prestó especial atención en los procesos que los autores llevaron a cabo experimentalmente para demostrar la procedencia de los ácidos nucleicos en la tierra primitiva, muchos de ellos concuerdan por ejemplo, en que la formamida se compone de los elementos más abundantes sobre la tierra, e incluso hubo quienes pudieron demostrar que también hubieron factores fuera del planeta que contribuyeron a formar las primeras bases nitrogenadas y es que ha sido tan extenso el trabajo a lo largo de los años que se explorado cada una de las alternativas para la formación de las bases nitrogenadas como se explica en algunos de los artículos tenidos en cuenta para esta revisión bibliográfica como son: “*From Formamide to Adenine: A Self-Catalytic Mechanism for an Abiotic Approach*” y “*From Formamide to Purine: An Energetically Viable Mechanistic Reaction Pathway*” del autor Jing Wang donde afirma que la adenina, una purina evolucionaria a partir de las pirimidinas siendo estas últimas las primeras en aparecer en la tierra primitiva (18).

De los 50 artículos utilizados para realizar la revisión bibliográfica un aspecto de gran interés es su variedad ya que a pesar de que todos manejan como eje central el origen de la vida a partir de la formamida cada uno explora diferentes aristas y/o ponen a prueba diferentes teorías sobre el tema como: La intervención de objetos como meteoritos, cometas y otros objetos en el espacio, las altas o bajas temperaturas, la presencia o ausencia del agua, la energía liberada o necesaria para las reacciones químicas, la famosa teoría de Miller y Urey, la teoría de la generación espontánea, la utilización de derivados de la formamida para la generación de ácidos nucleicos, la irradiación de metales pesados, entre otros. Cada uno de ellos es tan importante como el anterior para ir construyendo la ruta metabólica de la formamida y como esta da paso al ARN y ADN y estos a su vez dan origen a la vida y permite llegar debate sobre cuál de las rutas exploradas en los artículos es más probable en un entorno primitivo.

Mucho se ha explorado en estos estudios científicos acerca de si la formamida actuaría sola o en conjunto de otras moléculas sencillas para obtener las bases nitrogenadas, varios de los autores coinciden en que la temperatura juega un papel importante, al igual que un medio acuoso o uno donde la formamida actué como solvente, por ejemplo, en el estudio de Saladino et al. *“From The One-Carbon Amide Formamide To RNA All The Steps Are Prebiotically Possible”* se postula que la formamida en conjunto con moléculas de glucosa darían como resultado enlaces fosfodiéster en condiciones de altas temperaturas pero advierte que esto no parece ser suficiente (3) lo que requeriría saber si se está omitiendo un reactivo para la reacción o las condiciones no están dadas para obtener el resultado mencionado. Otros de los materiales mencionados por los autores y que se recopilaron en esta revisión se han utilizado para la generación de moléculas más complejas (Adenina, Timina, Guanina, Citosina) son compuestos tales como: Sílice, aluminio, Zeolitas, CaCO<sub>2</sub>, polvo cósmico, cometas, arcilla, caolín, minerales de fosfato, mediante ensayos in vitro los autores han logrado demostrar que estas reacciones conllevan a una alta o baja productividad de bases nitrogenadas ya sean purinas o pirimidinas dependiendo de la sustancia que acompañe a la formamida.

De otro lado los avances con herramientas bioinformáticas han logrado avances en esta área de investigación ya que algunos autores han comenzado a utilizar simulaciones computacionales que les permiten recrear y manipular las condiciones del ensayo a su antojo y obtener resultados que de hacer ensayos in vitro o in vivo generarían dificultad para obtenerse, se debe tener en cuenta que durante la revisión bibliográfica fueron pocos los artículos que utilizaban herramientas bioinformáticas para realizar sus ensayos, lo que indica que al ser una técnica o procedimiento de investigación diferente al utilizado normalmente en un futuro puede llegar a tomar fuerza y ofrecer respuestas a las preguntas del hombre. Sin embargo, se observó que con el pasar de los años y teniendo en cuenta que se encontraron estudios en los años setenta la forma de investigar a cambiado y que la creación de las bases de datos informáticas ha sido una herramienta fundamental para la realización de estudios y que estos puedan ser conocidos en todo el planeta, incluso las bases de datos científicas contenidas por ejemplo en NCBI han sido de gran relevancia para este proyecto ya que sin bases de datos de artículos como PUBMED, PMC, PROTEIN, entre otras no habría sido posible recopilar toda la información requerida sobre eje central de este documento.

Los artículos científicos de revisión utilizados para dar cumplimiento al primer objetivo fueron 6, estos artículos ofrecieron una vista más amplia del tema y darle al lector una perspectiva más abierta a los conocimientos de otros autores de artículos experimentales que no se vieron en este proyecto. También se debe destacar que las revistas científicas tuvieron importancia ya que por ejemplo la revista J. Phys. Chem. Ha publicado varios de los artículos presentes en esta revisión y que han sido parte fundamental para la realización de este proyecto.

De la revisión realizada se encontraron 5 enzimas de las que solo 3 tenían similitudes con secuencias en el cromosoma de Bt. HD-1, se debe señalar que en algunos de los artículos se mencionaba al microorganismo poseedor de una enzima capaz de degradar la formamida, pero no se daba el nombre de la enzima responsable de la reacción por lo que se observa que se ha buscado microorganismos que degraden la formamida, pero no se han hecho los ensayos que permitan identificar las enzimas puedan ser utilizadas en futuros procesos de biorremediación.

Como se ve en las tablas 2 y 3 se dan algunas características bioquímicas de importancia que permiten la identificación y caracterización de las enzimas; los aspectos bioquímicos descritos en las tablas son: Punto isoeléctrico (punto en el cual la carga neta en una molécula es cero), residuos de carga negativa (residuos de asparagina y glutamina), residuos de carga positiva (residuos de arginina y lisina), índice de inestabilidad (medición de inestabilidad de la proteína), índice alifático (mide termoestabilidad de la proteína) GRAVY (gran promedio de hidropatía), peso molecular y número de aminoácidos; también se incluye el número de acceso de NCBI que permite encontrar la proteína de interés con más facilidad.

Durante la realización de la tabla 2 se pudo observar que el punto isoeléctrico se mantuvo en un promedio de 4 a 6, la urea carboxilasa por otro lado es la enzima con mayores residuos de carga negativa y positiva en comparación con las otras 4, los índices de inestabilidad se mantuvieron cercanos (en valores de 20 a 40) igual que los índices alifáticos con valores entre 70 y 100. Los valores de GRAVY por otro lado fueron negativos para la formamida hidrolasa, formamida deformilasa y N-N Dimetilformamida. Para la tabla 3 el número de aminoácidos de las enzimas resultantes de la alineación con el cromosoma de Bt. HD-1 fue menor de 550 en las 3 enzimas, los valores de punto isoeléctrico se mantuvieron cercanos al igual que los valores de índice de inestabilidad. Los residuos de cargas positivas y negativas se diferenciaron entre cada enzima y los valores de GRAVY fueron negativos para la urea carboxilasa y la formamida deformilasa luego de ser alineadas con el cromosoma de Bt. HD-1

La contaminación de aguas y suelos con químicos usados en la industria y en la siembra de cultivos ha venido agravándose con el pasar de los años, lo que hace décadas se vendía como la solución para acabar con las plagas y fortalecer diferentes sectores industriales, es hoy un problema medio ambiental dado por que se pensó en una solución momentánea y no en las consecuencias a largo plazo, es por ello que en los últimos años la ciencia ha dedicado sus esfuerzos a buscar nuevas técnicas para eliminar o degradar los contaminantes. Es por ello que este proyecto pretende presentar a *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de biorremediación al utilizar este microorganismo y sus enzimas para degradar un contaminante

como la formamida. Con los resultados obtenidos el objetivo es que se logre beneficiar a los sectores de la ciencia y la agricultura, ya que se fortalecería la investigación sobre *Bacillus thuringiensis* y su uso como producto agrícola.

Cabe mencionar que al momento de la alineación se escogió una cepa específica de *Bacillus thuringiensis*, *Bt* Kurstaki HD-1, esto con el fin de obtener resultados de más especificidad y teniendo en cuenta que esta cepa en especial es una de la más usadas en la agroindustria. Así como *Bt* ha sido utilizado como ingrediente principal en los biopesticidas, también se ha venido investigando su uso en otras áreas como la biorremediación ayudando a la degradación de metales pesados como mercurio, uranio, cobre, níquel y otros compuestos dañinos para el medio ambiente como: Fenantreno y clorpirifos, siendo este último un ingrediente de los plaguicidas químicos.

La agroindustria se encuentra a la expectativa de productos innovadores que sean amigables con el ambiente y de fácil degradación ya que esto podría ayudar a aminorar el daño hecho por productos químicos dejados años atrás, si bien no se han llegado a utilizar los biopesticidas en un 100% en los campos de cultivo, el público consumidor se ha mostrado optimista y dispuesto a poner en uso estas alternativas a los plaguicidas convencionales, ya que según cifras dadas en el año 2017 este mercado tenía un incremento anual del 16% representando el 8% del comercio de plaguicidas y siendo *Bt* el mayor exponente (2)

## 6. CONCLUSIÓN

- La formamida ha sido un compuesto estudiado en el área que busca encontrar respuesta a la sustancia precursora del origen de la vida en la tierra comprobándose así que este compuesto posee varias de las características que lo hacen precursor ideal que dio paso a la creación de las bases nitrogenadas que componen ADN y ARN.

- Por otro lado es sabido que la formamida es un compuesto utilizado en la fabricación de plaguicidas y otros productos utilizados en la industria caracterizándose por ser de descomposición lenta por lo que hoy en día se buscan alternativas que reemplacen este tipo de compuestos y que sean biodegradables sin llegar a representar un problema de contaminación de suelos a largo plazo, es por esta razón que en este proyecto se exploró si *Bacillus thuringiensis* podría poseer en su genoma enzimas capaces de catalizar la formamida o tener alguna similitud genética con ellas.
- Se pudo obtener las secuencias de las enzimas alineadas con las secuencias de cromosoma y plásmidos, lo que arrojó resultados de cobertura e identidad de más de 60% y 40% respectivamente en el cromosoma con 3 de las 5 enzimas encontradas en la revisión de literatura lo que quiere decir que al encontrarse en el cromosoma estas secuencias son genes constitutivos y necesarios para el funcionamiento del microorganismo lo que permitiría utilizar a *Bacillus thuringiensis* como posible candidato para la generación o sintetización de proteínas que tengan actividad catalítica sobre la formamida.
- Los últimos avances en investigación sobre *B. thuringiensis* sugieren que podría tener funciones como: Promoción del crecimiento vegetal (transgénicos), biorremediación de metales pesados, actividad anticancerígena, fuente de genes para su uso en ingeniería genética y producción de bacteriocitas, entre otros. (2).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Hollingworth, R. M.** Chemistry, Biological Activity, and Uses of Formamidine Pesticides. *Environmental Health Perspectives*. 1976 [Citado: Agosto 3 de 2020]., Vol. 14, pp. 57-69. Disponible en:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1475108/>.

2. **Jouzani GS, Valijanian E, Sharafi R.** Bacillus thuringiensis: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl Microbiol Biotechnol.* Febrero 2017 [Citado: Mayo 30 de 2020], Vol. 101, 7, pp. 2691-2711. Disponible en: doi: 10.1007/s00253-017-8175-y.
3. **Saladino, Raffaele., Botta, Giorgia., Pino, Samanta., Costanzo, Giovanna., Di Mauro, Ernesto.** From The One-Carbon Amide Formamide To RNA All The Steps Are Prebiotically Possible. *Biochimie.* Febrero 2012 [Citado: Septiembre 2 de 2020], Vol. 94, (2012), pp. 1451-1456. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/228080938\\_From\\_the\\_one-carbon\\_amide\\_formamide\\_to\\_RNA\\_all\\_the\\_steps\\_are\\_prebiotically\\_possible](https://www.researchgate.net/publication/228080938_From_the_one-carbon_amide_formamide_to_RNA_all_the_steps_are_prebiotically_possible).
4. **Saladino, Raffaele., Botta, Giorgia., Pino, Samnta., Costanzo, Giovanna and Di Mauro, Ernesto.** Genetics first or metabolism first? The formamide clue. *Chem Soc Rev.* 6 Marzo 2012 [Citado: Septiembre 05 de 2020], pp. 1-40. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/225290617\\_Genetics\\_First\\_or\\_Metabolism\\_First\\_The\\_Formamide\\_Clue](https://www.researchgate.net/publication/225290617_Genetics_First_or_Metabolism_First_The_Formamide_Clue).
5. **Watson, G. Keith and Caín, Ronald B.** Microbial Metabolism of the Pyridine Ring Metabolic Pathways Of Pyridine Biodegradation By Soil Bacteria. *Biochem. J.* Enero 1975 [Citado: Agosto 3 de 2020]., Vol. 146, pp. 146: 157-172. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1165285/>.
6. **Kanamori, Takeshi., Kanou, Norihisa., Atom, Haruyukii. and Imanaka, Tadayuki.** Enzymatic Characterization of a Prokaryotic Urea Carboxylase. *Journal Of Bacteriology.* 2004 [Citado: Agosto 16 de 2020], Vol. 40, (3), pp. 2532–2539. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387783/>.
7. **Odukkathil, Greeshma and Vasudevan, Namasivayam.** Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. *Rev Environ Sci Biotechnol.* Septiembre 2013 [ Noviembre 1 de 2020], Vol. 12. Disponible en: DOI 10.1007/s11157-013-9320-4.
8. **Chandra T. S. and Shethna, .** Oxalate, Formate, Formamide, and Methanol Metabolism in Thiobacillus novellus. *Journal Of Bacterology,.* 1977 [Citado: Agosto 05 de 2020], pp. 389-398. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/22268778\\_Oxalate\\_formate\\_formamide\\_and\\_methanol\\_metabolism\\_in\\_Thiobacillus\\_novellus](https://www.researchgate.net/publication/22268778_Oxalate_formate_formamide_and_methanol_metabolism_in_Thiobacillus_novellus).
9. **Hollingworth RM, Leister J, Ghali G.** Mode of action of formamidine pesticides: an evaluation of monoamine oxidase as the target. *Chem Biol Interact.* Enero 1979 [Citado: Agosto 05 de 2021], Vol. 24, 1, pp. 35-49. Disponible en: doi: 10.1016/0009-2797(79)90101-7. PMID: 428001..
10. **Evans, Peter D. and Gee, Julian D.** Action of Formamidine Pesticides on Octopamine Receptors. *Nature.* 4 Septiembre 1980 [Citado: Agosto 05 de 2020], Vol. 287, pp. 60-62. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/287060a0>.
11. **Gescher, .** Metabolism of N, N-Dimethylformamide: Key to the Understanding of Its Toxicity. *Chemical Research of Toxicology.* 1993 [Citado: Agosto 13 de 2020], Vol. 6, (3), pp. 245-251. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/tx00033a001>.
12. **Skouloubris, S., Labigne, A and De Reuse, H.** The AmiE Aliphatic Amidase and AmiF Formamidase of Helicobacter pylori: Natural Evolution of Two Enzyme Paralogues. *Mol Microbiol.* 2001 [Citado: Agosto 15 de 2020], Vol. 40, 3, pp. 596-609. Disponible en: DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02400.x.

13. **B., Veeranagouda . P. V. Emmanuel Paul . P. Gorla . D. Siddavattam . T.** Complete Mineralisation of Dimethylformamide by *Ochrobactrum* sp. DGVK1 Isolated From The Soil Samples Collected From The Coalmine Leftovers. *Appl Microbiol Biotech.* 2005 [Citado: Agosto 24 de 2020], Vol. 71, pp. 369–375. Disponible en : <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2425/article/10.1007/s00253-005-0157-9>.
14. **Costanzo, G., Saladino, R., Crestini, C. et al.** Formamide as the main building block in the origin of nucleic acids. *BMC Evol Biol.* Agosto 2007 [Citado: Agosto 24 de 2020], Vol. 7, 1. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-S2-S1>.
15. **Grochowski, Laura L., Huimin Xu, and Robert H.** An Iron(II) Dependent Formamide Hydrolase Catalyzes the Second Step in the Archaeal Biosynthetic Pathway to Riboflavin and 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin. *White Biochemistry.* 19 Mayo 2009 [Citado Agosto 25 de 2020], Vol. 48, 19. Disponible en: doi: 10.1021/bi802341p. PMID: 19309161..
16. **Swaroop Shiv, Sugghosh P. and Ramanathan Gurunath.** Biomineralization of N,N-dimethylformamide by *Paracoccus* sp. strain DMF . *Journal of Hazardous Materials.* Junio 2009 [Citado: Agosto 28 de 2020], Vol. 171, pp. 268–272. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/26661111\\_Biomineralization\\_of\\_NN-dimethylformamide\\_by\\_Paracoccus\\_sp\\_strain\\_DMF](https://www.researchgate.net/publication/26661111_Biomineralization_of_NN-dimethylformamide_by_Paracoccus_sp_strain_DMF).
17. **Sponer, Judit E., Mladek, Arnost., Sponer, Jiri and Fuentes-Cabrera, Miguel.** Formamide-Based Prebiotic Synthesis of Nucleobases: A Kinetically Accessible Reaction Route. *J. Phys. Chem. A.* 2011 [Citado: Agosto 28 de 2020], Vol. 116, pp. 720–726. Disponible en: [dx.doi.org/10.1021/jp209886b](https://doi.org/10.1021/jp209886b) |.
18. **Wang, Jing., Gu, Jiande., Nguyen, Minh Tho., Springsteen Greg. and Leszczynski, Jerzy.** From Formamide to Purine: An Energetically Viable Mechanistic Reaction Pathway. *J. Phys. Chem. B.* Enero 2013 [Citado: Septiembre 07 de 2020], Vol. 117, pp. 2314-2320. Disponible en: [dx.doi.org/10.1021/jp311423q](https://doi.org/10.1021/jp311423q) .
19. **Nguyen, Vinh Son., Orlando, Thomas M., Leszczynski, Jerzy and Nguyen, Minh Tho.** Theoretical Study of the Decomposition of Formamide in the Presence of Water Molecules. *J. Phys. Chem. A.* Marzo 2013 [Citado: Septiembre 22 de 2020], Vol. 117, p. 2543–2555. Disponible en: [dx.doi.org/10.1021/jp312853j](https://doi.org/10.1021/jp312853j) .
20. **Portela Dussan, Diana Daniela and Chaparro Giraldo, Alejandro and Lopez Pazos, Silvio.** La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Nova [online].* 23 Mayo 2013 [Citado: Enero 20 de 2021], Vol. 11, 20, pp. 87-96. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794>.
21. **de la Fuente-Salcido NM, Casados-Vázquez LE, Barboza-Corona JE.** Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. *Can J Microbiol.* 17 Junio 2013 [Citado: Octubre 02 de 2020], Vol. 59, 8, pp. 515-522. Disponible en: doi: 10.1139/cjm-2013-0284. Epub 2013 Jun 20. PMID: 23898994..
22. **Nguyen, Huyen Thi., Nguyen, Vinh Son., Nguyen Tien Trung, Remco W. A. Havenith and Nguyen, Minh Tho.** Decomposition Pathways of the Neutral and Protonated Formamide in Some Lower-Lying Excited States. *J. Phys. Chem. A.* Julio 2013 [Citado: Septiembre 22 de 2020], Vol. 117, p. 7904–7917. Disponible en: [dx.doi.org/10.1021/jp405657y](https://doi.org/10.1021/jp405657y).



23. **Hashimoto Yoshiteru, Sakashita Toshihide, Fukatsu Hiroshi , Sato Hiroyoshi and Kobayashi Michihiko.** A New Synthetic Route to N-Benzyl Carboxamides through the Reverse Reaction of N-Substituted Formamide Deformylase. *Applied and Environmental Microbiology*. 11 Octubre 2013 [Citado Mayo 02 de 2020], Vol. 80, 1. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910992/>.
24. **Wang, Jing., Gu, Jiande., Nguyen, Minh Tho., Springsteen, Greg and Leszczynski, Jerzy.** From Formamide to Adenine: A Self-Catalytic Mechanism for an Abiotic Approach. *J. Phys. Chem. B*. 22 Octubre 2013 [Citado: Octubre 07 de 2020], Vol. 117, p. 14039–14045. Disponible en: [dx.doi.org/10.1021/jp409296k](https://doi.org/10.1021/jp409296k).
25. **Ferus Martin, Michalčíkova Regina , Shestivska Violetta , Sponer Jiri , Sponer Judit E. and Civis Svatopluk.** High-Energy Chemistry of Formamide: A Simpler Way for Nucleobase Formation. *Phys. Chem. A*. Enero 2014 [ Citado: 04 de Mayo de 2021], Vol. 118, p. 719–736. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jp411415p>.
26. **Deschoenmaeker Frédéric, Facchini Raphael, Leroy Baptiste, Badri Hanene, Zhang C. and Wattiez Ruddy.** Proteomic and cellular views of *Arthrospira* sp. PCC 8005 adaptation to nitrogen 5 depletion. *Microbiology*. Marzo 2014 [Citado: Mayo 04 de 2021], Vol. 160, pp. 1224-1236. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/260951165\\_Proteomic\\_and\\_cellular\\_views\\_of\\_Arthrospira\\_s\\_p\\_PCC\\_8005\\_adaptation\\_to\\_nitrate\\_depletion](https://www.researchgate.net/publication/260951165_Proteomic_and_cellular_views_of_Arthrospira_s_p_PCC_8005_adaptation_to_nitrate_depletion).
27. **Almeida Melo André Luiz de, Thomaz Soccol Vanete, and Soccol Carlos Ricardo.** *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new. *Crit Rev Biotechnol*. 26 Septiembre 2014 [Citado: 21 de Enero de 2021], Vol. 1, pp. 1-10. Disponilbe en: DOI: 10.3109/07388551.2014.960793..
28. **Deist Benjamin R., Rausch Michael A., Fernandez Luna Maria Teresa, Adang Michael J.** Bt Toxin Modification for Enhanced Efficacy. *Toxins* . 22 Octubre 2014 [Citado: Octubre 02 de 2020], Vol. 6, pp. 3005-3027. Disponible en: [doi:10.3390/toxins61030](https://doi.org/10.3390/toxins61030).
29. **Sansinenea E, Ortiz A.** Melanin: a photoprotection for *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Biotechnol Lett*. Noviembre 2014 [Citado: Mayo 21 de 2020], Vol. 37, 3, pp. 483-490. Disponible en: [doi: 10.1007/s10529-014-1726-8](https://doi.org/10.1007/s10529-014-1726-8). Epub 2014 Nov 8. PMID: 25381045..
30. **Palma Leopoldo, Muñoz Delia, Berry Colin, Murillo Jesús and Caballero Primitivo.** *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins* . Diciembre 2014 [Citado Mayo 02 de 2020], Vol. 6, pp. 3296-3325. Disponible en: [doi:10.3390/toxins6123296](https://doi.org/10.3390/toxins6123296).
31. **Tho, Nguyen Huyen Thi and Nguyen Minh.** Decomposition pathways of formamide in the presence of vanadium and titanium monoxides. *Phys. Chem*. 01 Junio 2015 [Citado: Mayo 07 de 2021]. Dsponible en: [https://www.researchgate.net/publication/277560692\\_Decomposition\\_Pathways\\_of\\_Formamide\\_in\\_the\\_Presence\\_of\\_Vanadium\\_and\\_Titanium\\_Monoxides](https://www.researchgate.net/publication/277560692_Decomposition_Pathways_of_Formamide_in_the_Presence_of_Vanadium_and_Titanium_Monoxides).
32. **Ferus Martin, Knížek Antonín and Civiš Svatopluk.** Meteorite-catalyzed synthesis of nucleosides and other prebiotic compounds. *PNAS*. 9 Junio 2015 [Citado: Mayo 05 de 2020], Vol. 112, 23, pp. 7109-7110. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.1507471112>.

33. **Pietrucci, Fabio and Saitta, Antonino Marco.** Formamide reaction network in gas phase and solution via a unified theoretical approach: Toward a reconciliation of different prebiotic scenarios . *PNAS* . Julio 2015 [Citado: Diciembre 03 de 2020], Vol. 112 , 49, pp. 15030-15035. Disponible en: DOI: 10.1073/pnas.1512486112.
34. **Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S.** Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*. 17 Julio 2015 [Citado: Mayo 06 de 2020], Vol. 132, pp. 1- 41. Disponible en: doi: 10.1016/j.jip.2015.07.009. Epub 2015 Jul 27. PMID: 26225455..
35. **Nguyen Huyen Thi, Jeilani Yassin A., Hung Huynh Minh , and Nguyen Minh Tho.** Radical Pathways for the Prebiotic Formation of Pyrimidine Bases from Formamide. *J. Phys. Chem. A*. 21 Julio 2015 [Citado: Mayo 08 de 2020], Vol. 119, 33, pp. 8871–8883. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/280240660\\_Radical\\_Pathways\\_for\\_the\\_Prebiotic\\_Formation\\_of\\_Pyrimidine\\_Bases\\_from\\_Formamide](https://www.researchgate.net/publication/280240660_Radical_Pathways_for_the_Prebiotic_Formation_of_Pyrimidine_Bases_from_Formamide).
36. **Saladino Raffaele, Carota Eleonora, Botta Giorgia, Kapralov Michail, Timoshenko Gennady N., Rozanov Alexei, Krasavin Eugene and Di Mauro Ernesto.** First Evidence on the Role of Heavy Ion Irradiation of Meteorites and Formamide in the Origin of Biomolecules. *Orig Life Evol Biosph*. Diciembre 2015 [Citado: Mayo 07 de 2021]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/300375368\\_First\\_Evidence\\_on\\_the\\_Role\\_of\\_Heavy\\_Ion\\_Irradiation\\_of\\_Meteorites\\_and\\_Formamide\\_in\\_the-Origin\\_of\\_Biomolecules](https://www.researchgate.net/publication/300375368_First_Evidence_on_the_Role_of_Heavy_Ion_Irradiation_of_Meteorites_and_Formamide_in_the-Origin_of_Biomolecules).
37. **Bhushan Brij, Nayak Arunima and Kamaluddin.** Catalytic Role of Manganese Oxides in Prebiotic Nucleobases Synthesis from Formamide. *Springer*. 13 Enero 2016 [Citado: Mayo 07 de 2021], Vol. 46. Diponible en: DOI: 10.1007/s11084-015-9480-z.
38. **Sponer Judit E., Sponer Jiri, Novakova Olga, Brabec Viktor Sedo Ondrej, Zdrahal Zbyne, Constanzo Giovanna, Pino Samanta, Saladino Raffaele, and Di Mauro Ernesto.** Emergence of the First Catalytic Oligonucleotides in a Formamide-Based Origin Scenario. *Chem. Eur. J.* . 25 Enero 2016 [Citado: Mayo 20 de 2020], Vol. 22, 11, pp. 3572-3586. Disponible en: doi: 10.1002/chem.201503906. Epub 2016 Jan 25. PMID: 26807661.
39. **Ritesh, Dhooria Sahajal And Agarwal.** Amitraz, an underrecognized poison: A systematic review. *Indian J Med Res* . Septiembre 2016 [Citado: Mayo 21 de 2020], Vol. 144, pp. 348-358. Disponible en: DOI: 10.4103/0971-5916.198723.
40. **L, .** Bacillus thuringiensis-based biopesticides, are they as effective as they should be? *Rev Argent Microbiol*. Octubre 2016 [Citado: Mayo 23 de 2020]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.003>.
41. **Rotelli, L., Trigo-Rodríguez, J., Moyano-Camero, C. et al.** The key role of meteorites in the formation of relevant prebiotic molecules in a formamide/water environment. *Sci Rep*. Diciembre 2016 [Citado: Mayo 30 de 2020], Vol. 6. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep38888>.
42. **Raymond B, .** In defense of Bacillus thuringiensis, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity - a response to EFSA. . *Microbiol Ecol*. 22 Junio 2017 [Citado Junio 11 de 2020], Vol. 93, 7. Disponible en: doi: 10.1093/femsec/fix084..

43. **Kong, Z., Li, L., Wu, J., Zhang, T., & Li, Y.-Y. (2018).** Insights into the methanogenic degradation of N, N-dimethylformamide: the functional microorganisms and their ecological relationships. *Bioresource Technology*. 14 Septiembre 2018 [Citado: Junio 21 de 2020], Vol. 271, pp. 37-47. Disponible en: doi:10.1016/j.biortech.2018.09.074.
44. **R. Saladino, E. Di Mauro, J. M. García-Ruiz.** A Universal Geochemical Scenario for Formamide Condensation. *Chem. Eur. J.* Marzo 2019 [Citado: Mayo 24 de 2021], Vol. 25, 13, pp. 3181-3189. Disponible en: doi: 10.1002/chem.201803889. .
45. **Nov, Azizoglu U. 2019 and 76(11):1379-1385.** Bacillus thuringiensis as a Biofertilizer and Biostimulator: a Mini-Review of the Little-Known Plant Growth-Promoting Properties of Bt. . *Curr Microbiol.* Mayo 2019 [Citado: Mayo 26 de 2021], Vol. 76, 11, pp. 1379-1385. Disponible en: doi: 10.1007/s00284-019-01705-9.
46. **Jun, Heckel DG.** How do toxins from Bacillus thuringiensis kill insects? An evolutionary perspective. . *Insect Biochem Physiol.* . 12 Marzo 2020 [Citado: Julio 21 de 2021], Vol. 104, 2. Disponible en: doi: 10.1002/arch.21673.
47. **Pastorek A, Ferus M, Čuba V, Šrámek O, Ivanek O, Civiš S.** Primordial Radioactivity and Prebiotic Chemical Evolution: Effect of  $\gamma$  Radiation on Formamide-Based Synthesis. *J Phys Chem B.* 24 Septiembre 2020 [Citado: Julio 29 de 2021], Vol. 124, 41, pp. 8951-8959. Disponible en: doi: 10.1021/acs.jpcc.0c05233.
48. **Valtierra-de-Luis D, Villanueva M, Berry C, Caballero P.** Potential for Bacillus thuringiensis and Other Bacterial Toxins as Biological Control Agents to Combat Dipteran Pests of Medical and Agronomic Importance. *Toxins.* Diciembre 2020 [Citado: Julio 27 de 2021], Vol. 12, 12. Disponible en: doi: 10.3390/toxins12120773.
49. **social, Ministerio de trabajo y economía.** Formamida/Matenamida. *Instituto nacional de seguridad y salud en el trabajo.* Abril 2013[ Citado: 2 de Abril de 2021], p. 1. Disponible en: [https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_lang=es&p\\_card\\_id=0891&p\\_version=2](https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=es&p_card_id=0891&p_version=2).
50. **Ferus Martin, Pietrucci Fabio, Saitta Antonino Marco, Knizek Antonín, Petr Kubelík , Ondrej Ivanek ,Shestivska Violetta and Civiš Svatopluk.** Formation of nucleobases in a Miller–Urey reducing atmosphere. *PNAS.* Abril 2017 [Citado: 23 de diciembre de 2020], Vol. 114, 17, pp. 4306–4311. Disponible en: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1700010114](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1700010114).