

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE (R) Y (S)-CARVONA, SOBRE EL
METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL**

VIVIANA ANDREA SALAMANCA VILLAMIZAR



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE (R) Y (S)-CARVONA, SOBRE EL
METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL**

VIVIANA ANDREA SALAMANCA VILLAMIZAR

**Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de
Química**

DIRECTOR

STELIA CAROLINA MENDEZ SANCHEZ, Ph. D.

Escuela de Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE (R) Y (S)-CARVONA, SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL*

AUTORA: Viviana Andrea Salamanca Villamizar**

PALABRAS CLAVE: Carvona, fosforilación oxidativa, *Lippia Alba*, actividad enzimática.

RESUMEN

La identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial y extractos de *Lippia alba* han permitido establecer una lista de sustancias químicas con actividad farmacológica destacable que le atribuyen a la planta propiedades antisépticas, antifúngicas y antibacteriales de gran interés farmacológico.

En este trabajo, se centra el estudio en la acción de la (R) y (S)-carvona, sobre el proceso de fosforilación oxidativa que ocurre en la mitocondria.

Para determinar el efecto de los metabolitos sobre el proceso de fosforilación oxidativa se usaron mitocondrias aisladas de hígado de rata Wistar, suspendidas en medio compuesto por HEPES 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4), EGTA 0.1 mmol.L⁻¹, manitol 125 mmol.L⁻¹, KCl 65 mmol.L⁻¹. La respiración mitocondrial se indujo con la adición de glutamato 5 mmol.L⁻¹- malato 2,5 mM o succinato de sodio 3 mmol.L⁻¹, Pi 1.6 mmol.L⁻¹ e ADP 0.6 mmol.L⁻¹. La R y S-Carvona se adicionaron en diferentes concentraciones con una previa incubación de dos minutos con la proteína mitocondrial antes de inducir la respiración mitocondrial.

Los resultados obtenidos sugieren que la (R) y (S)-carvona presentan actividad enzimática significativa sobre la cadena de transporte de electrones, inhibiendo las enzimas NADH oxidasa, Succinato oxidasa y Succinato citocromo c reductasa. Las cuales cumplen papeles primordiales en la respiración y producción de energía en la célula. Esta actividad pone en evidencia la acción de estos metabolitos como posible fármaco.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Stelia Carolina Mendez Sanchez, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE MECHANISM OF ACTION OF R-CARVONE AND S-CARVONE, MAJOR METABOLITES OF *Lippia alba* (MILL) N.E BROW'S ESSENCIAL OIL, IN THE MITOCHONDRIAL ENERGY METABOLISM

AUTHOR: Viviana Andrea Salamanca Villamizar

KEY WORDS: Carvone, oxidative phosphorylation, *Lippia Alba*, enzyme activity.

DESCRIPTION

Identification of the major components of *Lippia Alba*'s essential oil and extracts have allowed to establish a list of chemical compounds with remarkable pharmacological activity, giving antiseptic, antifungal and antibacterial properties of great pharmacologic interest to the plant. This study focuses on the mechanism of action of R-carvone and S-carvone, major metabolites in the mitochondrial oxidative phosphorylation process.

Male Wistar rats were sacrificed to determine the effect of the metabolites in the oxidative phosphorylation process, the liver was pulled out and the mitochondria were isolated, an incubation medium was used composed by 10 mmol.L⁻¹ HEPES (Ph 67.4), 0.1 mmol.L⁻¹ EGTA, 125 mmol.L⁻¹ manitol, 65 mmol.L⁻¹ KCl, and mitochondrial respiration was induced by adding 5 mmol.L⁻¹ sodium glutamate, 3 mmol.L⁻¹ sodium succinate, 1.6 mmol.L⁻¹ Pi and 0.6 mmol.L⁻¹ ADP. Different concentrations of R-carvone and S-carvone were added with a prior two minutes incubation time with the mitochondrial protein before inducing mitochondrial respiration.

The results suggest that the R-carvone and S-carvone have an important enzyme activity, acting as complex I and II inhibitors in the oxidative phosphorylation and also as enzyme inhibitors of the NADH dehydrogenase, NADH-cytochrome c reductase, NADH oxidase, succinate dehydrogenase, succinate cytochrome c reductase and succinate oxidase, which fulfill primary roles on the cell respiration and energy production processes. This activity demonstrates the action of these metabolites as potential drugs/medications.

*Degree work.

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: Stelia Carolina Mendez Sanchez, Ph.D.

“

*... Trabaja sin descanso en lo que ames y cuando logres algo llámalo
"Objetivo". Luego sigue trabajando..."*

Max Ehrmann

A mis papitos Jaimito y Mormis

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que me ha brindado la fortaleza y la confianza para salir adelante y continuar caminando hacia las metas trazadas en mi proyecto de vida.

A mis padres por su amor, su apoyo incondicional y su esfuerzo constante por formarnos a mi hermana y a mí en la mejor calidad de vida en un hogar tan ejemplar. Gracias por ser la voz de aliento y el “empujoncito” para continuar luchando a pesar de las dificultades que nos ha presentado la vida.

A mi mocosa, Paula Daniella por todas nuestras aventuras, por tolerar mi inmadurez y ser en muchas ocasiones mi “hermana mayor”, por escucharme y aconsejarme, porque sé que cuento contigo en las buenas y en las malas.

A los que ya no están, Nicolas Felipe, porque desde tu partida mi vida es un antes y un después, estas presente en todos mis días.

A mi “madre no biológica”, Marcela Villamizar, no hay persona que me alegre más y me enoje menos y que, sin importar que tan jodido sea el asunto, esté dispuesta a sacar lo mejor de ella misma, porque nadie me conoce como tú.

A mi mejor amiga, Laura Moreno, porque ya hemos comprobado que nuestra amistad supera las barreras de tiempo y lugar.

A la profe Stelia Carolina Méndez Sánchez, por confiar en mis capacidades y permitirme crecer a nivel profesional y personal al desarrollar mi trabajo de grado bajo su dirección. Gracias por todo el tiempo dedicado al desarrollo de mi tesis.

A mis compañeros del grupo Investigación en Bioquímica y Microbiología, por sus colaboración en este proceso de aprendizaje, especialmente a Marilyn Álvarez, Oveimar Barbosa, Marlon Caceres, Diana Montagut y Sharon Smith.

A mis chicas: Melissa Cely, por su amistad y por siempre querer discutir conmigo; a Mai Salazar, por acompañarme y aconsejarme en mis dilemas diarios; a Mayrita Patiño por

guardarme alimento mientras escribía desesperadamente y a Maya Rodríguez, por siempre decirme las cosas justo en el momento correcto.

Al club: Alejandra, Cindy, July, Gloria, Linda, Carito, Pao y Susa, por tantas alegrías a su lado, porque de todas he aprendido algo que prevalecerá por siempre en mi vida.

A mis chicos: Mi negro, por ser un “morso” incondicional y reconocer que yo soy la que mando, Nando y Camilo, por esas tardes de series y risas, a Gerson, Mao, Pipe y Jasson, que siempre estuvieron dispuesto a escucharme y aconsejarme académicamente y emocionalmente.

Gracias a todos porque hicieron de este ciclo de mi vida una inolvidable.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	14
LISTA DE ANEXOS	15
ANEXO A. Certificado 30 Congreso Latinoamericano de Química 2012 celebrado en Cancún-Mexico.....	52.. 15
ANEXO B. Certificado XIV Encuentro Nacional de Estudiantes de Química-UIS 2012.....	53.. 15
INTRODUCCION	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
OBJETIVOS.....	18
1. MARCO TEORICO.....	19
1.1. <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown.....	19
1.1.1 Importancia comercial.....	19
1.1.2 Etnofarmacología	20
1.1.3 Composición química.....	20
1.1.3.1 Carvona.....	22
1.2. Mitocondria	23
1.2.1. Estructura y composición	24
1.2.1.1. Membrana externa	25
1.2.1.2. Membrana interna	25
1.2.1.3. Espacio intermembranoso	26
1.2.1.4. Matriz mitocondrial	26
1.2.2. Función.....	26
1.2.3. Mitocondria como diana farmacológica.....	27
1.3. Fosforilación oxidativa	29
1.3.1. Complejos proteicos de la cadena de transporte de electrones	31
1.3.2. Inhibidores de la cadena de transporte de electrones	33
1.3.3. Control respiratorio.....	34
2. MATERIALES Y METODOS	36
2.1. Aislamiento de mitocondrias	36
2.2. Cuantificación de proteínas.....	36

2.3.	Determinación del consumo de oxígeno	37
2.4.	Preparación de la suspensión de mitocondrias para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales.....	37
2.5.	Determinación de la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial.	37
2.5.1.	NADH Oxidasa	38
2.5.2.	NADH Citocromo c reductasa	38
2.5.3.	NADH deshidrogenasa	38
2.5.4.	Succinato Oxidasa	39
2.5.5.	NADH Citocromo c reductasa	39
2.5.6.	Succinato deshidrogenasa	39
2.6.	Análisis estadístico	39
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
3.1.	Análisis control respiratorio	40
3.2.	Análisis de la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial.....	44
3.2.1.	NADH oxidasa	44
3.2.2.	NADH citocromo c reductasa	45
3.2.3.	NADH deshidrogenasa	46
3.2.4.	Succinato oxidasa	46
3.2.5.	Succinato citocromo c reductasa	47
3.2.6.	Succinato deshidrogenasa	48
4.	CONCLUSIONES.....	51
5.	RECOMENDACIONES.....	52
6.	PUBLICACIONES	53
	BIBLIOGRAFÍA.....	54
	ANEXOS.....	61
	ANEXO A.....	61
	Certificado 30 Congreso Latinoamericano de Química 2012 celebrado en Cancún-Mexico.	61
	ANEXO B.....	62
	XIV Encuentro Nacional de Estudiantes de Química-UIS 2012	62
	ANEXO C.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los enantiómeros R y S-carvona. Tomado de Afuna et al. 2011.	22
Figura 2. Estructura mitocondrial de una célula eucariota	25
Figura 3. Esquema del bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (sombreado).....	31
Figura 4. Diagrama de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa asociada.	32
Figura 5. Estructura química de algunos inhibidores de la cadena de transporte de electrones. Tomado de Rizzuto & Brini, 2009.	33
Figura 6. Control respiratorio, la relación entre la respiración en el estado 3 y el estado 4. Tomado de Voss, 1941.	35
Figura 8. Efecto de los enantiómeros de carvona sobre la respiración mitocondrial en presencia de ADP. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).	41
Figura 9. Efecto de los enantiómeros de carvona sobre la respiración mitocondrial tras el agotamiento de ADP. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres	
Figura 10. Efecto de los enantiómeros de carvona sobre el coeficiente de control respiratorio para glutamato y succinato. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).	43

Figura 11. NADH oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$). .. 45

Figura 12. NADH citocromo c reductasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$). 45

Figura 13, NADH deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$). 46

Figura 14. Succinato oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$). 47

Figura 15. Efecto de los enantiómeros de carvona sobre la Succinato citocromo c reductasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).46

Figura 16. Efecto de los enantiómeros de carvona sobre la Succinato deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$). 48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos inhibidores de los complejos de la cadena transportadora de electrones y sus respectivas patologías. Tomado de Cooper & Schapira, 2010.....	27
---	----

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Certificado 30 Congreso Latinoamericano de Química 2012 celebrado en Cancún-Mexico.....	52
ANEXO B. Certificado XIV Encuentro Nacional de Estudiantes de Química-UIS 2012.....	53
ANEXO C. Certificado I Congreso Latinoamericano de estudiantes de Química pura y Aplicada-UIS 2012.....	54

INTRODUCCION

La especie *Lippia alba* registra propiedades farmacológicas importantes para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas por lo cual se ha despertado un creciente interés en su actividad como posible fármaco. La identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial y extractos de *Lippia alba* permitieron establecer una lista de sustancias químicas con actividad biológica destacable que le atribuyen a la planta propiedades antisépticas, antifúngicas y antibacteriales de gran interés farmacológico. (Pascual, Carretero & Sánchez, 2001; Bailleul & Hennebel, 2008).

Este estudio se centra en la acción de dos metabolitos mayoritarios del aceite esencial de *Lippia alba*, la R y S-Carvona, sobre el proceso de fosforilación oxidativa que ocurre en la mitocondria.

La mitocondria lejos de ser una simple fábrica de ATP, alberga en su interior moléculas de naturaleza proteica que una vez liberadas al citoplasma son capaces de activar cascadas de señalización que conducen a la muerte de la célula (Kroemer et al., 2000). Es gracias a estas propiedades que se ha aumentado el estudio de fármacos que modulan las funciones mitocondriales, porque permitirá un mejor abordaje terapéutico de un conjunto de patologías, entre las que podemos destacar las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la de Parkinson, la esclerosis y las encefalopatías transmisibles (Green & Reed, 1998). Es debido a la importancia que, en el campo de la Farmacología, está adquiriendo el estudio de la mitocondria se ha producido un gran avance en el desarrollo de técnicas bioquímicas que permiten el estudio de la acción de fármacos sobre esta organela. Se dispone de técnicas tanto in situ, en las que las mitocondrias se encuentran dentro de células intactas; como de mitocondria aislada que requieren la purificación de las mismas (Vergun et al., 2003).

Por esta razón, el grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología, contribuye al conocimiento del mecanismo de acción del aceite esencial de *Lippia alba*, y en este proyecto se estudio el mecanismo de acción que ejerce la R y S-Carvona (dos de sus metabolitos secundarios mayoritarios) sobre el proceso de fosforilación oxidativa, en mitocondrias de hígado de rata Wistar.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En general todas las áreas de investigación buscan el mejoramiento de algún aspecto de la vida humana, pero tal vez el más importante sea el sector salud. Desde su formación la industria farmacológica cumple un papel trascendental al dedicar su investigación al descubrimiento y fabricación de productos químicos medicinales para el tratamiento y prevención de enfermedades. Es importante resaltar que la industria farmacológica es actualmente uno de los sectores empresariales más rentables e influyentes de nuestra sociedad. A pesar de las numerosas investigaciones realizadas para el mejoramiento de tratamientos de enfermedades que afectan a un porcentaje importante de la población, como lo reporta la organización mundial de la salud para el caso específico de las enfermedades neurodegenerativas que afectan un 42% de la población mundial, no se ha conseguido un nuevo tratamiento ni el mejoramiento de los ya existentes (Skulachev et al., 1999).

Muchas de las investigaciones desarrolladas sobre la *Lippia Alba*, han permitido la identificación de sus metabolitos mayoritarios, que consisten en una amplia lista de sustancias químicas con actividad biológica y propiedades antisépticas, antifúngicas y antibacteriales (Aguilar, 2012; Haldar 2012; Lozada 2012; Tangarife et. al 2012). Sin embargo no existe ningún reporte previo de investigación, sobre el mecanismo de acción de metabolitos mayoritarios de *Lippia alba* que permitan establecer su actividad farmacológica a nivel celular y contribuyan al desarrollo y mejoramiento de nuevos tratamientos de enfermedades neurodegenerativas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Contribuir al conocimiento del mecanismo de acción de R y S-Carvona sobre el metabolismo energético mitocondrial.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la R y S-Carvona sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de hígado de rata.
- Evaluar los efectos de la R y S-Carvona sobre la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria.
- Identificar el efecto de los metabolitos evaluados en el proceso de fosforilación oxidativa.

1. MARCO TEORICO

1.1. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown

La planta pertenece a la familia Verbenaceae, en la que se incluyen cerca de 70 géneros y 2000 especies que se distribuyen en casi todas las regiones del planeta. Esta familia es más abundante en las regiones tropicales y subtropicales, donde se encuentra como hierbas, arbustos y árboles y tiene valor económico por algunos productos ornamentales y medicinales (Leclercq & Delgado 1999, Gómes 1993). El género *Lippia* está constituido por cerca de 200 especies, que incluyen hierbas, arbustos y pequeños árboles. Estas especies se encuentran distribuidas principalmente en América Central, América del Sur y África tropical (Tangarife & Roa, 2012). Es una especie ampliamente utilizada en América Central y Suramérica con diferentes propósitos medicinales. En general, el uso tradicional y popular de *Lippia alba* en América está referido principalmente a la infusión de las hojas y las flores. Se emplea para trastornos gastrointestinales o digestivos, como antiespasmódico en cólicos hepáticos y como expectorante, febrífugo y sudorífico. Además, se le atribuyen actividades antisépticas, astringentes y emenagogas (Craveiro et al., 2011, Dellacassa et al., 2009).

Esta planta ha sido utilizada como remedio casero a través de los siglos, y se reporta que su uso se remonta al año 1848 cuando la esclavitud fue autorizada en Francia y los esclavos negros no tenían el derecho del uso y venta de plantas medicinales, era del conocimiento de los esclavos negros las propiedades medicinales de muchas plantas entre ellas la *Lippia alba*, no fue un remedio utilizado y reconocido para el tratamiento de los colonos blancos por su origen cultural. Con la abolición de la esclavitud la *Lippia alba* se convirtió en la primera planta medicinal extranjera aprobada para su inclusión en la Farmacopea Francesa (Pascal et al., 2001; Dorta et al., 2005).

1.1.1 Importancia comercial

La planta tiene importancia económica en América Central, ya que se vende en los mercados populares y se emplea en la industria de tisanas (CATIE 1995) y en

preparaciones medicinales. En Colombia, la industria emplea material para tisanas con propósito digestivo, para comprimidos y encapsulados así como en sales para baños y para cremas (Gutiérrez 2003).

Por otro lado en países como Costa Rica, se encuentra en la forma comercial de bolsitas-filtro, para infusión y como parte de la fórmula de algunos productos para el tratamiento de resfriados (congestión de vías respiratorias) y contra el reumatismo (preparaciones con base en extractos alcohólicos, algunas veces combinados con extractos de saragundí (*Senna alata*, *Fabaceae*) y de chile (*Capsicum spp.*, *Solanaceae*). En la Farmacopea Vegetal Caribeña se indica la decocción de la hoja fresca, vía oral, como un uso tradicional significativo para la gripe y el resfriado (Robineau-Germosén 2005).

1.1.2 Etnofarmacología

Mucha de la evidencia farmacológica y medicinal de la planta se basa en usos de medicina tradicional. Por ejemplo un estudio realizado en torno a tres ciudades en el estado de Sao Paulo, mostraron un uso generalizado de las hojas de *Lippia alba* por infusión para aliviar problemas de hipertensión, digestivos y náuseas, así como para sanar heridas a nivel local y en forma de jarabe para la tos y la bronquitis, estos mismos usos se citan para los curanderos provenientes de México. En la localidad de Sapucaia Cruz das Alma, se utiliza como sedante y también contra la hipertensión, la flatulencia y el dolor en general. En Itacaré-Brasil se utiliza contra el dolor de estomago y trastornos digestivos. En San José de Pare Boyacá se utiliza como analgésico, contra trastornos digestivos, diarrea, gripe y tos (Pascal, 2001). Todos estos reportes ubican a la *Lippia alba* entre las diez especies con mayor LSU (nivel significativo de uso) (Bailleul, 2008).

1.1.3 Composición química

En función del biotopo (días de sol, clima, composición del suelo, altitud, etc.), una misma planta puede secretar esencias muy diferentes desde el punto de vista

bioquímico (Pino, 1996). De estas variaciones de composición bioquímicas de los aceites esenciales surge la noción de quimiotipo. Dos quimiotipo del mismo aceite esencial presentan no solamente propiedades terapéuticas diferentes sino también índices de toxicidad variables (Stashenko et. al, 2013).

Por ejemplo, en plantas que crecen en Argentina se encontraron varios quimiotipos, que tienen como constituyentes mayoritarios lippiona (1,2-epoxipulegona) (Retamar 1994), dihidrocarvona (Fester et al. 1961a), citral y 1,8-cineol (Fester et al. 1961b), y un cuarto tipo con piperitona (36,7%) y limoneno (34,2%) (Catalán et al. 1977). En la región de São Paulo, al sureste de Brasil (Frighetto et al. 1998, Siani et al. 2002) se encontró otro tipo, que contiene como constituyentes principales S-linalol (78,9%) y 1,8-cineol (6,5%), hallado también en plantas obtenidas en condiciones experimentales, provenientes de Paraje Las Brujas, Canelones, Uruguay (Lorenzo et al. 2001) con más del 55% de linalol (Ricciardi et al., 1999). Se informó de un quimiotipo de plantas que crecen en Uruguay, en el que los constituyentes principales del aceite son alcanfor (18,2%) y 1,8-cineol (16,5%) (Dellacassa et al. 1990), además de la existencia del quimiotipo linalol (Lorenzo et al. 2001).

El aceite de *L. alba* recolectada en Manaus, Brasil (Craveiro et al. 1981), posee β -cariofileno (24,3%), geranial (12,9%), neral (9,6%) y 2-undecanona (9,0%), mientras que otro tipo químico de Brasil, cultivado en Paraná, presentó γ -terpineno (46,7%), p-cimeno (8,7%) y β -cariofileno (7,2%) como constituyentes mayoritarios (Gómes et al. 1993). Las plantas cultivadas en la región noreste de Brasil presentaron dos quimiotipos: uno con neral (27,2-30,4%), geranial (35,6-41,0%) y limoneno (9,1-13,1%) y otro con carvona (42,3-54,7%), limoneno (23,2-30,4%) y p-cimeno (3,1-10,6%) (Fun & Baerheim-Svendsen 1990, Matos et al. 1996). En América del Norte, el aceite esencial obtenido de plantas cultivadas en macetas (en Delaware), procedentes de Sinaloa, México, dio un nuevo quimiotipo en el que los constituyentes mayoritarios son metilchavicol (estragol) (56,5%), 1,8-cineol (12,6%) y canfeno (7,0%) (Tucker & Maciarelo 1999). En Guatemala se encontró un quimiotipo con neral (17,6 - 18,9%), geranial (24,7 - 27,0%) y 1,8-cineol (20,3 - 25,4%) (Fischer et al. 2004). Un nuevo quimiotipo que contiene mircenona (37,8 - 58,2%) y (Z)-ocimenona (11,1 - 16,3%) se encontró en Guatemala (Fischer et al. 2004), en las regiones del Pacífico y del centro

de Costa Rica (Ciccio & Ocampo 1998) y en la provincia de Corrientes, Argentina (Richiardi. 1999).

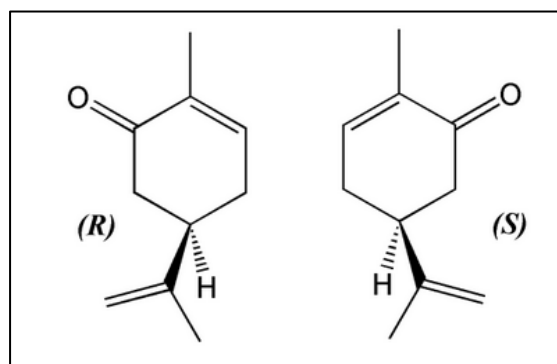
En Cuba (Pino et al. 1996) se reportó de un tipo semejante a este último de Brasil, que presentó carvona (29,0 - 40,0%), piperitenona (6,4 - 8,3%), limoneno (5,8 - 6,5%) y β -guaiano (9,8 - 11,5%) como compuestos mayoritarios. El quimiotipo carvona también se encontró en plantas recolectadas en Iquitos, Perú (Leclercq et al. 1999) con un 63,4% de carvona, 5,6% de germacreno D y un 5,1% de limoneno. También en material cultivado en la región caribe de Costa Rica se encontró el quimiotipo carvona-limoneno (Ciccio & Ocampo 2004), que también se encontró en Bucaramanga, Colombia, donde se determinó que el aceite es rico en S-carvona (41 - 57%) (Stashenko et al. 2004).

Se reportan entonces aproximadamente 19 quimiotipos de la especie *Lippia alba* en los cuales es característica la presencia de flavonoides, biflavonoides, feniletanos, iridioides, terpenos y glucósidos de flavona.

1.1.3.1 Carvona

El aceite esencial de *L. alba*, que crece en Santander (Colombia), fue rico en dos compuestos, el limoneno (24-37%) y la carvona (40-57%) (Afouna et al., 2011); el último es un ingrediente de alto valor y uso en muchos productos cosméticos y perfumes.

Figura 1. Estructura química de los enantiómeros R y S-carvona. Tomado de Afouna et al. 2011.



La (\pm)-carvona es un monoterpene aislado de aceites esenciales comúnmente usados como saborizante de alimentos. Presenta un centro quiral y existe en la naturaleza como ambos enantiómeros (figura 1). Sus enantiómeros muestran la influencia de la

quiralidad en la percepción olfativa: mientras que el enantiómero R tiene olor a menta, el enantiómero S tiene un olor completamente diferente, comino (Oosterhaven 1996).

La carvona tiene propiedades antimicrobianas contra *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* (Barbara et. al 2013). También es activo en la repelencia contra moscas y mosquitos (Ciccio, 2006). El (\pm)-carvona se utiliza comercialmente en dentífricos y de higiene personal, por lo general en las esencias de ambientadores y repelentes de mosquitos (Festar, 2010). También se utiliza para inducir quiralidad en síntesis orgánica, especialmente teniendo en cuenta el bajo precio y la pureza de los estereoisómeros que se obtienen, lo que hace atractivo en procesos de síntesis quirales a (Afouna et al., 2011).

1.2. Mitocondria

La mitocondria es la organela donde se enfoca esta investigación, debido a los importantes procesos que se desarrollan en ella y a los recientes estudios realizados como diana farmacológica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Green, 2008). Las mitocondrias son orgánulos celulares encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular. Actúan, por lo tanto, como centrales energéticas de la célula y sintetizan ATP a expensas de los carburantes metabólicos (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos) (Jordan, 2003). La mitocondria presenta una membrana exterior permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos. Eso es debido a que contiene proteínas que forman poros llamados porinas o VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje), que permiten el paso de moléculas de hasta 10 kDa y un diámetro aproximado de 2 nm. (Skulachev et al., 2009).

El descubrimiento de las mitocondrias fue un hecho colectivo. El gran número de términos que se refieren a este orgánulo es prueba de ello: Blefaroplasto, condrioconto, condriómitos, condrioplastos, condriosomas, condriosferas, fila, gránulos fucsinofílicos, Korner, Fadenkörper, mitogel, cuerpos parabasales, vermículas, sarcosomas, cuerpos

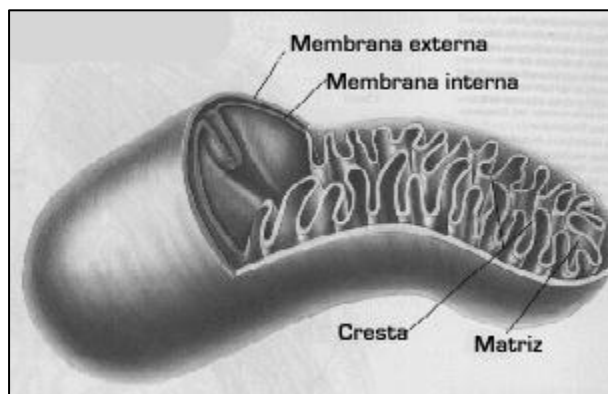
intersticiales, plasmosomas, plastocondrios, bioblastos. Cowdry intentó en 1918, en un trabajo luego citado por Lehninger, sistematizar y unificar todos los términos (Wallance et al., 2007).

Probablemente las primeras observaciones se deben al botánico suizo Kolliker, quien en 1880-1888 notó la presencia de unos gránulos en células musculares de insectos a los que denominó sarcosomas. Llegó incluso a la conclusión de que presentaban membrana. En 1882, el alemán Flemming descubrió una serie de inclusiones a las que denominó fila. Sin embargo, el nombre de mitocondria, que es el que alcanzó mayor acogida, se debe a Carl Benda, quien en 1889 denominó así a unos gránulos que aparecían con gran brillo en tinciones de cristal violeta y alizarina, y que anteriormente habían sido denominados citomicrosomas por Velette. En 1904 Meves confirma su presencia en una planta y en 1913 Heinrich Warburg descubre la asociación con enzimas de la cadena respiratoria, aunque ya Kingsbury, en 1912 había relacionado estos orgánulos con la respiración celular. En 1934 fueron aisladas por primera vez a partir de homogeneizados de hígado y en 1948 Hogeboom, Schneider y Palade establecen definitivamente la mitocondria como el lugar donde se produce la respiración celular (Jordan , 2003).

1.2.1. Estructura y composición

La morfología de la mitocondria es difícil de describir puesto que son estructuras muy plásticas que se deforman, se dividen y fusionan. Normalmente se las representa en forma alargada. Su tamaño oscila entre 0,5 y 1 μm de diámetro y hasta 7 μm de longitud. Su número depende de las necesidades energéticas de la célula. Al conjunto de las mitocondrias de la célula se le denomina condrioma celular. Las mitocondrias están rodeadas de dos membranas claramente diferentes en sus funciones y actividades enzimáticas, que separan tres espacios: el citosol, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (figura 2) (Emelyanov, 2003).

Figura 2. Estructura mitocondrial de una célula eucariota



1.2.1.1. Membrana externa

La membrana mitocondrial externa posee gran número de porinas, que son proteínas transmembranales de paso múltiple. Cada porina forma un gran conducto acuoso a través del cual pueden pasar moléculas hidrosolubles de hasta 10 kDa. Como esta membrana es relativamente permeable a las moléculas pequeñas, como por ejemplo proteínas. El contenido del espacio intermembranal se parece al citosol. Las proteínas adicionales que están en la membrana externa son las encargadas de la formación de los lípidos mitocondriales. Contiene entre un 60 y un 70% de proteínas (Cheng & Kimura,2008).

1.2.1.2. Membrana interna

La membrana mitocondrial interna, que encierra al espacio de la matriz, está replegada para formar crestas. Esta membrana está ricamente dotada de cardiolipina, fosfolípido que posee cuatro cadenas aciladas grasas en vez de las dos ordinarias. La presencia de este fosfolípido en alta concentración vuelve a la membrana interna casi impermeable a iones, electrones y protones (Ardail & Privat, 1990).

Las membranas mitocondriales interna y externa establecen contacto entre sí en ciertas regiones; estos sitios de contacto actúan como vías para las proteínas y las pequeñas moléculas que entran y salen del espacio de la matriz. Estos sitios de contacto están compuestos por proteínas transportadoras que conducen a proteínas regulatorias para el reconocimiento de los marcadores que indican la transportabilidad de macromoléculas específicas. Estos mismos sitios de contacto se utilizan también para el transporte de proteínas hacia el espacio intermembranal, en tanto las proteínas cuentan con marcadores específicos para su entrada en dicho espacio (Cheng & Kimura,1983). En la

mayoría de los eucariontes, las crestas forman tabiques aplanados perpendiculares al eje de la mitocondria, pero en algunos protistas tienen forma tubular o discoidal. En la composición de la membrana interna hay una gran abundancia de proteínas (un 80%), que son además exclusivas de esta organela (Emelyanov, 2003).

1.2.1.3. Espacio intermembranoso

Entre ambas membranas queda delimitado un espacio intermembranoso que está compuesto de un líquido que tiene una alta concentración de protones como resultado del bombeo de los mismos por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. En él se localizan diversas enzimas que intervienen en la transferencia del enlace de alta energía del ATP, como la adenilato kinasa o la creatina quinasa. También se localiza la carnitina, una molécula implicada en el transporte de ácidos grasos desde el citosol hasta la matriz mitocondrial, donde serán oxidados (Ardail & Privat, 1990).

1.2.1.4. Matriz mitocondrial

En la matriz mitocondrial tienen lugar diversas rutas metabólicas clave para la vida, como el ciclo de Krebs y la beta-oxidación de los ácidos grasos; también se oxidan los aminoácidos y se localizan algunas reacciones de la síntesis de urea y grupos hemo (Cheng & Kimura, 1983).

1.2.2. Función

La principal función de las mitocondrias es generar energía para mantener la actividad celular mediante procesos de respiración aerobia. Los nutrientes se escinden en el citoplasma celular para formar ácido pirúvico que penetra en la mitocondria. En una serie de reacciones, parte de las cuales siguen el llamado ciclo de Krebs o del ácido cítrico, el ácido pirúvico reacciona con agua para producir dióxido de carbono y diez átomos de hidrógeno. Estos átomos de hidrógeno se transportan hasta las crestas de la membrana interior a lo largo de una cadena de moléculas especiales llamadas coenzimas (Rourke, 2002).

Una vez allí, las coenzimas donan los hidrógenos a una serie de proteínas enlazadas a la membrana que forman lo que se llama una cadena de transporte de electrones. La cadena de transporte de electrones separa los electrones y los protones de cada uno de los diez átomos de hidrógeno. Los diez electrones se envían a lo largo de la cadena y acaban por combinarse con oxígeno y los protones para formar agua. La energía se libera a medida que los electrones pasan desde las coenzimas a los átomos de oxígeno y se almacena en compuestos de la cadena de transporte de electrones. A medida que éstos pasan de uno a otro, los componentes de la cadena bombean aleatoriamente protones desde la matriz hacia el espacio comprendido entre las membranas interna y externa. Los protones sólo pueden volver a la matriz por una vía compleja de proteínas integradas en la membrana interior. Este complejo de proteínas de membrana permite a los protones volver a la matriz sólo si se añade un grupo fosfato al compuesto difosfato de adenosina (ADP) para formar ATP en un proceso llamado fosforilación. El ATP se libera en el citoplasma de la célula, que lo utiliza prácticamente en todas las reacciones que necesitan energía. Se convierte en ADP, que la célula devuelve a la mitocondria para volver a fosforilarlo (Cheng & Kimura, 1983; Rourke, 2002).

1.2.3. Mitocondria como diana farmacológica

La farmacología se ha centrado, en los últimos años, en la búsqueda de nuevas dianas sobre las que actuar en el campo de los procesos degenerativos, que abarca patologías tan dispares como las enfermedades neurodegenerativas, algunas miopatías, la diabetes y los procesos de envejecimiento. Los expertos aseguran que dentro de unos años podríamos estar hablando de una auténtica farmacología mitocondrial (Cooper & Schapira, 2007).

La mitocondria sin duda es, en los tiempos que corren, es el denominador común de muchos de los estudios que abordan los procesos de muerte celular, tanto apoptótica como necrótica. Debido, a que la mitocondria, lejos de ser una simple fábrica de ATP, alberga en su interior moléculas de naturaleza proteica que una vez liberadas al citoplasma son capaces de activar cascadas de señalización que conducen a la muerte de la célula. Además, en su sistema de doble membrana podemos encontrar los mecanismos que controlan esta liberación. La mitocondria posee las claves de muchas de las rutas que producen esta muerte. Sugiriendo que es de gran importancia el estudio de

fármacos que modulan las funciones mitocondriales, porque permitirá un mejor abordaje terapéutico para las patologías neurodegenerativas (Green & Reed, 2008). Los estudios señalan que las enfermedades neurodegenerativas se relacionan con disfunciones mitocondriales de diferente tipo (tabla 1). Mutaciones en proteínas mitocondriales pueden conducir a un descenso en la producción de ATP, formación de radicales libres y alteraciones en la homeostasis del calcio en la célula (Cooper & Schapira, 2010).

Tabla 1. Fármacos inhibidores de los complejos de la cadena transportadora de electrones y sus respectivas patologías. Tomado de Cooper & Schapira, 2010.

Complejo	Fármaco inhibidor	Alteraciones
I	Rotenona Amital	Enfermedad de Alzheimer Parkinson Cardiomiopatía Enfermedad de Leber Miopatías Enfermedad de Leigh
II	TTFA malonato	Miopatías Paraganglioma Feocromocitoma Enfermedad de Leigh
III	Anticimina A	Cardiomiopatía Enfermedad de Leber Miopatías
IV	Cianida Monóxido de carbono Acida	Ataxia Enfermedad de Alper Enfermedad de Leber Rabdomiolisis
V	Cianida Monóxido de carbono	Enfermedad de Leber Enfermedad de Leigh

Por ejemplo, en la paraplejía espástica hereditaria, se encuentra mutada la paraplegina, una metaloproteasa mitocondrial que da lugar a defectos en la fosforilación oxidativa. Otro ejemplo es la ataxia de Friedreich, en la que se encuentra mutada la proteína mitocondrial fraxina requerida para el mantenimiento de la homeostasis de hierro y el contenido en ADN. Disfunciones mitocondriales también desempeñan un papel esencial en otras

enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson, Huntington y Alzheimer. Además, en sistemas donde no se lleva a cabo un reemplazamiento o una renovación celular, como es el sistema nervioso, se pueden acumular mutaciones somáticas mitocondriales que, sumadas al descenso en la función mitocondrial, pueden ser la causa del envejecimiento y la senescencia (Wallance & Starkov, 2000).

La actividad de las reacciones enzimáticas que abastecen energéticamente a la célula puede verse reducida o comprometida debido a un aporte inadecuado de oxígeno a las células como ocurre en procesos de arteriosclerosis, anemia o alcoholismo. En algunos casos, esta actividad puede verse también reducida por alteraciones genéticas, como se han descrito en pacientes con neuropatía óptica hereditaria de Leber que presentan mutaciones en el complejo I, y una reducción de su actividad se ha observado en pacientes de Parkinson (Cooper & Schapira, 2010). En este sentido, algunas neurotóxicas o sus metabolitos pueden ser causa o contribuir a la enfermedad de Parkinson, como la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), y su metabolito MMP+, inhibidores de estos complejos enzimáticos, y que hoy día constituyen parte de las herramientas farmacológicas utilizadas como inductores en modelos experimentales para el estudio de los mecanismos celulares que tienen lugar en estas enfermedades degenerativas (Green & Reed, 2008). Es debido a toda esta evidencia recolectada y por la capacidad reguladora de los procesos de muerte celular por parte de la mitocondria, que esta se convierte en la organela de estudio de fármacos con actividades tanto proapoptóticas, con el fin de matar la célula, como antiapoptóticas, con el fin de prevenir su muerte (Wallance & Starkov, 2100; Eposti, 2012).

1.3. Fosforilación oxidativa

La acetil CoA, formada por oxidación β de los ácidos grasos y la degradación de la glucosa, se oxida en el ciclo del ácido cítrico para producir, además de CO₂, grandes cantidades de los cofactores reducidos de la NADH (dinucleótido de nicotidamida y adenina). Cada uno de estos cofactores descarga un ión hidruro (H⁻) que está desprovisto de sus dos electrones de alta energía y que se convierte en protón (H⁺). Los electrones se transfieren a la cadena de transporte de electrones y durante la respiración mitocondrial reducen al O₂ para formar agua (Hatefi, 2005).

Las grandes cantidades de NADH que resultan de la actividad del ciclo del ácido cítrico pueden utilizarse para biosíntesis reductiva, sin embargo el potencial reductor del NADH es más frecuentemente utilizado para dar energía para la síntesis de ATP por la vía de la fosforilación oxidativa. La oxidación del NADH con la fosforilación del ADP para formar ATP son procesos que se hacen con el apoyo del transporte de electrones de la mitocondria y por la sintasa de ATP, que son complejos proteicos que se encuentran en la membrana mitocondrial interna (Saraste, 1999). La cadena de transporte de electrones está compuesta por una serie de complejos proteicos que catalizan reacciones secuenciales de oxidación y reducción (Hatefi, 2005). La translocación de protones y el desarrollo de un gradiente de protones transmembrana proveen el mecanismo de acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP (Tornero, 2012).

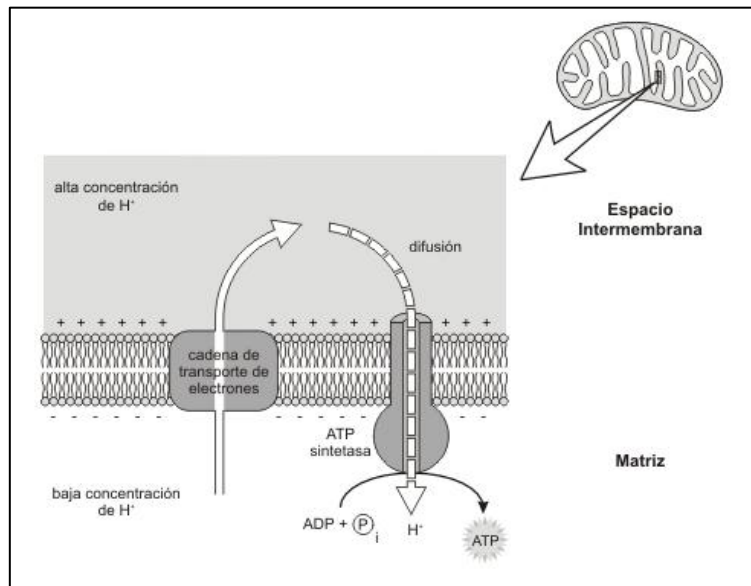
Durante mucho tiempo se intentó explicar la naturaleza del enlace entre la cadena respiratoria y el sistema de fosforilación. En 1961, Mitchell propuso la hipótesis quimiosmótica, que es la que actualmente se acepta. Esta hipótesis ha sido apoyada por las evidencias experimentales encontradas en distintos laboratorios, lo que le valió a Mitchell el premio Nobel en 1978 (Cooper, 2010). Esta teoría señala que la energía descargada por la transferencia sucesiva de los electrones se utiliza para transportar H⁺ desde la matriz hacia el espacio intermembranal, con lo que se establece una concentración elevada de protones en dicho espacio que ejerce una fuerza motriz de protones (Tornero, 2012). Sólo por medio de la ATP sintetasa pueden estos protones dejar el espacio intermembranal y reintegrarse en la matriz. Al pasar estos protones corriente abajo por este gradiente electroquímico, el diferencial de energía de la fuerza motriz de protones se transforma en el enlace estable de alta energía de ATP por acción de la cabeza globular de la subunidad de la membrana interna, que cataliza la formación de ATP a partir de ADP + Pi. El ATP recién formado es utilizado por la mitocondria o se transporta, por medio de un sistema antiporte de ADP y ATP, hacia el citosol. Durante todo el proceso de la glucólisis, el ciclo del ácido tricarbónico y el transporte de electrones, cada molécula de glucosa produce 36 moléculas de trifosfato de adenosina (Hatefi, 2005).

1.3.1. Complejos proteicos de la cadena de transporte de electrones

El NADH y el FADH₂ formados en la glicolisis, en la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de ácido cítrico, son moléculas ricas en energía porque poseen un par de electrones con elevado potencial de transferencia (Bohmont, 2007). Cuando estos electrones se transfieren al oxígeno molecular, se libera una gran cantidad de energía, que puede ser utilizada para generar ATP. La fosforilación oxidativa es el proceso por el que se forma ATP como resultado de la transferencia de electrones desde el NADH o del FADH₂ al O₂ a través de una serie de transportadores de electrones (Chance, 2008).

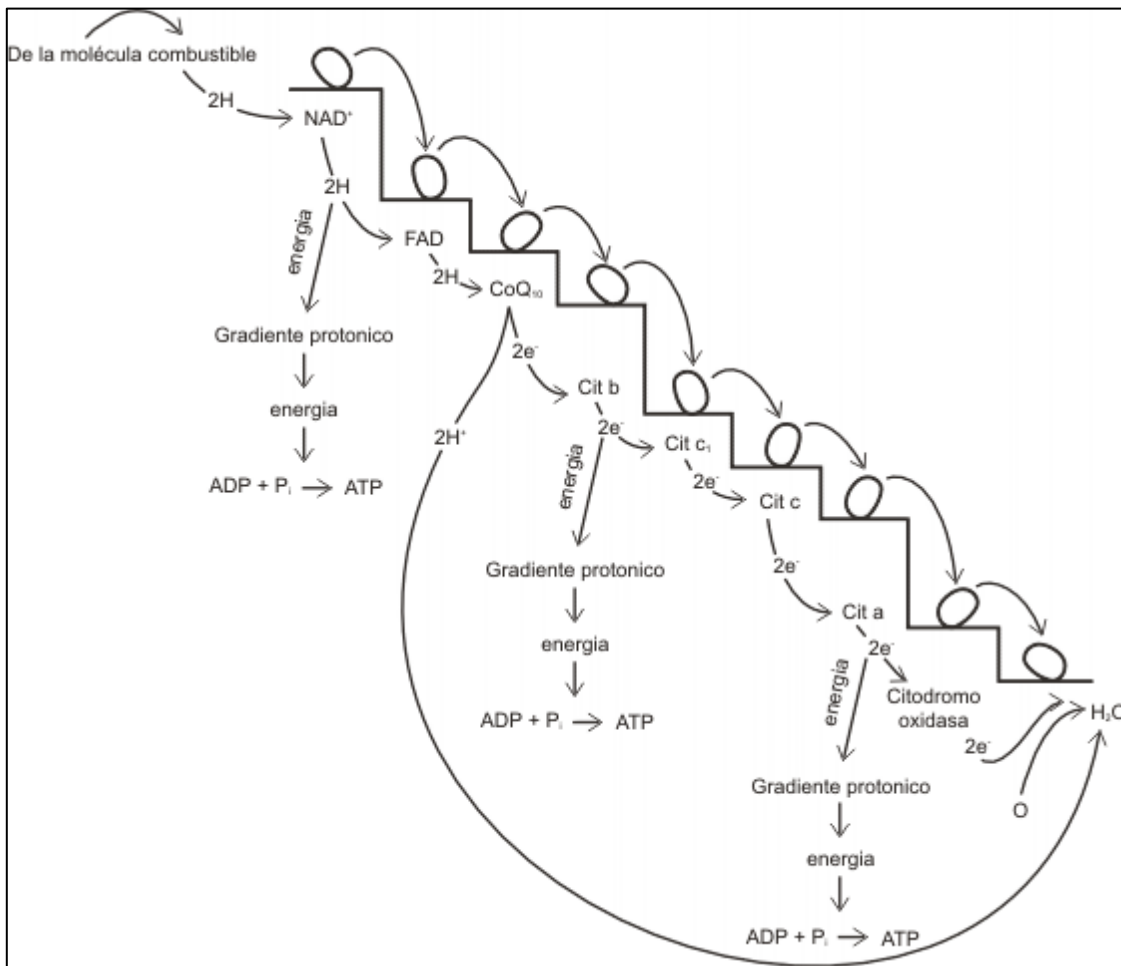
El transporte de electrones se lleva a cabo en la membrana mitocondrial interna. Los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial se encuentran asociados formando tres grandes complejos supramoleculares; también hay dos transportadores móviles que comunican esos tres complejos (Rizzuto & Simpsom 2012). Cada uno de los tres complejos respiratorios acopla una reacción redox con el bombeo de H⁺ desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana (figura 3). El resultado final de la actuación de la cadena de transporte de electrones es la creación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna (Chance, 2008).

Figura 3. Esquema del bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (sombreado).



El complejo I, también conocido como NADH deshidrogenasa, es responsable de transferir electrones desde el NADH a la ubiquinona. El complejo II se llama succinato deshidrogenasa y transfiere los electrones de la oxidación del succinato (Wallance & Starkov, 2000). El complejo III o citocromo c reductasa, es responsable de recibir los electrones transportados por la ubiquinona de las reacciones ocurridas en el complejo I y II. El complejo IV o citocromo c oxidasa cataliza la transferencia de electrones a una molécula de O_2 (Rizzuto & Brini, 2009). El transportador de electrones desde el complejo III al complejo IV es el más pequeño de los citocromos, el citocromo c (peso molecular 12.000). El complejo IV, también conocido como citocromo oxidasa, contiene proteínas llamadas citocromo a y citocromo a_3 . El oxígeno es el aceptor final de electrones, siendo el agua el producto final de la reducción del oxígeno (figura 4) (Saraste, 2009).

Figura 4. Diagrama de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa asociada.

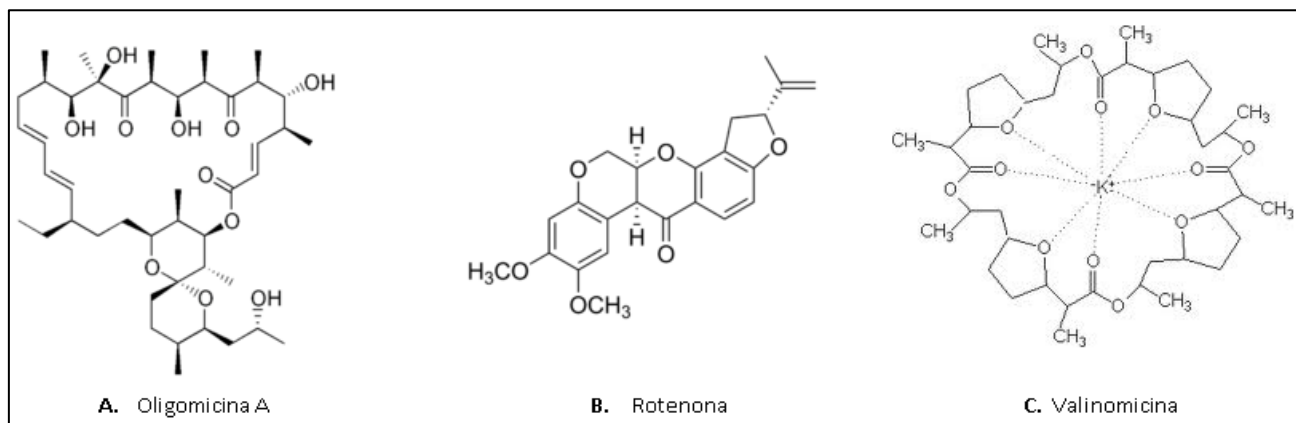


1.3.2. Inhibidores de la cadena de transporte de electrones

Existen tres tipos de inhibidores en el proceso de la fosforilación oxidativa. Los inhibidores específicos de lugar, bloquean las reacciones específicas asociadas a los complejos de transporte de electrones I, II, III y IV. Estos cuatro complejos catalizan reacciones distintas de manera que no son equivalentes (Circu 2010). Por ejemplo, el cianuro (CN^-); monóxido de carbono (CO); azida sódica (Na_3N) inhiben la citocromo oxidasa (Complejo IV). La Anticimina A, bloquea la transferencia de electrones desde el citocromo b al citocromo c1. La rotenona (figura 5b), Amital y Piercidina A, inhiben la transferencia de electrones desde un centro Fe-S de la NADH deshidrogenasa (Complejo I) a la ubiquinona (CoQ) y el malonato, inhibe la transferencia de electrones a nivel de la succinato deshidrogenasa (Complejo II) (Bertoglio, 2002). En ocasiones estos inhibidores son utilizados como fármacos, aunque los efectos farmacológicos alcanzados a las concentraciones más bajas no están necesariamente relacionados con su acción como inhibidores de la fosforilación oxidativa (Saraste, 1999).

Existe otro grupo de inhibidores que actúan indistintamente y no inhiben complejos específicos; en lugar de ello, estos compuestos bloquean directamente la fosforilación. En un sistema estrechamente acoplado la inhibición de la fosforilación puede conducir a la inhibición de la oxidación. Diversos inhibidores no específicos de lugar son antibióticos, como la oligomicina (figura 5a) y la aureovertina, que bloquean el flujo de protones a través de F_0 (Rizzuto & Brini, 2009).

Figura 5. Estructura química de algunos inhibidores de la cadena de transporte de electrones. Tomado de Rizzuto & Brini, 2009.



Los agentes desacopladores debilitan o destruyen completamente el firme acoplamiento normal entre oxidación y fosforilación. Con el desacoplamiento aumentan las velocidades de oxidación mientras que la fosforilación disminuye. El resultado es la producción de calor extra que puede manifestarse en forma de *fiebre*. La menor formación de ATP resultante del desacoplamiento puede afectar de forma indirecta a muchos procesos celulares como el transporte de iones y la permeabilidad de la membrana. Los agentes desacopladores constituyen un variado grupo de compuestos, descritos en términos generales como donantes o aceptores lipofílicos de protones. Dichos agentes aumentan anormalmente la permeabilidad de las membranas mitocondriales internas frente a los protones. Entre los desacopladores comunes se cuentan el 2,4-dinitrofenol, el dicumarol, ciertas salicilanilidas sustituidas y la valinomicina (figura 5c). Entre los desacopladores naturales están la bilirrubina, los ácidos grasos libres y posiblemente la tiroxina; sin embargo, estos compuestos no están normalmente presentes en las mitocondrias a concentraciones lo suficientemente altas como para actuar como desacopladores. A veces las toxinas microbianas actúan como desacopladores, constituyendo ésta una vía a través de la cual la infección puede contribuir a la fiebre (2009).

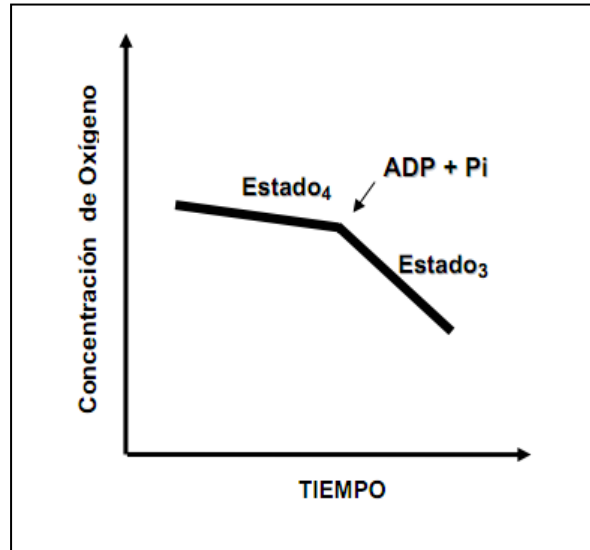
1.3.3. Control respiratorio

En mitocondrias normales la reacción de oxidación del sustrato respiratorio (NADH o succinato) depende de la presencia de ADP y Pi. En condiciones fisiológicas, la matriz mitocondrial contiene alta concentración de Pi, de manera que la concentración de ADP es la reguladora de la actividad del sistema de transporte de electrones y, por lo tanto, de la respiración mitocondrial. La funcionalidad de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa mitocondriales pueden ser evaluadas midiendo la concentración de oxígeno presente en una suspensión de mitocondrias intactas o la concentración de ATP del medio a lo largo del tiempo en diferentes condiciones. El gráfico obtenido se denomina trazado polarográfico (Voss, 1941).

Los trazados polarográficos de mitocondrias intactas permiten comprobar que en ausencia de ADP la actividad es limitada, mientras que después de añadir ADP la respiración se activa a niveles que pueden alcanzar hasta 20 veces el valor obtenido en ausencia del mismo. Una vez que el ADP adicionado ha sido totalmente convertido en ATP, la actividad respiratoria retorna a un nivel muy próximo al inicial. Al estado metabólico caracterizado por la presencia de sustrato oxidable, en ausencia de ADP y

consumo de oxígeno lento se lo denomina “estado controlado” o estado “4”. La adición de ADP establece un consumo de oxígeno rápido, y por ello a este estado se lo denomina “estado activado” o estado “3”, que se mantiene hasta que todo el ADP ha sido fosforilado a ATP, produciéndose entonces un retorno al estado “4”.

Figura 6. Control respiratorio, la relación entre la respiración en el estado 3 y el estado 4. Tomado de Voss, 1941.



El cociente entre las pendientes de consumo de oxígeno en estado "3" y en estado "4" se denomina índice de control respiratorio y es la expresión del control que ejerce el ADP sobre el transporte de electrones mitocondrial (figura 10) (Estabrook, 2007). El fenómeno de control respiratorio es de máxima importancia en la regulación fisiológica de la respiración celular. El índice de control respiratorio es utilizado para expresar el grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y fosforilación. Bajos valores de estos índices indican mitocondrias desacopladas o dañadas. El acoplamiento de los procesos de transporte de electrones y de síntesis de ATP es modificados por agentes químicos y por alteración física de la membrana mitocondrial (Voss, 1941; Estabrook, 2007).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Aislamiento de mitocondrias

Mitocondrias de hígado de rata fueron aisladas, utilizando como medio de aislamiento: D-manitol 250 mM, HEPES 10 mM, a un pH 7.2, EGTA 1 Mm y BSA 0.1 g%. Para obtener las mitocondrias los animales (ratas albinas de raza wistar WI IOPS AF/Han, únicamente machos, pesando aproximadamente 200 gramos y en ayuno durante 12 horas) fueron sacrificadas por decapitación. El hígado fue inmediatamente retirado e inmerso en medio de extracción helado.

Después del lavado, el órgano fue cortado y homogenizado en un homogeneizador Van Potter Elvehjen. La suspensión obtenida se centrifugó a 600 x g a 4°C durante 10 minutos, para eliminación de células intactas, membranas y núcleos. El sedimento fue descartado y el sobrenadante centrifugado a 7000 x g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado obtenido, constituido de mitocondrias intactas, fue resuspendido y lavado dos veces en medio de extracción por centrifugación a 7000 x g durante 10 minutos a 4°C. Las mitocondrias obtenidas fueron resuspendidas en medio de extracción sin BSA y mantenidas a 4°C hasta su uso. Este trabajo de investigación se realizó de acuerdo con lo establecido por las leyes colombianas que rigen el uso de animales vivos en experimentos e investigación, Ley 84 de 1989 (Cap. IV, Art. 23-26) y la resolución 8430 de 1993 (Tit. IV, Art. 83-93).

2.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en cada muestra resuspendida de mitocondrias de hígado se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Para esto se preparó una curva de calibración utilizando patrones de albúmina de suero bovino (fraction V, MERCK) disueltos en solución *buffer* de fosfato. Las absorbancias de los patrones y las muestras fueron medidas en un ELISA marca Bio-Rad utilizando el programa Microplate Manager 6. Para esta cuantificación se prepararon 3 disoluciones 1:100, 2:200, 1:300 y un blanco, se cuantificaron por el método de Bradford utilizando la curva de calibración determinada previamente.

2.3. Determinación del consumo de oxígeno

Fueron usadas mitocondrias de hígado de rata (1 mg/mL) aisladas como se describió en el ítem 2.1, en un medio de incubación compuesto de: HEPES 10 mM (pH 7.4), EGTA 0.1 mM, manitol 125 mM, KCl 65 mM y suplementadas con glutamato de sodio 5 mM o succinato de sodio 3 mM, Pi 1.6 mM e ADP 0.6 mM. La R o S-Carvona fueron adicionadas en diferentes concentraciones e incubadas durante dos minutos con la proteína mitocondrial antes de inducir la respiración mitocondrial.

Los experimentos se realizaron bajo agitación constante en cámara termostatzada a 28°C (VOSS *et al.*, 1961). El consumo de oxígeno por la mitocondrias intactas se determino polarográficamente en un oxígrafo, utilizando un electrodo tipo Clark, acoplado a un registrador.

2.4. Preparación de la suspensión de mitocondrias para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales.

Las mitocondrias aisladas de acuerdo al ítem 2.1 fueron congeladas a -70°C hasta el momento de su uso, cuando fueron fragmentadas por ultrasonido durante 5 min y mantenidas en baño de hielo hasta la realización de las pruebas enzimáticas. Los fragmentos de membrana obtenidos fueron usados como fuente de enzimas y se cuantificaron según el método descrito en el ítem 2.2.

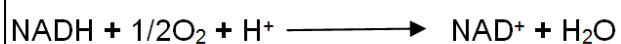
2.5. Determinación de la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial.

La actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria se determinó en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800 utilizando el programa UV-Probe 2.33 y polarográficamente en un oxígrafo marca Hansatech utilizando el programa Oxygraph plus. La R o S-Carvona fueron adicionadas en diferentes concentraciones e incubados durante dos minutos con la proteína mitocondrial antes de inducir la reacción, para todas las enzimas estudiadas.

2.5.1. NADH Oxidasa

La actividad de la NADH oxidasa se determinó por el método de Singer. La velocidad de oxidación del NADH (figura 11) se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente.

Figura 7. Esquema de reacción del NADH. Tomado de Singer, 1974.



El sistema de reacción se compuso por tampón fosfato 80 mmol.L⁻¹ (pH 7,4), EDTA 50μM, NADH 0,17 mM e 1 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28°C y la reacción fue iniciada por la adición de NADH (Singer, 1974).

2.5.2. NADH Citocromo c reductasa

La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente a través del monitoreo de la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm. El sistema de reacción estaba constituido de tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, NADH 50 mM, citocromo c (oxidado) 40 mM, NaCN 1 mM y 1 mg de proteína mitocondrial. Todos los reactivos excepto el citocromo c, fueron incubados por 10 min a 28°C, la reacción se inició por la adición del citocromo c, y la lectura se realizó durante 2 minutos (Somlo, 1965).

2.5.3. NADH deshidrogenasa

La actividad de la enzima fue determinada por el método espectrofotométrico usando ferrocianato como receptor artificial de electrones en la presencia de rotenona, la reacción fue monitoreada a 420 nm. El sistema de reacción estaba compuesto de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2.0 mM, NADH 0.15 mM, ferrocianuro de potasio 600 mM, rotenona 1mM, NaCN 1 mM y 1 mg de proteína mitocondrial. La reacción fue iniciada por la adición del ferrocianuro y se monitoreó por 2 minutos (Mason, 1973).

2.5.4. Succinato Oxidasa

La actividad de la enzima se determinó en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente. El sistema de reacción se compuso por tampón fosfato 80 mM (pH 7,4), succinato 10 mM y 0.5 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28°C y la reacción fue iniciada por la adición de succinato (Singer, 1974).

2.5.5. NADH Citocromo c reductasa

La actividad de esta enzima fue determinada midiendo la reducción del citocromo *c* después de bloquear la cadena respiratoria con NaCN 1 mM y rotenona 1 mM. La velocidad de reducción del citocromo *c* fue monitoreada a 550 nm, usando un sistema de reacción compuesto por: tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, NaCN 1 mM, succinato de sodio 5 mM, rotenona 1 mM y 0.5 mg de proteína mitocondrial. La reacción fue iniciada por la adición de 40 mM de citocromo *c* (Mason, 1973).

2.5.6. Succinato deshidrogenasa

La actividad de la succinato deshidrogenasa fue determinada utilizando DCPIP y PMS como receptores artificiales de electrones. La velocidad de reducción del DCPIP fue monitoreada a 600 nm en un sistema de reacción compuesto por: tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4), succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM, NaCN 1 mM, rotenona 1 mM, PMS 1 mM y 30 µg de proteína mitocondrial. Los reactivos presentes en el sistema, excepto el PMS y el DCPIP fueron incubados por 10 minutos a 28°C, la reacción se inició por la adición de DCPIP 180 µM (Singer, 1974).

2.6. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media de desviación estándar y sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Turkey para la comparación de medias. Se consideró estadísticamente significativo si se compara el nivel de significación de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se describen los resultados obtenidos al evaluar la R y S-Carvona sobre el metabolismo bioenergético mitocondrial, todos los resultados aquí reportados son comparados con un control medido para cada experimento individual.

3.1. Análisis control respiratorio

Los efectos de los enantiómeros de carvona sobre la fosforilación oxidativa, fueron evaluados en las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, manteniendo una preincubación de la R y S-carvona durante dos minutos. Se evaluaron parámetros propios de la respiración mitocondrial como: Velocidad de consumo de oxígeno tras la adición de ADP (estado 3), velocidad de consumo de oxígeno tras el agotamiento de ADP (estado 4) y Coeficiente de control respiratorio (CCR).

Cada uno de los parámetros fué evaluado con dos sustratos independientes, glutamato-malato (5 mM-2,5 mM) y succinato (3mM), sustratos apropiados para la evaluación del complejo I y II de la cadena respiratoria, respectivamente.

La figura 8 compara el consumo de oxígeno de los dos sustratos evaluados en presencia de ADP. Los resultados indican que la adición de los enantiómeros de carvona causó una disminución en el estado 3, de forma dosis dependiente, con ambos sustratos., siendo mayor para la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, en los dos casos. La R-carvona mostró una inhibición mayor para el glutamato (63%) en comparación con el succinato (48%). El efecto inhibitorio de la S-carvona fue mayor para los dos sustratos en comparación con la R-carvona, para el glutamato (73%) y succinato (53%).

Figura 7. Efecto de los enantiómeros de carvona sobre la respiración mitocondrial en presencia de ADP. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).

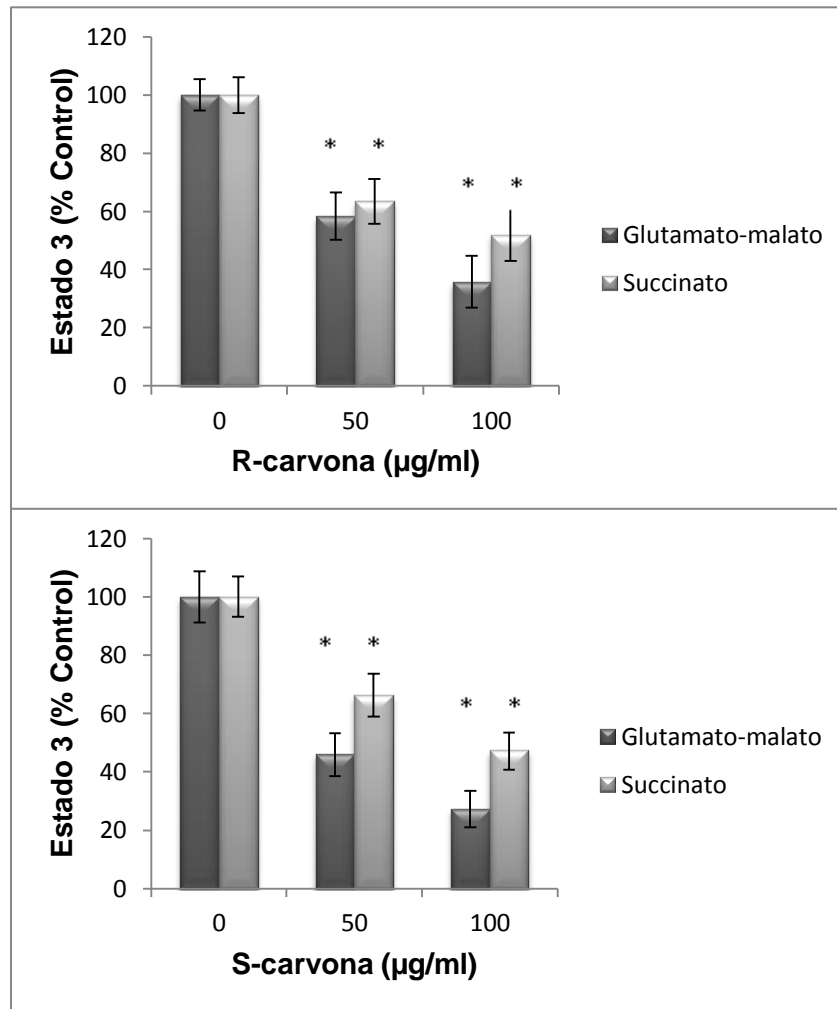
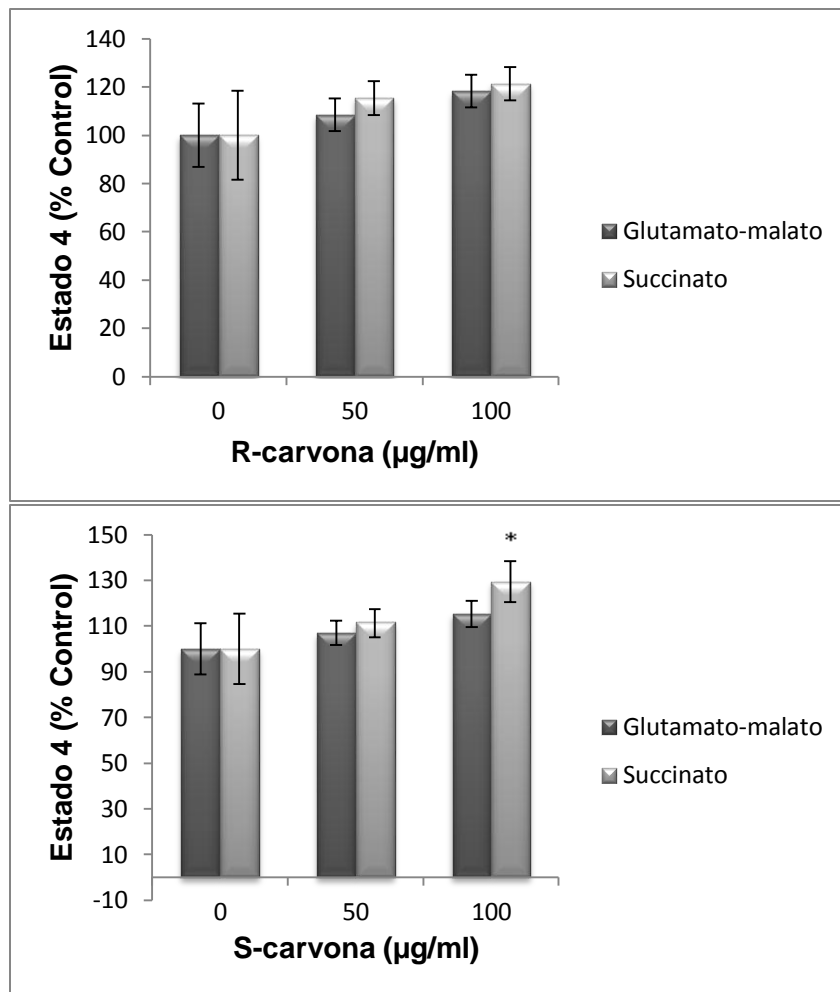
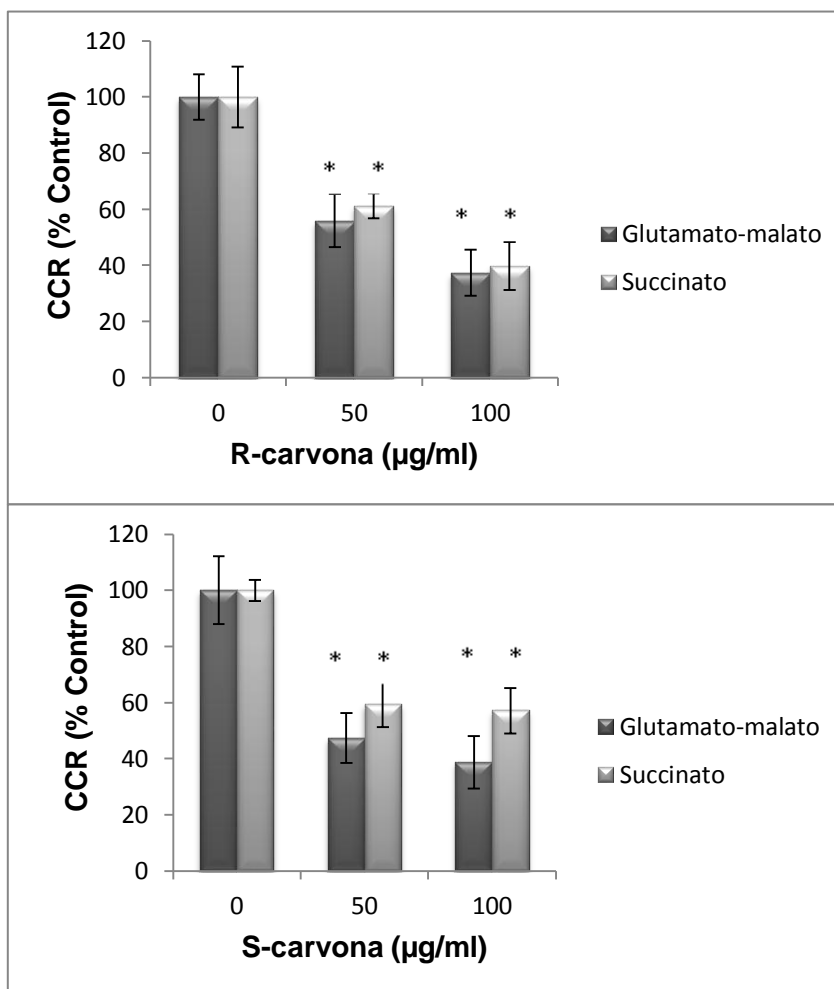


Figura 8. Efecto de los enantiómeros de carvona sobre la respiración mitocondrial tras el agotamiento de ADP. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).



La figura 9 representa la tasa de consumo de oxígeno tras el agotamiento de ADP (estado 4) en los sustratos glutamato-malato y succinato. Se observa un aumento del consumo de oxígeno producido en respuesta a la adición de los enantiómeros de carvona para los dos sustratos evaluados, siendo mayor para la concentración de 100 µg/mL. Para el caso de la R-carvona la respiración aumentó un 11% con glutamato y 21% con succinato, mientras que para la S-carvona la respiración aumentó 20% con glutamato y 29% succinato. El efecto estimulante es mayor para el sustrato succinato con los dos enantiómeros y la S-carvona muestra mayor porcentaje estimulante en comparación que la R-carvona.

Figura 9. Efecto de los enantiómeros de carvona sobre el coeficiente de control respiratorio para glutamato y succinato. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).



Como resultado de los efectos inhibitorios y estimulantes de los enantiómeros de carvona en los estados 3 y 4, respectivamente, los coeficientes de control respiratorio disminuyeron para ambos sustratos. La figura 10 indica que en presencia de los enantiómeros la disminución de CCR fue menor para el succinato en comparación con el glutamato. En presencia de 100 µg/mL de S-carvona fue del 62% para glutamato y 43% para el succinato, mientras que en presencia de 100 µg/mL de R-carvona fue del 63% para glutamato y 51% para el succinato.

3.2. Análisis de la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial

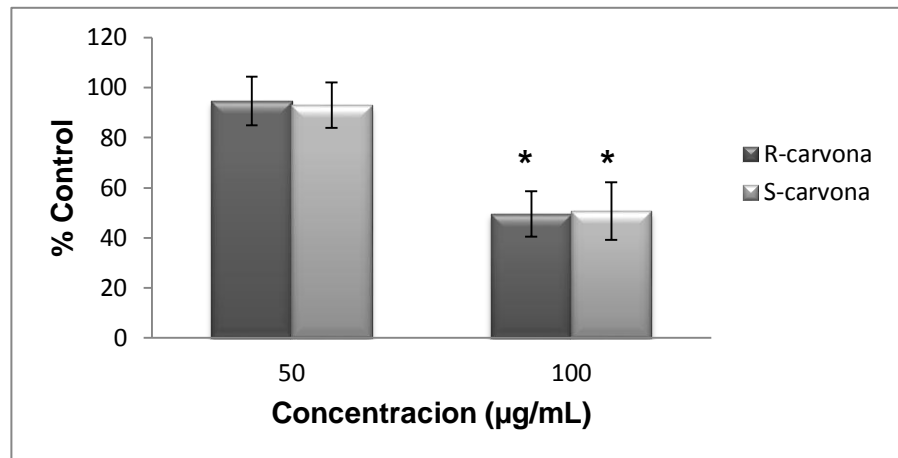
Para dilucidar los efectos inhibitorios de los enantiómeros de la carvona en el estado 3 de la respiración mitocondrial, se evaluaron los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial en mitocondrias fragmentadas. En virtud de esta condición experimental, el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria se puede evaluar de forma independiente de la barrera de la membrana intacta, la actividad de fosforilación, u otros procesos dependientes del potencial de membrana. Además, facilita la identificación de los sitios donde la inhibición de la cadena respiratoria se lleva a cabo.

A continuación se describen los efectos de los metabolitos evaluados sobre las enzimas NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa, NADH citocromo c reductasa, succinato oxidasa, succinato deshidrogenasa y succinato citocromo c reductasa.

3.2.1. NADH oxidasa

La evaluación de la actividad de los metabolitos R y S-carvona sobre la NADH oxidasa se evidencia en la figura 11. La adición de los enantiómeros en la concentración de 50 µg/mL no provocó ninguna variación en la actividad de la enzima. Por el contrario para la concentración de 100 µg/mL se observó una inhibición significativa de la enzima, de un 51% para la R-carvona y un 50% para la S-carvona, sin que existá diferencias estadísticamente significativas entre los dos enantiómeros.

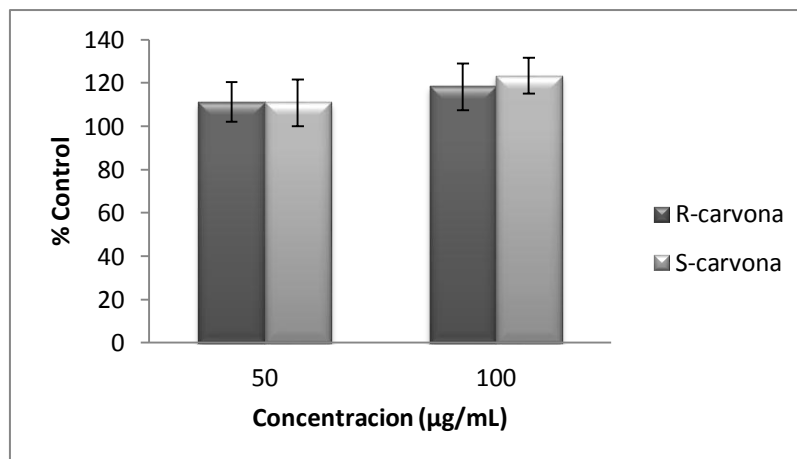
Figura 10. NADH oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).



3.2.2. NADH citocromo c reductasa

La adición de los enantiómeros R y S-carvona, no produjo ningún efecto estimulante o inhibidor en la enzima, en ninguna de las concentraciones trabajadas (50 y 100 µg/mL), como se evidencia en las figuras 12. Nuevamente no se observan diferencias entre la actividad presentada por los enantiómeros.

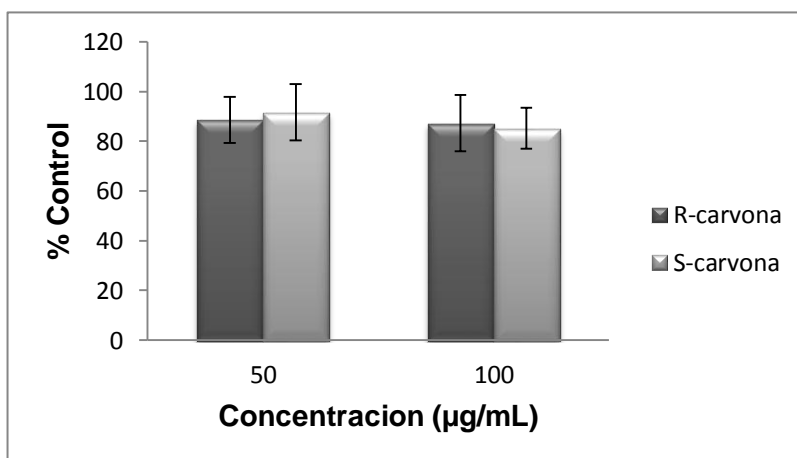
Figura 11. NADH citocromo c reductasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).



3.2.3. NADH deshidrogenasa

No se evidenció ningún efecto estimulante o inhibitorio sobre la enzima, tras la adición de la R y S-carvona, para ninguna de las concentraciones trabajadas (50 y 100 $\mu\text{g/mL}$), como se muestra en la figura 13. No se evidencian diferencias entre la actividad presentada por los enantiómeros.

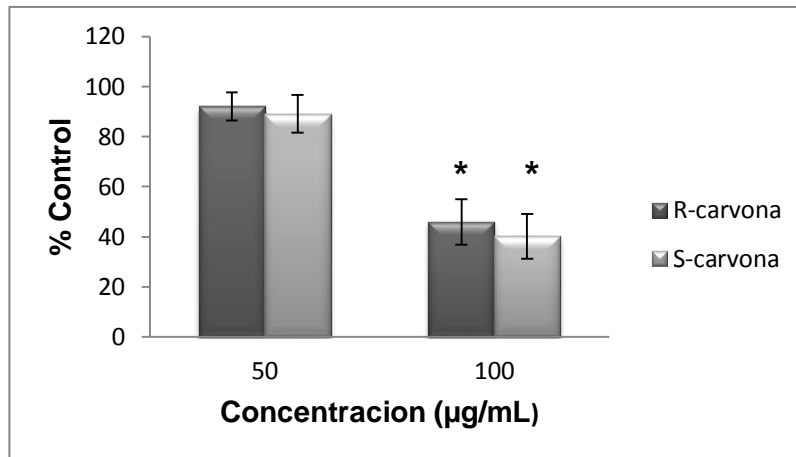
Figura 12, NADH deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).



3.2.4. Succinato oxidasa

La evaluación de actividad de los enantiómeros en la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ no provocó ninguna variación en la actividad de la enzima. Por el contrario para la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ se observó una inhibición significativa de la enzima, de un 55% para la R-carvona y un 60% para la S-carvona (Figura 14).

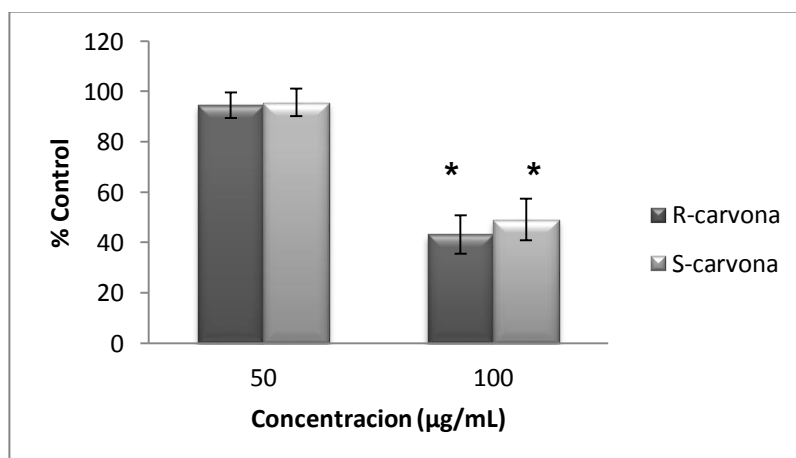
Figura 13. Succinato oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).



3.2.5. Succinato citocromo c reductasa

Se observó una inhibición sobre la enzima tras la adición de los enantiómeros en concentración de 100 µg/mL, del 57% para la R-carvona y 51% para S-carvona. No se observó ningún cambio significativo en la actividad de la enzima en presencia de los enantiómeros a 50 µg/mL (Figura 15).

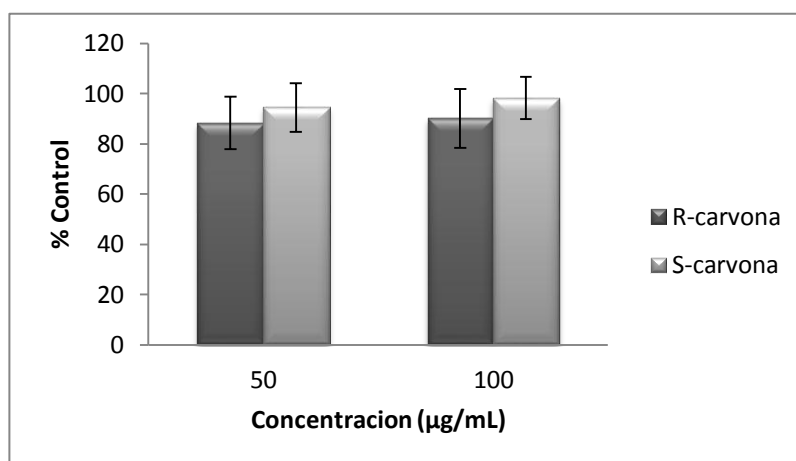
Figura 15. Efecto de los enantiómeros de carvona sobre la Succinato citocromo c reductasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).



3.2.6. Succinato deshidrogenasa

Al igual que para las enzimas NADH citocromo c reductasa y NADH deshidrogenasa la adición de los enantiómeros R y S-carvona, no produjo ningún efecto estimulante o inhibitorio en la Succinato deshidrogenasa, para ninguna de las concentraciones trabajadas (50 y 100 $\mu\text{g/mL}$), como se evidencia en la figura 16.

Figura 14. Efecto de los enantiómeros de carvona sobre la Succinato deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$).



El análisis en conjunto de todos los resultados obtenidos en mitocondria íntegra, sugiere que la (R) y (S)-carvona en el complejo I, provocan una inhibición estadísticamente significativa para la respiración en presencia de ADP (estado 3). La concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ presentó diferencias estadísticamente significativas sobre el efecto inhibitorio mayor en el S-enantiomero en comparación al R-enantiomero. El efecto inhibitorio en concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ es creciente con respecto a la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, evidenciándose un efecto dosis-dependiente en los enantiómeros estudiados. La adición de los metabolitos, también provocó un aumento para la respiración en ausencia de ADP (estado 4), siendo estadísticamente significativa solo para la S-carvona en una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. En conjunto estos dos efectos causaron una disminución en el CCR.

Los resultados en mitocondria fragmentada indican que (R) y (S)-carvona afectan el transporte de electrones del citocromo c al complejo IV, efecto que se evidencia en la inhibición observada para la NADH oxidasa. Los resultados en mitocondria íntegra y fragmentada sugieren que los enantiómeros en el complejo I, actúan evitando la normal circulación de electrones, lo que impide la formación de potencial de membrana y en consecuencia la síntesis de ATP.

En el complejo II, también se evidencia una inhibición estadísticamente significativa para la respiración en presencia de ADP (estado 3), para los dos metabolitos en las concentraciones estudiadas. Se observó un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP (estado 4) estadísticamente no significativo para ninguna de las concentraciones evaluadas. La suma de estos dos efectos, nuevamente se reflejan en la disminución del CCR.

Los resultados tras la adición de los metabolitos en mitocondria fragmentada, sugieren que estos afectan el transporte de electrones del complejo II al III y del citocromo c al complejo IV, por las inhibiciones observadas para la Succinato deshidrogenasa y succinato oxidasa respectivamente. En conjunto los ensayos confirman que los enantiómeros actúan sobre la cadena de transporte de electrones, sin embargo, es necesario aclarar si los efectos de los enantiómeros incluyen alteraciones en el potencial de membrana, incrustaciones en la membrana mitocondrial interna afectando la permeabilidad y causando la generación de gradientes iónicos y evaluar la posible inhibición de la ATPasa para complementar los resultados aquí obtenidos.

El perfil que presentan estos enantiómeros sobre la cadena respiratoria, sugiere que tienen potencial farmacológico, y podrían ser usados para ensayos de actividad anticancerígena por sus efectos sobre el CCR, antiácidos por sus efectos sobre complejos que son bombas de protones, paraganglioma, feocromocitoma y enfermedad de Leigh por sus efectos sobre el complejo II, ataxia, enfermedad de Alper, enfermedad de Leber y rdbdomiolisis por los efectos presentados sobre el complejo IV de la cadena respiratoria. Adicionalmente, es importante resaltar que en términos generales los dos enantiómeros presentaron resultados similares, por lo que se sugiere que es posible testar mezclas racémicas para continuar con la evaluación de la actividad biológica de estos compuestos.

Con el desarrollo del proyecto se buscaba encontrar posibles diferencias en los efectos de los enantiómeros de carvona, pues a pesar de tener las mismas propiedades químicas, los enantiómeros se caracterizan por presentar diferentes propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, debido a la posición de sus grupos funcionales. Es esta última propiedad la más importante al momento de evaluar la actividad biológica de los enantiómeros (Aguilar & Mendiola, 2009). En la literatura se reporta la diferencia en la actividad biológica observada entre enantiómeros de analgésicos locales (Mather & Edwards, 2008). Hasta hace unos años, salvo la lidocaína, que carece de centro quiral, los anestésicos locales del tipo amida se presentaban como mezclas racémicas. Actualmente, la industria farmacéutica ha logrado la síntesis de S-enantiómeros, que poseen una menor toxicidad sistémica (Aguilar & Mendiola, 2009). La ropivacaína es el S-enantiómero del 1-propil- 2',6'pipecolixilidido. Es el primer anestésico local comercializado en España como enantiómero puro en un intento de disminuir los efectos tóxicos de la mezcla racémica de bupivacaína (Aberg, 2007). Muchos estudios han puesto en manifiesto que el enantiómero R de la bupivacaína es menos cardiotoxico que el enantiómero S (Mather & Edwards, 2008).

A pesar de que, por lo menos para los analgésicos locales, la actividad de los enantiómeros se ve más pronunciada en uno de los isómeros, los resultados aquí reportados para la evaluación de la R y S-carvona sugieren que no existen diferencias significativas en la actividad sobre el mecanismo bioenergético de la mitocondria y por eso se sugiere que futuros estudios de estos enantiómeros podrían realizarse como mezclas racémicas.

4. CONCLUSIONES

- No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los efectos observados en los ensayos para la R-carvona y S-carvona sobre el metabolismo bioenergético mitocondrial.
- La adición de los enantiómeros causó una disminución estadísticamente significativa, en el estado 3 y el CCR, parámetros propios de la respiración mitocondrial.
- En conjunto los ensayos confirman que los enantiómeros actúan sobre la cadena de transporte de electrones, inhibiendo las enzimas NADH oxidasa, Succinato oxidasa y Succinato citocromo c reductasa.
- En presencia de los enantiómeros el efecto de inhibición fue mayor para el sustrato glutamato-malato en comparación con el succinato.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar mezclas racémicas para continuar con la evaluación de la actividad biológica de estos compuestos y confirmar que los dos enantiómeros presentan efectos similares.
- Realizar ensayos específicos para evaluar el potencial de membrana y la ATPasa, que permitan esclarecer los efectos de los enantiómeros sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la inhibición sobre las bombas de protones.
- Aumentar la concentración de los enantiómeros para confirmar el efecto dosis-dependiente observado en las concentraciones estudiadas.
- Evaluar los efectos de los enantiómeros sobre células cancerígenas.

6. PUBLICACIONES

Los resultados parciales de este proyecto fueron divulgados en el 30 Congreso Latinoamericano de Química 2012 celebrado en Cancun-Mexico del 27 al 31 de octubre y en los eventos XIV Encuentro Nacional de Estudiantes de Química-UIS 2012 y I Congreso Latinoamericano de estudiantes de Química pura y Aplicada-UIS 2012 celebrados en Bucaramanga-Colombia del 6 al 9 de noviembre. (Anexo A, B y C).

BIBLIOGRAFÍA

Aberg G Toxicological and local anaesthetic effects of optically isomers of two local anesthetic compounds. *Acta Pharmacol Toxicol* 2007. p. 273-277.

Afouna, M. I., Fincher, T. K., Khan, M. A., & Reddy, I. K. Percutaneous permeation of enantiomers and racemates of chiral drugs and prediction of their flux ratios using thermal data: a pharmaceutical perspective. *Chirality*. 2011. p. 456–465.

Aguilar JL, Mendiola MA, Pedrero A Ropivacaína. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 2009. p.453-459.

Aguilar, L.C, Barros, F: Medicinal plants cultivated in homegardens of rural communities in the domain of cerrado in piaui (Demerval Lobão Municipality, Piauí state, Brazil). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 2012. p. 405-420.

Ahmed, H. Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration. *J Bioenergetics*. 1997. p. 175-183.

Ardail, D. Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem*. 1990. p. 231-265.

Bailleul, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *J Pharmacology*. 2008. p. 211-222.

Barba, C., Toledano, R.M. Enantiomeric analysis of limonene and carvone by direct introduction of aromatic plants into multidimensional gas chromatography. *J chromatography*. 2013. p. 97-103.

Bertoglio, L.J., Carobrez, A.P. Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2002, p. 449-55.

Bohmont, C. Capps, Pardini R.S, Inhibition of the mitochondrial NADH-oxidase (NADH-coenzyme Q oxidoreductase) enzyme system by flavonoids: a structure–activity study, *Biochem. Pharmacol.* 2007. p. 2873–2874.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976. p. 248-254.

Catalán, C.A.N., D.J. Merez & J.A. Retamar. Aceite esencial de *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown de la provincia de Tucumán. *Riv. Ital. EPPOS* 59: 1989. p. 513-518.

Chance, E.R. Williams. The respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: Kinetics of oxygen utilization, *J. Biol. Chem.* 1955. p. 383–393.

Cheng, B, Kimura. R. The distribution of cholesterol and phospholipid composition in submitochondrial membranes from bovine adrenal cortex: Fundamental studies of steroidogenic mitochondria. *Lipids*, 2008. p.577-584.

Ciccío, J. Variación anual de la composición química del aceite esencial de *Lippia alba* (verbenaceae) cultivada en Costa Rica. *Lankesteriana*. 2006. p. 149-154.

Ciccío, J.F. & R.A. Ocampo. Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & Wilson (Verbenaceae) de Costa Rica. Informe parcial Proyecto IV.6. La flora Iberoamericana y su aprovechamiento para la producción de aromas y fragancias de interés industrial (mimeografiado). 1988. p. 111-115.

Circu, T.Y., Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.* 2010. p. 749–762.

Clark, LC; Wolf, R; Granger. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of applied physiology*. 1953. p. 189–193.

Cooper, J.M Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 2007. p. 177–186.

Cooper JM, Schapira AH. Mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. J Bioenerg Biomembr 2010. p. 175- 183.

Craveiro, A.A., J.W. Alencar, F.J.A. Matos, C.H.S.Andrade & M.I.L. Machado. Essential oils from Brazilian Verbenaceae. Genus *Lippia*. J. Nat Prod. 2011. p. 598-601.

Dellacassa, E., E. Soler, P. Menéndez & P. Moyna. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown and *Aloysia chamaedrifolia* Cham. (Verbenaceae) from Uruguay. Flav. Fragr. . 2009. P. 107-108.

Dorta, A.A. Pigoso, F.E. Mingatto, T. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic process, Chem. Biol. Interact. 2005. p. 67–78.

Emelyanov VV. Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. J. Biochem. 2003. p. 1599-1618.

Esposti M.D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species, Methods 26. 202. p. 335–340.

Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarography measurement of ADP/O ratios, Methods Enzymol. 2007. p. 41–47.

Fathy, M.M. Comparative study of essential oils from leaves and flowers of certain *Lantana* species growing in Egypt, *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* 2000. p. 105-118.

Fester, G., J. Retamar, A. Ricciardi & A. Cassano. Algunas esencias volátiles. 14ª. Comunicación. Rev. Fac. Ing. Quím. 30. 2010. p. 5-10.

Fester, G., L.R. Fonseca, A. Ricciardi, A. Cassano & J. Burgos. 1961. Algunas esencias volátiles. 15ª. Comunicación. Rev. Fac. Ing. Quím. 30. 2010. p. 11-14.

Fischer, U., R. López, E. Pöll, S. Vetter, J. Novak. Two chemotypes with in *Lippia alba* populations in Guatemala. Flavour Fragr. J.19. 2004. p. 333-335.

Frighetto, N.J.G. de Oliveira, A.C. Siani. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. (Verbenaceae) as a source of linalool. *J. Essent. Oil Res.* 10. 1998. p. 578-580.

Gómes, E.C, Moreira, G. Constituents of the essential oil from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. (Verbenaceae). *Rev. Brasil. Farm.* 1993. p. 29-32.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 2008. p. 1309-1312.

Gutiérrez-Domínguez, M.A. Estudio básico de mercado de ocho plantas medicinales de interés latinoamericano. Proyecto OEA-AICD / AE-089/02. 2003.

Haldar, S., Kar, B. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. *Journal of Tropical Disease.* 2012. p. 667-670.

Hatefi, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem.* 2005. p.1015-1069.

Jordan J, Ceña V, Prehn JH. Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J Physiol Biochem.* 2003. p. 129-141.

Leclercq, P.A., H. Silva Delgado, J. García, Aromatic plant oils of the Peruvian Amazon. Part 1. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. and *Cornutia odorata* (Poeppig) Poeppig ex Schauer, Verbenaceae. *J. Essent. Oil.* 1999. p. 753-756.

Lorenzo, D., D. Paz, P. Davies, R. Vila, S. Cañigueral & E. Dellacassa. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. *Flavour Fragr. J.* 16. 2001. p. 356-359.

Lozada, B.S, Herrera, L.V. In vitro effect of essential oils of three lippia species on monilioph.th.ora roreri (Cif. and Par.) Evans et al., causative agent of moniliasis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronomica Volumen 61, 2012 .p. 102-110*

Mason, R.O. Poyton, D.C. Wharton, G. Schatz, Cytochrome c oxidase from bakers yeast. Part I. Isolation and properties, *J. Biol. Chem.* 1973. p. 1346–1354.

Mather LE, Edwards SR Chirality in anaesthesiaropivacaine, ketamine and thiopentona. *Curr Opin Anesthesiol* 2008. p. 383-390.

Mielke, S.P., Krishnan, V.V. Estimation of protein secondary structure content directly from NMR spectra using an improved empirical correlation with averaged chemical shift. *Journal of structural and functional genomics*, 2005. p. 281-285.

Oosterhaven, K.; Leitao, A. Chambel; Gorris. Comparative study on the action of S-(+)-carvone, in situ, on the potato storage fungi *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *F. sulphureum*. *Journal of Applied Bacteriology*, Volume: 80. 1996. p. 535-539.

Pascual, K. Slowing, E. Carretero, D. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001. p. 201-214.

Pino, J.A., A.G. Ortega, A. Rosado, M. Rodríguez. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Rev. Cubana Farm.* 30(1). 1996.

Pullman, H.S. Penefsky, A. Datta, E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.* 1960. p. 3322–3329.

Retamar, J.A. Variaciones fitoquímicas de la especie *Lippia alba* (salvia morada) y sus aplicaciones en la química fina. *Essenze Deriv. Agrum.* 64. 1994. p. 55-60.

Reynolds, N; *Electrodos de Oxígeno Disuelto. Manual de uso y aplicaciones.* http://www.crison.it/pdfs/indu/03/crison_3_3.pdf.

Ricciardi, G.A.L., J.F. Veglia, A.I.A. Examen comparado de la composición de los aceites esenciales de especies autóctonas de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Univ.Nac. Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. www.unne.edu.ar/cyt/exactas/e-029.pdf. 1999.

Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. 2009. p. 744-747.

Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*. 2012. p. 325-327.

Robineau-Germosén, L.; Cuban collaboration with the program for applied research and diffusion of medicinal plants in the caribbean (TRAMIL). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Volume 14, 2009. p. 276-284.

Rossi, G.F. Azzoni, Ion transport in liver mitochondria. Energy barrier and stoichiometry of aerobic K⁺ translocation, *Eur. J. Biochem*. 1969. p. 418–426.

Rourke B. Pathophysiological and protective roles of mitochondrial ion channels. *J Physiol*. 2002. p. 529-536.

Sahin, N.O. Proteomics : A New Emerging Area of Biotechnology. In: *Pharmaceutical Biotechnology*. 2006. p. 83-146.

Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*.2009. p.1488-1493.

Siani, A.C., M.M.R. Tappin, M.F.S. Ramos. Linalol from *Lippia alba*: Study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. *J. Agric. Food Chem*. 50: 2003. p. 3518-3521.

Singer, Determination of the activity of succinate, NADH, choline and glicerophosphate dehydrogenase, *Methods Biochem. Anal*. 1974. p. 123–175.

Skulachev, P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med* 2009. p.139-84.

Somlo,M. Induction des lactico-cytocromo c reductases (d-ETL-) de la levure aerobie par les lactates (d-ET L-), *Biochim. Biophys*. 1965. p. 183–201.

Stashenko E, Jaramillo B, Martínez J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J Chromatogr A*. 2004. p. 93-103.

Stashenko E, Jaramillo B, Martínez J. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*. 2013. p. 192-202.

Tangarife, V. Roa V. Antifungal activity of Verbenaceae and Labiatae families essential oils. *Pharmacologyonline 1* (SPL. 1), 2012. p. 133-145.

Tornero D, Jordán J. Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Rev Neurol* 2012. p. 354-361.

Voss. O, A.P. Campello, M. Bacila, The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1961. p. 135-142.

Wallance K, Starkov A. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000. p. 353-88.

Witzmann, F.A. Preparation of Mammalian Tissue Samples for Two-Dimensional Electrophoresis. In: *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, 2005. p. 31-35.



SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.



SOCIEDAD QUÍMICA
DE MÉXICO, A.C.

Constancia

Est. Viviana Andrea Salamanca Villamizar, Q. Ph.D., Stelia Carolina Méndez Sanchez.

61

ANEXOS

ANEXO A

Certificado 30 Congreso Latinoamericano de Química 2012 celebrado en Cancún-Mexico.

Por su conferencia en el simposio

“Estudio del mecanismo de acción de r y s-carvona, metabolitos mayoritarios del aceite esencial de lippia alba (mill) n.e. Brow, sobre el metabolismo energético mitocondrial.” en el

30 Congreso Latinoamericano de Química 2012

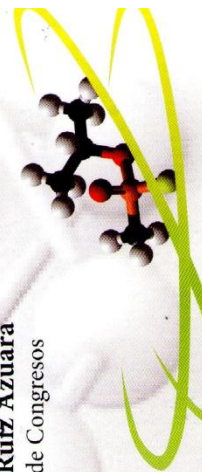
celebrado en Cancún, México, del 27 al 31 de octubre.

Cecilia Anaya Berríos

Dra. Cecilia Anaya Berríos
Presidenta Nacional de la SQM

Lena Ruiz Azuara

Dra. Lena Ruiz Azuara
Presidenta de Congresos



ANEXO B

XIV Encuentro Nacional de Estudiantes de Química-UIS 2012



Escuela de Química

Facultad de Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Organizar:



ASOCIACIÓN SANTANDEREA DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA

I Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Química Pura y Aplicada
XIV Encuentro Nacional de Estudiantes de Química - UIS 2012
CONLEQ - ENEQUIM

LA ASOCIACIÓN SANTANDEREA DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA
Y
LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

CERTIFICAN QUE:

Viviana Andrea Salamanca Villamizar
C.C: 1,098,684,156

Participó

En calidad de Expositor de Poster

XIV ENCUENTRO NACIONAL DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA - UIS 2012
Realizado los días 6, 7, 8 y 9 de noviembre de 2012 en las instalaciones de la Universidad Industrial de Santander


Jolán Alexander Gómez Alvarez
Presidente ASEQ


Estefarini Caguazango Montenegro
Presidenta ANEQ


Dr. Herminio de Jesús Caño Calle
Director, Escuela de Química


Dra. Sofía Pinzón Durán
Decana Facultad de Ciencias



ANEXO C

I Congreso Latinoamericano de estudiantes de Química pura y Aplicada-UIS 2012



Escuela de Química

Facultad de Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Organiza:



ASOCIACIÓN SANTANDEREANA DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA

I Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Química Pura y Aplicada
XIV Encuentro Nacional de Estudiantes de Química - UIS 2012
CONLEQ - ENEQUIM

LA ASOCIACIÓN SANTANDEREANA DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA
y
LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Viviana Andrea Salamanca Villamizar
C.C: 1,098,684,156

Participó

En calidad de Expositor de Poster

I CONGRESO LATINOAMERICANO DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA PURA Y APLICADA - UIS 2012
Realizado los días 6, 7, 8 y 9 de noviembre de 2012 en las instalaciones de la Universidad Industrial de Santander

John Pinzón Durán
Dira. Sofía Pinzón Durán
Decana Facultad de Ciencias

Homayra Gómez
Dr. Homayra Gómez Álvarez
Directora Escuela de Química

Johán Alexander Gómez Álvarez
Presidente ASEQ

