

Actividad insecticida de metabolitos de plantas medicinales que influyen en la bioenergética mitocondrial y la acetilcolinesterasa en larvas de mosquitos *Aedes aegypti*

Por:

Daniela Zulay Angarita Vergara

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM)

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP)

Estudiante de Pregrado Química

Dirigido por:

Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM)

Grupo de Investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM)

Co-dirigido por:

Dr. Luis Carlos Vesga Gamboa

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM)

Asesor:

Dr. Jonny Edward Duque Luna

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP)

Escuela de Química, Facultad de Ciencias

Universidad Industrial de Santander

2023

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

*A mi madre,
porque este sueño también es tuyo.*

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos, por ser el motor de mis sueños y apoyarme en esta locura que es el camino la ciencia.

A Jeimmy, por estar junto a mi durante todo este proceso y quererme y valorarme tal cual soy.

A la profesora Stelia y el profesor Jonny por las enseñanzas y conocimiento brindado para que este proyecto fuese posible, siempre desde el ejemplo de ética y amor por la ciencia.

A Luis, por su extraordinaria paciencia y dedicación con sus estudiantes.

A Diana, por brindarme todos sus conocimientos y enseñarme el valor de un buen trabajo.

A los compañeros de CINTROP- laboratorio 110 y GIBIM-laboratorio 402, por la ayuda y complemento en los conocimientos, y por su inmensa inteligencia y entendimiento, en especial a Mafe.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, y al programa Bio-Reto XXI-15:50, por permitirme estar en el proyecto 11: “Desarrollo de nuevos productos con actividades antimicrobiana, insecticida y repelente a partir de moléculas aisladas de plantas aromáticas colombianas”.

A el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación es el organismo del Gobierno Nacional de Colombia, por la convocatoria N° 891 de 2020, por la beca obtenida de joven investigador, otorgada por la misma institución.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión por el apoyo recibido para la divulgación de los resultados de este trabajo de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN..... | 13 |
| ABSTRACT | 16 |
| INTRODUCCIÓN..... | 18 |
| 1. Marco de referencias y antecedentes..... | 19 |
| 1.1. <i>Aedes aegypti</i> | 19 |
| 1.2. Dengue, Zika y chikinguña, entre otras enfermedades transmitidas por mosquitos . | 21 |
| 1.3. Insecticidas actuales y su mecanismo de acción | 23 |
| 1.4. Diseño de insecticidas empleando enfoques computacionales | 24 |
| 1.4.1. Modelos de homología..... | 27 |
| 1.4.2. Docking molecular..... | 30 |
| 1.4.2.1. Teoría de acoplamiento | 30 |
| 1.4.2.2. Algoritmos de muestreo | 30 |
| 1.4.2.3. Funciones de puntuación..... | 31 |
| 1.4.3. Campos de fuerza..... | 34 |
| 1.4.4. Aplicación en insecticidas de las técnicas computacionales | 35 |
| 1.5. Estrategias para el diseño de insecticidas | 38 |
| 1.5.1. La mitocondria como diana para el diseño de insecticidas..... | 38 |
| 1.5.2. Complejo II | 40 |
| 1.5.3. Complejo IV | 41 |
| 1.5.4. Acetilcolinesterasa | 43 |
| 1.6. Plantas medicinales como alternativa para insecticidas convencionales..... | 44 |
| CAPITULO 1. Análisis <i>In silico</i> e <i>In vivo</i> de metabolitos de plantas que afectan los complejos mitocondriales II, IV y la acetilcolinesterasa. | 48 |
| 1. Metodología de fase <i>In silico</i> e <i>In vivo</i> | 48 |
| 1.1. Fase preliminar | 49 |
| 1.2. Fase <i>In Silico</i> | 49 |
| 1.2.1. Modelos de homología para los complejos II, IV y selección de la estructura cristalina de la acetilcolinesterasa..... | 49 |
| 1.2.2. Preparación y screening virtual de los ligandos y la proteína..... | 51 |
| 1.2.3. Docking molecular de los ligandos..... | 52 |
| 1.2.4. Visualización | 54 |

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3. Fase <i>In Vivo</i> : actividad larvicida | 55 |
| 2. Resultados y discusión | 56 |
| 2.1. Resultados de los modelos de homología para los complejos II y IV | 56 |
| 2.1.1. Complejo II, subunidad A..... | 56 |
| 2.1.1.1. Validación del modelo de homología del complejo II | 59 |
| 2.1.2. Complejo IV, subunidad IV | 60 |
| 2.1.2.1. Validación del modelo de homología del complejo IV | 61 |
| 2.1.3. Acetilcolinesterasa | 62 |
| 2.2. Resultados y discusión del docking molecular..... | 63 |
| 2.2.1. Resultados y discusión del docking molecular del Complejo II, subunidad A | 64 |
| 2.2.2. Resultados y discusión del docking molecular del Complejo IV, subunidad IV .. | 70 |
| 2.2.3. Resultados de docking de la Acetilcolinesterasa | 73 |
| 2.3. Resultados de la actividad larvicida | 77 |
| 2.3.1. 1,8-cineol | 78 |
| 2.3.2. Quercetina | 78 |
| 2.3.3. Carvacrol..... | 80 |
| 2.3.4. Timol..... | 82 |
| 2.3.5. Xantona | 84 |
| 3. Conclusiones del capítulo 1..... | 86 |
| CAPÍTULO 2. Actividad enzimática de metabolitos de plantas que afectan los complejos mitocondriales II, IV y la acetilcolinesterasa de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> | 88 |
| 1. Metodología Fase <i>In vitro</i> | 88 |
| 1.1. Determinación de la actividad enzimática mitocondrial | 89 |
| 1.1.1. Homogeneizado y cuantificación del extracto de larvas de <i>Aedes aegypti</i> | 89 |
| 1.1.2. Succinato oxidasa | 89 |
| 1.1.3. Succinato deshidrogenasa | 90 |
| 1.1.4. Citocromo C oxidasa | 90 |
| 1.2. Inhibición de la acetilcolinesterasa..... | 91 |
| 1.2.1. Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa a partir del extracto de larvas 91 | |
| 1.3. Análisis estadístico | 92 |
| 2. Resultados y discusión del capítulo | 92 |

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.1. Efecto de los metabolitos sobre la actividad de las enzimas mitocondriales y la acetilcolinesterasa..... | 92 |
| 2.1.1. Enzima succinato oxidasa..... | 93 |
| 2.1.2. Enzima succinato deshidrogenasa..... | 95 |
| 2.1.3. Enzima citocromo C oxidasa..... | 96 |
| 2.1.4. Enzima acetilcolinesterasa..... | 98 |
| 3. Conclusiones del capítulo 2..... | 100 |
| CAPÍTULO 3. Discusión y conclusiones globales..... | 101 |
| 1. Discusión global..... | 101 |
| 2. Conclusiones globales..... | 109 |
| 3. Recomendaciones..... | 110 |
| 4. Divulgación científica..... | 110 |
| 5. Agradecimientos..... | 111 |
| ANEXOS..... | 112 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 120 |

Lista de figuras

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Ciclo de vida del mosquito <i>Aedes aegypti</i> . | 20 |
| Figura 2. Cadena respiratoria mitocondrial | 39 |
| Figura 3. Mecanismo de acción de la hidrólisis de la acetilcolina. | 43 |
| Figura 4. Mecanismo de acción de AChE en la neurotransmisión. | 44 |
| Figura 5. Mapa metodológico de la fase computacional e <i>In vivo</i> del proyecto de investigación. | 49 |
| Figura 6. Modelo de homología creado para la subunidad A del complejo II. | 57 |
| Figura 7. Estructura del complejo respiratorio mitocondrial II. | 58 |
| Figura 8. Gráfica de Ramachandran del modelo creado a partir del complejo II. | 59 |
| Figura 9. Modelo de homología para la subunidad IV del complejo IV. | 60 |
| Figura 10. Gráfica de Ramachandran del modelo creado a partir del complejo IV. | 61 |
| Figura 11. Estructura cristalina de la acetilcolinesterasa de la <i>Drosophila melanogaster</i> . | 62 |
| Figura 12. Alineamiento realizado en el programa gratuito Clustal Omega entre las especies <i>Drosophila melanogaster</i> y <i>Aedes aegypti</i> . | 63 |
| Figura 13. Visualización del flutolanil. | 64 |
| Figura 14. Visualización de interacción proteína-ligando en el complejo II (A) 1,8 Cineol (verde claro) (B) Eugenol (morado) (C) Timol (amarillo) (D) Quercetina (Azul claro) (E) Xantona (rosado claro). | 69 |
| Figura 15. Visualización de interacción del ligando inhibidor en el complejo IV donde la 6-hidroxidopamina. | 70 |
| Figura 16. Visualización de interacción proteína-ligando en el complejo. Quercetina (azul claro). | 72 |
| Figura 17. Visualización de interacción entre el ligando inhibidor en la acetilcolinesterasa donde el I40 (uva). | 74 |
| Figura 18. Visualización de interacción proteína-ligando en la acetilcolinesterasa (A) Quercetina (azul claro) (B) Fentión (verde) (C) Eugenol (fucsia) (D) Carvacrol (morado). | 76 |
| Figura 19. Porcentaje de mortalidad de 1,8-cineol sobre larvas de mosquito de <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas. | 78 |
| Figura 20. Porcentaje de mortalidad de la quercetina sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas. | 79 |
| Figura 21. Porcentaje de mortalidad del carvacrol sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado. | 81 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 22. Porcentaje de mortalidad del timol sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado. *Diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0,05$). | 83 |
| Figura 23. Porcentaje de mortalidad de la xantona sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado. | 85 |
| Figura 24. Esquema metodológico experimental de la fase In Vitro del proyecto de investigación. | 88 |
| Figura 25. Reacción de Ellman. | 91 |
| Figura 26. Actividad para succinato oxidasa, en mitocondria de larva <i>Ae. aegypti</i> en presencia de carvacrol (37,4 ppm, 18,7 ppm, 9,7 ppm y 4,7 ppm), timol (63,3 ppm, 31,6 ppm, 15,8 ppm y 7,9 ppm) y xantona (3,5 ppm, 1,8 ppm, 0,9 ppm y 0,4 ppm). | 94 |
| Figura 27. Actividad para succinato deshidrogenasa, en mitocondria de larva <i>Ae. aegypti</i> en presencia de carvacrol (9,7 ppm), timol (7,9 ppm) y xantona (0,4 ppm). El control fue tomado como el 100% y corresponde a $63,96 \pm 6,81$ pmol DCPIP/min·mg proteína. | 96 |
| Figura 28. Actividad para citocromo C oxidasa, en mitocondria de larva <i>Ae. aegypti</i> en presencia de carvacrol (9,7 ppm), timol (7,9 ppm) y xantona (0,4 ppm). El control fue tomado como el 100% y corresponde a $3,92 \pm 1,89$ nmoles de citocromo c oxidado/min·mg de proteína. | 97 |
| Figura 29. Actividad para acetilcolinesterasa, en mitocondria de larva <i>Ae. aegypti</i> en presencia de carvacrol (9,7 ppm), timol (7,9 ppm) y xantona (0,4 ppm). El control fue tomado como el 100% y corresponde a $2,58 \pm 0,34$ pmol nmoles de DTNB /min·mg de proteína. | 99 |
| Figura 30. Posible mecanismo de apoptosis mitocondrial generado por carvacrol.. | 102 |
| Figura 31. Formas de resonancia de la molécula de xantona. | 107 |

Lista de tablas

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Valores de docking molecular, energía de afinidad y propiedades ADME para los 10 mejores compuestos con actividad insecticida reportada para el complejo II | 65 |
| Tabla 2. Valores de docking molecular, energía de afinidad y propiedades ADME para los 10 mejores compuestos con actividad insecticida reportada para el complejo IV. | 72 |
| Tabla 3. Valores de docking molecular, energía de afinidad y propiedades ADME para los 10 mejores compuestos con actividad insecticida reportada para la acetilcolinesterasa. | 73 |
| Tabla 4. Concentraciones letales de quercetina sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza. | 79 |
| Tabla 5. Concentraciones letales de Carvacrol sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza. | 82 |
| Tabla 6. Concentraciones letales de timol sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza. | 83 |
| Tabla 7. Concentraciones letales de quercetina sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza. | 85 |

Anexos

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Anexo 1. Base de datos metabolitos con actividad insecticida | 112 |
| Anexo 2. Propiedades ADME de los metabolitos seleccionado | 117 |
| Anexo 3. Alineamiento realizado en el programa gratuito Clustal Omega entre las especies <i>Mus musculus</i> , <i>Bos Taurus</i> y <i>Aedes aegypti</i> . | 118 |
| Anexo 4. Certificado I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas 2021 | 118 |
| Anexo 5. Primera página del artículo científico sometidos en la revista <i>Medical and Veterinary Entomology</i> . | 119 |

Lista de abreviaturas

| | |
|---------|------------------------------------------------------|
| AChE | Acetilcolinesterasa |
| ADME | Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADP | Adenosín difosfato |
| Ae. | Aedes |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| BSA | Albúmina bovina sérica |
| CcO | Citocromo c oxidasa |
| CD | Concentraciones diagnósticas |
| CHIKV | Chikunguña |
| CI | Concentración inhibitoria |
| CINTROP | Centro de investigaciones en enfermedades tropicales |
| CL | Concentración letal |
| Cyt C | Citocromo C |
| DCPIP | 2,6-diclorofenolindofenol |
| DENV | Dengue |
| DL | Dosis letal |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DTNB | 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EGTA | Ácido etilenglicon tetraacético |
| FAD | Flavín adenín dinucleótido |
| FMN | Flavín mononucleótico |
| GIBIM | Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología |
| INS | Instituto Nacional de la Salud |

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

| | |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------|
| LogHERG | CI50 para el bloqueo de los canales HERG K ⁺ |
| LogKp | Permeabilidad en la piel |
| LogP | Logaritmo P |
| MM-GBSA | Mecánica molecular con Born generalizado y solvatación de área superficial |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| P | Peso |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PDB | Base de datos de proteínas |
| PEP | Fosfoenol piruvato |
| PLIP | Perfiles de interacción proteína-ligando |
| PMS | Fenacina metosulfato |
| ppm | Partes por millón |
| PSA | Área de superficie polar molecular |
| QH2 | Ubiquinol |
| RMSD | Desviación cuadrática media |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| S | Solubilidad |
| SDH | Succinato deshidrogenasa |
| SP | Precisión estándar |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TPSA | Área de superficie polar topológica |
| UNICEF | Fondo de las naciones unidas para la infancia |
| XP | Extra-precisión |
| ZIKV | Zika |

RESUMEN

Durante los últimos años, las epidemias de los virus del Zika, dengue y chikunguña han tenido un impacto significativo en la mayoría de las regiones tropicales y otros territorios donde está presente el vector *Aedes aegypti*; por ello, su efecto se ha convertido en una problemática de salud pública. La Organización Mundial de la Salud (OMS) notificó 3.110.442 casos de arbovirosis en el año 2022. Del total de casos, 2.803.096 (90.1%) fueron casos de dengue, 271.006 (8,7%) casos de chikunguña y 36.340 (1,2%) casos de zika, en las Américas y el Caribe, y se encuentran entre las primeras enfermedades con mayor incidencia en zonas tropicales (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

En la actualidad, una solución efectiva y rápida para evitar el brote masivo del vector son los insecticidas sintético, causantes de problemas ambientales, de salud y resistencia en la especie (Devine, 2008). Por otro lado, la alternativa de insecticidas naturales es menos agresiva con el ambiente, razón por la cual, este trabajo tuvo como objetivo la identificación mediante técnicas *In silico* de metabolitos naturales que sirvan para el control del vector *Aedes aegypti*, teniendo como diana farmacológica la mitocondria, específicamente en los complejos II, IV y la acetilcolinesterasa, y su posterior evaluación, *In vitro* e *In vivo*, de los compuestos promisorios.

Este libro se encuentra dividido en tres capítulos, en el primero se muestra la identificación y selección de los metabolitos promisorios por acoplamiento molecular. El segundo capítulo muestra las técnicas experimentales aplicadas en las enzimas mitocondriales y la acetilcolinesterasa, y, por último, en el tercer capítulo se relacionan los resultados obtenidos en los anteriores capítulos. Para la fase *In silico*, se elaboró un modelo de homología para cada proteína y se eligió la estructura cristalina de la especie *Drosophila*

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

melanogaster para la enzima acetilcolinesterasa. Luego, se construyó una base de datos con metabolitos de plantas y se evaluó la posible interacción de estos metabolitos secundarios con los modelos de cada enzima usando el paquete “Small Molecule Drug Discovery” de Schrödinger. En la etapa *In vivo*, se evaluó el efecto tóxico de los metabolitos previamente seleccionados sobre las larvas en estadios 3 y 4 luego de 24 y 48 horas de exposición, determinando así las concentraciones letales (CL_{50}). Como resultados de la fase *In vitro* e *In vivo*, se seleccionaron los compuestos carvacrol, timol y xantona, debido a su mayor letalidad sobre larvas de *Ae. aegypti*, y, se les evaluó su efecto sobre el transporte de electrones a través de las proteínas de los complejos II, IV, así como el efecto en la actividad de la acetilcolinesterasa, con el fin de relacionar el efecto tóxico de estos metabolitos sobre los organismos vivos, con la actividad de las proteínas relevantes como la AChE y la mitocondria. Los resultados obtenidos en el docking molecular sugieren que el carvacrol, el timol y la xantona pueden interactuar con las subunidad A del complejo II y la subunidad IV del complejo IV, así como también pueden interaccionar con la acetilcolinesterasa. Para soportar estos resultados, la evaluación de la fase *In Vivo*, indican que, el carvacrol, presentó un CL_{50} de 37,4 ppm y 34,5 ppm para las 24 y 48 horas respectivamente. El timol mostró un CL_{50} de 63,3 ppm y 56,7 ppm para las 24 y 48 horas respectivamente, y, la xantona presentó un CL_{50} de 3,5 ppm para las 24 horas y de 2,7 ppm para las 48 horas. Dicha mortalidad puede estar relacionada con la inhibición de la cadena transportadora de electrones a través de la inhibición producida por el carvacrol en el complejo IV y la xantona y el timol en el complejo II. Además, el compuesto carvacrol, logró inhibir efectivamente la enzima acetilcolinesterasa. De esta forma, los metabolitos evaluados en este estudio se presentan como alternativas naturales prometedoras y de gran impacto para el control del vector, por la excelente alteración de la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria y la

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

acetilcolinesterasa del individuo; además, se demuestra la efectividad de los estudios *In silico* para evaluación preliminar de futuros compuestos.

ABSTRACT

In recent years, the Zika, dengue, and chikungunya virus epidemics have had a significant impact in most tropical regions and other territories where the *Aedes aegypti* vector is present; therefore, its effect has become a public health problem. The World Health Organization (WHO) reported 3,110,442 cases of arboviruses in the year 2022. Of the total cases, 2,803,096 (90.1%) were dengue cases, 271,006 (8.7%) chikungunya cases, and 36,340 (1.2%) cases of Zika, in the Americas and the Caribbean, and are among the first diseases with the highest incidence in tropical areas (Pan American Health Organization, 2022).

Currently, an effective and quick solution to avoid the massive outbreak of the vector are synthetic insecticides, which cause environmental, health and resistance problems in the species (Devine, 2008). On the other hand, the alternative of natural insecticides is less aggressive with the environment, which is why this work aimed to identify, through *In silico* techniques, natural metabolites that serve to control the *Aedes aegypti* vector, having as a pharmacological target the mitochondria, specifically in complexes II, IV and acetylcholinesterase, and their subsequent evaluation, *In vitro* and *In vivo*, of the promising compounds.

This book is divided into three chapters. The first shows the identification and selection of promising metabolites by molecular coupling. The second chapter shows the experimental techniques applied to mitochondrial enzymes and acetylcholinesterase, and finally, the third chapter lists the results obtained in the previous chapters. For the *In silico* phase, a homology model was developed for each protein and the crystalline structure of the *Drosophila melanogaster* species was chosen for the acetylcholinesterase enzyme. Then, a database with plant metabolites was built and the possible interaction of these secondary

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

metabolites with the models of each enzyme was evaluated using Schrödinger's 'Small Molecule Drug Discovery' package. In the *In vivo* stage, the toxic effect of the previously selected metabolites on larvae in stages 3 and 4 after 24 and 48 hours of exposure was evaluated, thus determining the lethal concentrations (LC_{50}). As results of the *In vitro* and *In vivo* phase, the compounds carvacrol, thymol and xanthone were selected, due to their higher lethality on *Ae. aegypti*, and their effect on the transport of electrons through the proteins of complexes II, IV, as well as the effect on the activity of acetylcholinesterase, was evaluated in order to relate the toxic effect of these metabolites on the living organisms, with the activity of relevant proteins such as AChE and mitochondria. The results obtained in molecular docking suggest that carvacrol, thymol and xanthone can interact with subunit A of complex II and subunit IV of complex IV, as well as interact with acetylcholinesterase. To support these results, the evaluation of the *In Vivo* phase indicates that carvacrol presented an LC_{50} of 37.4 ppm and 34.5 ppm for 24 and 48 hours, respectively. Thymol showed an LC_{50} of 63.3 ppm and 56.7 ppm for 24 and 48 hours, respectively, and xanthone had an LC_{50} of 3.5 ppm for 24 hours and 2.7 ppm for 48 hours. Said mortality may be related to the inhibition of the electron transport chain through the inhibition produced by carvacrol in complex IV and xanthone and thymol in complex II. In addition, the compound carvacrol managed to effectively inhibit the enzyme acetylcholinesterase. In this way, the metabolites evaluated in this study are presented as promising natural alternatives with great impact for vector control, due to the excellent alteration of the activity of the enzymes of the respiratory chain and the individual's acetylcholinesterase; In addition, the effectiveness of *in silico* studies for preliminary evaluation of future compounds is demonstrated.

INTRODUCCIÓN

Los virus transmitidos por artrópodos causan una gran diversidad de enfermedades en los seres humanos, pero solo tres de ellos han producido un gran impacto en la humanidad: el dengue, Zika y chikinguña, siendo el vector *Aedes aegypti* el principal transmisor de estos virus. Es por ello por lo que la Organización Mundial de la Salud ha investigado y desarrollado múltiples métodos para controlar la propagación del mosquito *Aedes aegypti* y obstaculizar el contacto entre el ser humano y este vector, todo esto con el fin de prevenir y disminuir la transmisión de los virus (Organización Panamericana de la Salud (OPS) OPS/OMS, 2020). Una solución inmediata que se ha desarrollado es el uso de insecticidas químicos; sin embargo, uno de los principales efectos colaterales de la implementación de estos productos son los efectos en las especies no objetivo y la contaminación de los ecosistemas (Devine, 2008). Además, se ha reportado que la aplicación repetida de estos insecticidas aumenta la resistencia en los insectos hacia estos compuestos y puede resultar en el surgimiento de una nueva plaga (Devine, 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, con el fin de disminuir el impacto ambiental generado por los insecticidas comerciales y notando la problemática de las enfermedades causadas por este vector, el objetivo de este trabajo de investigación fue identificar metabolitos de plantas con actividad insecticida y enzimática, teniendo como diana farmacológica la mitocondria y la acetilcolinesterasa, mediante técnicas *In silico*, *In vivo* e *In vitro* en larvas del mosquito de *Aedes aegypti*.

Para llevar a cabo el objetivo mencionado anteriormente, en primer lugar, se presenta una visualización general de la problemática y aspectos teóricos que envuelven el estudio,

donde se menciona cómo la modulación de la bioenergética mitocondrial es una diana farmacológica para el diseño de insecticidas naturales.

Luego, se presenta una descripción de la metodología, comenzando con la selección de los metabolitos de plantas a los cuales se les realizó un análisis *In silico*, por medio de docking molecular. Del proceso anterior, se seleccionaron metabolitos promisorios que fueron evaluados mediante técnicas *In vitro* e *In vivo*, comprobando su actividad larvicida en *Ae. aegypti* sobre los complejos de la cadena transportadora de electrones y la acetilcolinesterasa.

1. Marco de referencias y antecedentes

1.1. *Aedes aegypti*

El mosquito *Aedes aegypti* es la principal especie responsable de transmitir virus como el Zika, el Dengue y el Chikunguña; es originario de África, pero en la actualidad se localiza en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (World Mosquito Program, 2019). Los mosquitos *Aedes aegypti* adultos se distinguen de otros tipos de mosquitos por su cuerpo estrecho y típicamente negro, patrones únicos de escamas claras y oscuras en el abdomen y el tórax, y bandas claras y oscuras alternas en las piernas. Las hembras se distinguen además por la forma del abdomen y por sus palpos maxilares, que son más cortos que la probóscide, además, los mosquitos *Aedes aegypti* suelen mantener el cuerpo bajo y paralelo al suelo con la probóscide inclinada hacia abajo cuando aterrizan (Rogers, 2019).

El ciclo de vida de los mosquitos *Aedes aegypti* consta de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto (**Figura 1**) (Rogers, 2019). Las hembras depositan huevos en una superficie húmeda cerca de la línea de flotación en lugares que puedan almacenar agua. Posteriormente,

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

los huevos eclosionan en lotes, por aproximadamente algunos días o semanas, ya que ciertos huevos requieren remojos múltiples en agua antes de la eclosión (**Figura 1**). Los huevos pueden soportar largos períodos de sequedad y mantenerse activos durante muchos meses, lo que les permite sobrevivir a inviernos fríos y otras condiciones climáticas adversas (World Mosquito Program, 2019).

Al convertirse en larvas, por lo general se hospedan en agua, colgando boca abajo en la superficie del agua, donde usan un sifón respiratorio corto y grueso para absorber oxígeno (Rogers, 2019). Las larvas maduran a través de cuatro estadios, en el último estadio se convierten en pupas, que posteriormente se transforman en adultos, emergiendo a la superficie del agua. A los dos días, los mosquitos adultos se aparean y las hembras consumen sangre por primera vez (Quispe-Pretel et al., 2014).

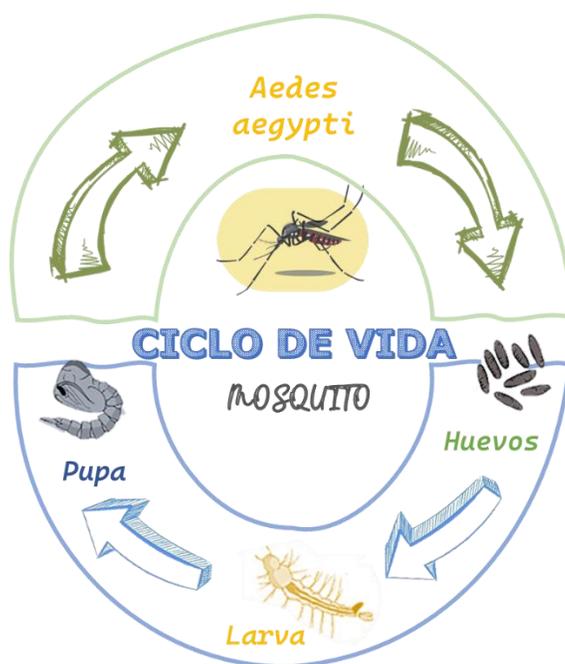


Figura 1. Ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti*.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Los mosquitos *Aedes aegypti* se alimentan durante el día, principalmente al amanecer y al anochecer. Tienden a alimentarse de humanos y de más de una persona. Aunque muchas especies prefieren alimentarse y reproducirse al aire libre, otras viven en estrecha sociedad con los humanos y depositan sus huevos con el contacto con la piel humana (Quispe-Pretel et al., 2014).

Teniendo en cuenta su ciclo de vida corto, los mosquitos de *Aedes aegypti* tienden a reproducirse continuamente, además son resistentes a las altas temperaturas de las zonas tropicales, lo que hace que estos aumenten los índices de las enfermedades que transmiten, generando altos porcentajes de mortalidad en los seres humanos (Quispe-Pretel et al., 2014).

1.2. Dengue, Zika y chikunguña, entre otras enfermedades transmitidas por mosquitos

Los arbovirus enfermedades virales transmitidas por artrópodos, las cuales, resultan significativas tanto en morbilidad como mortalidad alrededor del mundo, y tres de ellos son transmitidos por el mosquito *Aedes aegypti*; el dengue (DENV), Zika (ZIKV), pertenecientes a la familia de flavivirus y el chikunguña (CHIKV), de la familia de togavirus (Weaver et al., 2009; Vasilakis & Gubler, 2016).

En el año 2021, la Organización Mundial de la Salud (OMS) notificó 3.110.442 casos de arbovirosis. Del total de casos, 2.803.096 (90.1%) fueron casos de dengue, 271.006 (8,7%) casos de chikunguña y 36.340 (1,2%) casos de zika (Organización Panamericana de la Salud, 2022). El número más alto de casos de dengue grave se observó en los siguientes países: Colombia con 864 casos, Honduras con 851 casos y Brasil con 346 casos, adicionalmente, en el mismo periodo, se notificaron un total de 387 muertes en la región. (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Según el Instituto Nacional de Salud, la incidencia de dengue a nivel nacional para el 2021 es de 172,9 y en 2022 es de 30,2 casos por 100.000 habitantes en riesgo y los departamentos con incidencias superiores a 400 casos por 100.000 habitantes en riesgo y la mayor proporción de casos son Cartagena, Amazonas y Barranquilla. Considerando la población en riesgo, la incidencia de chikungunya en Colombia del año 2021 fue de 0,36 casos por cada 100.000 habitantes y en 2022 de 0,23 casos por cada 100.000 habitantes. Las entidades territoriales que tienen el mayor número de casos son Antioquia, Amazonas y Santander. Finalmente, la incidencia de enfermedad por virus Zika en Colombia del año 2021 fue de 0,23 casos por cada 100.000 habitantes en riesgo y en 2022 de 0,15 casos por cada 100 000 habitantes en riesgo. Las entidades territoriales de Putumayo, Santander, Tolima, Meta y Cundinamarca superan la incidencia nacional y a su vez tienen el mayor número de casos (Instituto Nacional de Salud, 2022).

Teniendo en cuenta lo anterior, los brotes epidemiológicos por estos virus se suelen producir concurrentemente, y actualmente, gracias al cambio climático global, se puede estar facilitando la expansión de poblaciones de mosquitos vectores (Campbell et al., 2015). Hasta ahora no se ha podido realizar control poblacional del vector de forma eficaz y permanente (UNICEF, 2016), y aunque, actualmente se estén adelantando estudios para obtener vacunas como la Sanofi Pasteur(Dengvaxia), que se encuentra en tercera fase para el dengue, la USAMRIID, que culminó la segunda fase para el chikunguña y la vacuna que está realizando el laboratorio Inovio, para el virus del Zika, entre otras (Palomares et al., 2018), los gobiernos deben seguir fomentando el estudio y fabricación de insecticidas que tengan características óptimas e ideales para hacer frente al problema epidemiológico.

El desarrollo de insecticidas, a pesar de no ser una cura directa para las enfermedades descritas, es una alternativa útil, efectiva y rápida para controlar la incidencia de los vectores.

1.3. Insecticidas actuales y su mecanismo de acción

Una de las soluciones que el ser humano ha desarrollado para el control de vectores, son los insecticidas químicos y sintéticos, cada uno con mecanismos de acción bastante diferentes. Los insecticidas se clasifican en siete grupos según dicho mecanismo: tóxicos físicos, venenos protoplásmicos, venenos nerviosos, inhibidores metabólicos, toxinas citolíticas, venenos musculares y agentes alquilantes (Ponce et al., 2006). Cuatro de los grupos más importantes de insecticidas son los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides; pertenecientes al grupo de venenos nerviosos (Ponce et al., 2006). Los primeros, afectan los axones de las neuronas, impidiendo la transmisión normal del impulso nervioso, además de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias y la reacción de Hill en los cloroplastos (Arregui & Puricelli, 2008). Los organofosforados y carbamatos presentan su acción tóxica bloqueando importantes enzimas del sistema nervioso llamadas colinesterasas; durante la sinapsis el impulso es transmitido por la acetilcolina, la cual es degradada por la colinesterasa, para permitir otra transmisión (Fishel, 2018). Finalmente, los piretroides afectan tanto el sistema nervioso central como el periférico, estimulando inicialmente las células nerviosas y produciendo repetidas descargas además de eventuales casos de parálisis (Mondragón, 2002).

A pesar de su efectividad, los insecticidas sintéticos ocasionan daños irremediables en el ambiente, la aparición de plagas secundarias y el aumento de poblaciones de plagas primarias (Puerto Rodríguez et al. 2014). Es por ello por lo que se están realizando gran

variedad de estudios para producir nuevas alternativas amigables con el medio ambiente y que eviten la mayoría de estos efectos secundarios, como lo son el uso de insecticidas naturales a base de metabolitos de aceites secundarios de plantas (Leyva, 2008; Muñoz, 2014; Henao et al. 2007; Amariles-Barrera, 2013; Bazán-Calderón et al. 2011; Sanabria et al. 2009).

Durante los últimos años, se han ido afinando estrategias para minimizar el proceso de investigación sobre el mecanismo de acción y resistencia de un insecticida, con el fin de reducir el tiempo y su costo de fabricación. Es así, como los mecanismos computacionales se convierten en un enfoque prometedor para obtener claridad del objetivo de acción de los insecticidas, sus mecanismos de resistencia y el diseño estructural de estos.

1.4.Diseño de insecticidas empleando enfoques computacionales

Los costos para la elaboración de un nuevo producto y descubrimiento de nuevos fármacos pueden oscilar entre 1 y 2 mil millones de dólares (USD), y un tiempo hasta de 15 años (Myers & Baker, 2001). De este modo, la búsqueda de nuevos compuestos y su análisis con respecto a una diana farmacológica por medio de recursos computacionales resulta ser un paso clave a la hora clasificar candidatos para el desarrollo de productos como medicamentos, tratamientos e insecticidas, entre otros.

Pues bien, el proceso de diseño e identificación de nuevos fármacos o compuestos con actividad biológica por medio de computadora se puede dividir en 2 fases: SBDD (Structure Based on Drug Design por sus siglas en inglés) y LBDD (Ligand Based on Drug Design por sus siglas en inglés).

Los métodos SBDD permiten el diseño de fármacos candidatos que se predice que se unan a la diana con alta afinidad y selectividad (Kalyaanamoorthy & Chen, 2011). La

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

suposición que justifica el enfoque SBDD es que el potencial de una molécula para tener los efectos biológicos deseados para una proteína específica depende de su grado de capacidad para interactuar con los sitios de unión de esa proteína (Shanmugam & Jeon, 2017).

En otras palabras, si se conoce la proteína diana y se tiene una estructura 3D disponible, los investigadores comúnmente diseñarán fármacos contra esa proteína utilizando el modelo SBDD, ya que, utiliza la forma y estructura 3D de la proteína como base para diseñar nuevos fármacos (Extrapolations powered by Schrödinger). Si no hay información de la estructura 3D del objetivo, puede ser posible crear un modelo de homología basado en la similitud de la secuencia primaria del objetivo con las proteínas homólogas, cuya estructura 3D se conoce empíricamente. La estructura 3D, ya sea una estructura experimental o ya encontrada, de la proteína objetivo proporciona información sobre el entorno químico de los sitios activos, lo que permite identificar ligandos que pueden unirse al sitio activo con alta afinidad y selectividad (Shanmugam & Jeon, 2017).

Una vez que se construye el modelo que proporciona el entorno químico de los sitios activos, las interacciones proteína-ligando se pueden explorar a través del acoplamiento molecular, un método que predice la orientación energéticamente estable del ligando cuando se une a la proteína objetivo. El grado de estabilidad de la interacción entre las moléculas es el factor clave para determinar las consecuencias biológicas de la interacción (Durrant & McCammon, 2010).

Una vez que se selecciona el objetivo, la base de datos de moléculas pequeñas se selecciona para la detección virtual y se exploran sus interacciones de unión con el objetivo farmacológico seleccionado. Los compuestos mejor clasificados con las interacciones de unión deseadas se seleccionan como compuestos principales para los pasos posteriores,

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

usando el método de cribado virtual (SBVS), evaluando grandes bibliotecas de compuestos para descubrir nuevos compuestos mediante la comparación de estructuras 3D de ligandos con el sitio activo del objetivo. En el cribado virtual basado en la estructura, la afinidad del ligando por la proteína diana se estima mediante el acoplamiento molecular seguido de la aplicación de la función de puntuación (McInnes, 2007).

Ahora bien, en muchos casos, la estructura 3D de la proteína objetivo o su homólogo no está disponible para el enfoque SBDD, es por ello por lo que, en algunos casos, el uso de proteínas homólogas poco fiables (por ejemplo, baja identidad de secuencia) para el modelado de homología puede dar lugar a una alta tasa de falsos positivos. En tales situaciones, el investigador puede usar el método LBDD, que se basa en el conocimiento de las características estructurales y químicas que deben tener las moléculas para unirse al objetivo de interés (Geppert et al., 2010). Lo que LBDD realmente hace es construir un modelo llamado modelo de farmacóforo, que implica la alineación de múltiples ligandos, que pueden determinar las características químicas esenciales que son responsables de su bioactividad, fundado en el conocimiento de tales moléculas que se unen al objetivo y, a su vez, emplear este modelo para el diseño de nuevos fármacos candidatos. Alternativamente, LBDD puede construir una relación estructura-actividad cuantitativa predictiva (QSAR), que relaciona las estructuras químicas que describen las propiedades fisicoquímicas únicas de conjuntos de compuestos de interés con su actividad biológica respectiva (Bordás et al., 2003; Goodford, 1985).

Una vez que se construye el modelo de farmacóforo, se realizan predicciones sobre si es probable que los ligandos candidatos se unan al objetivo mediante la comparación con el modelo de farmacóforo. Este proceso se denomina cribado virtual basado en ligandos

(LBVS). Es un enfoque que funciona mejor en la exploración de compuestos candidatos con las características químicas deseadas de un conjunto amplio y diverso de bibliotecas químicas (Oprea & Matter, 2004).

Ahora bien, el enfoque de diseño de fármacos basado en fragmentos o diseño de ligando de novo (DnLD) permite construir desde cero nuevos ligandos. Debido a la ventaja de adaptar los nuevos compuestos, DnLD se ha empleado de manera efectiva tanto en enfoques SBDD como LBDD. En el caso de SBDD, las características químicas del sitio activo en el objetivo se consideran para diseñar los nuevos compuestos, mientras que en LBDD, las características químicas derivadas del farmacóforo o QSAR se utilizan para el diseño de nuevos compuestos (Dey & Caflisch, 2008; Yang, 2010). Sin embargo, el verdadero comportamiento del compuesto químico es en muchos casos incierto y, por lo tanto, la falta de evidencia empírica es una desventaja de este enfoque (Shanmugam & Jeon, 2017).

1.4.1. Modelos de homología

Como se mencionaba en el anterior apartado, a la hora de estudiar una proteína, es de suma importancia el estudio de su funcionamiento, sin embargo en las bases de datos no se encuentran reportadas todas las estructuras cristalinas para cada una de las proteínas identificadas en un organismo, allí es cuando el modelado de homología es útil y se emplea cuando una proteína modelo se puede relacionar con una secuencia conocida y una estructura desconocida, para producir un modelo tridimensional de la proteína que se quiere estudiar (Robinson et al., 2014).

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Actualmente, se conoce que existe una gran relación entre la estructura que adopta la proteína y la función que realiza. Por ello, poseer la estructura tridimensional de una proteína es vital para investigar cuáles aminoácidos contribuyen a su estabilidad, por qué una región está mayor o menormente conservada, qué aminoácidos forman la superficie de la proteína, cuáles están directamente involucrados en su funcionamiento y cuáles aminoácidos interaccionan con otra molécula (Bino & Sali, 2003). Lo anterior se consigue confrontando dos secuencias homólogas y formando estructuras proteicas similares, para ajustar la estructura tridimensional de una proteína específica que no haya sido determinada experimentalmente (Contreras, 2018).

Ahora bien, para obtener un buen diseño de un modelo de homología, en primer lugar, se debe identificar los homólogos específicos de la proteína a evaluar, y determinar a qué línea evolutiva pertenece. Comúnmente, esto se forja a partir de información de secuencias, e incluso datos de alineamientos estructurales; por lo general, se basa en alineaciones de secuencias por pares en serie con la ayuda de técnicas de búsqueda en bases de datos como FASTA y BLAST (Bino & Sali, 2003).

En segundo lugar, se realiza el alineamiento de los homólogos con la proteína base, para visualizar las regiones que probablemente tengan una estructura común. Una vez que la estructura con la similitud de secuencia más alta se identifica como plantilla, las secuencias completas de la plantilla y las proteínas diana deben realinearse utilizando algoritmos de alineación refinados, como Praline y T-coffee, para obtener una alineación óptima (Bino & Sali, 2003).

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

El tercer paso es construir una estructura para la proteína objetivo que consta de átomos de la cadena principal, en donde las coordenadas de los residuos correspondientes de las proteínas molde pueden copiarse simplemente en la proteína diana.

Después de ello, se construye el modelo, adicionando y optimizando bucles y átomos de la cadena lateral. Una vez cimentados los átomos de la cadena principal, se deben determinar las posiciones de las cadenas laterales que no se modelan. Modelar la geometría de la cadena lateral es muy importante para evaluar las interacciones proteína-ligando en los sitios activos y las interacciones proteína-proteína en la interfaz de contacto (Bino & Sali, 2003).

A continuación, se refina y optimiza todo el modelo según criterios energéticos, aplicando el procedimiento de minimización de energía en todo el modelo, para, finalmente evaluar la calidad general del modelo obtenido, y asegurarse de que las características estructurales del modelo sean consistentes con las reglas fisicoquímicas (Sagar, 2019). Un modelo útil debe presentar un porcentaje de similitud entre la secuencia diana y la secuencia molde mayor al 30% (Madhumathi et al., 2022).

Para el campo de la producción de nuevos insecticidas, el modelamiento molecular funciona para predecir la estructura cristalina de dianas de insectos que no hayan sido investigadas y caracterizadas experimentalmente, y así, comprender de una manera más profunda la información estructural del individuo, identificar los posibles sitios dentro de la proteína y destacar el sitio de unión más probable entre las moléculas con características insecticidas y la proteína a inhibir (Crisan et al., 2022).

Una vez construido el modelo de homología, el siguiente paso es evaluar las interacciones específicas entre la proteína modelada y las sustancias desconocidas. Para ello existe un proceso denominado docking molecular o acoplamiento molecular, que predice la conformación predilecta de una molécula, al interactuar con otra, con el fin de formar un complejo estable.

1.4.2. Docking molecular

1.4.2.1. Teoría de acoplamiento

El objetivo del acoplamiento molecular es dar una predicción de la estructura del complejo ligando-receptor utilizando métodos de computación. El acoplamiento se puede lograr a través de dos pasos: primero tomando muestras de las conformaciones del ligando en el sitio activo de la proteína; luego clasificar estas conformaciones a través de una función de puntuación, todo esto, a través de los algoritmos de muestreo (Meng et al., 2011).

1.4.2.2. Algoritmos de muestreo

Los algoritmos de muestreo facilitan la visualización de una gran cantidad de posibles modos de unión entre dos moléculas, teniendo en cuenta los seis grados de libertad de traslación y rotación, así como los grados de libertad conformacionales tanto del ligando como de la proteína (Meng et al., 2011). Entre ellos se encuentran los algoritmos de coincidencia, algoritmos de construcción elemental, MCSS, LUDI, Monte Carlo, algoritmos genéticos y la dinámica molecular.

Además de los algoritmos de muestreo, que facilitan la visualización de los diferentes modos de unión entre la molécula y la proteína, existe otra característica que permite elegir las poses correctas de estos modos de unión, que se denominan funciones de puntuación.

1.4.2.3. Funciones de puntuación

El propósito de la función de puntuación es delinear las poses correctas de las incorrectas o los aglutinantes de los compuestos inactivos en un tiempo de cálculo razonable. Sin embargo, las funciones de puntuación implican estimar, en lugar de calcular, la afinidad de unión entre la proteína y el ligando y, adoptar varias suposiciones y simplificaciones. Las funciones de puntuación se pueden dividir en funciones de puntuación basadas en campos de fuerza, empíricas y basadas en el conocimiento (Meng et al., 2011).

Dichas funciones de puntuación son empleadas por tres de los software más usados en el campo de la ciencia, AutoDock, GlideScore y Potential of Mean Force (Potencial de Fuerza Media por sus siglas en inglés – PMF):

Por ejemplo, para las funciones de puntuación basadas en campos de fuerza extendida, el software AutoDock utiliza la ecuación 1, mostrando que para dos átomos i, j , la energía atómica por pares se evalúa mediante la suma de van der Waals, los puentes de hidrógeno, la energía de Coulomb y la desolvatación (Meng et al., 2011).

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)}$$

Ecuación 1. Función de puntuación basada en campos de fuerza extendida de AutoDock.

Tomado de (Meng et al., 2011).

Un inconveniente importante de esta función es que no considera un efecto solvente importante, ya que los grupos cargados favorecen los ambientes acuosos, mientras que los grupos no polares tienden a permanecer en ambientes no acuosos, lo que comúnmente se

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

conoce como efecto de desolvatación (Friesner et al., 2004). Esto podría conducir a resultados sesgados ya que la función sería totalmente dependiente de las interacciones coulombicas y, por lo tanto, favorecería a los ligandos altamente cargados. En otras palabras, solo tiene en cuenta la interacción de proteína y ligando, lo cual es inadecuado. Para construir una función más robusta, también se necesita evaluar cómo ambos interactúan con el agua antes de la formación del complejo y cómo el agua interviene en este proceso (Sethi et al., 2019).

Por otro lado, GlideScore tiene en cuenta muchos términos de energía diferentes, mostrada en la ecuación 2, ya que es una función de puntuación empírica diseñada para maximizar la separación de compuestos con fuerte afinidad de unión de aquellos con poca o ninguna capacidad de unión, que se compone de términos que explican la física del proceso de unión, incluido un término lipófilo-lipófilo, términos de puentes de hidrógeno, una penalización de enlace giratorio y contribuciones de energías proteína-ligando coulomb-van der Waals. Además de estos términos, GlideScore incluye términos para tener en cuenta el recinto hidrofóbico, que es el desplazamiento de moléculas de agua por un ligando desde áreas con muchos átomos de proteína lipofílica proximal, particularmente beneficiosa para la unión es la formación de uno o más puentes de hidrógeno proteína-ligando dentro de las regiones del espacio hidrofóbico (Friesner et al., 2006).

$$\Delta G_{\text{bind}} = C_0 + C_{\text{lipo}} \sum f(r_{\text{lr}}) + C_{\text{hbond}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{\text{metal}} \sum f(r_{\text{lm}}) + C_{\text{rotb}} H_{\text{rotb}}$$

Ecuación 2. Función de puntuación empírica de GlideScore. Tomado de (Friesner et al., 2006).

Finalmente, PMF usa una función de puntuación basada en el conocimiento, que se deriva de la información estructural incrustada en distribuciones atómicas determinadas experimentalmente, ya que opera un análisis estadístico sobre estructuras cristalinas de complejos para obtener las frecuencias de contacto interatómico entre la proteína y el ligando basándose en la presunción de que cuanto más fuerte sea una interacción, mayor será la frecuencia de su aparición. La función tiene en cuenta los contactos favorables y las interacciones repulsivas entre cada átomo del ligando y la proteína que se encuentran dentro de una esfera con un límite específico (Sethi et al., 2019).

En la ecuación 3, k_B es la constante de Boltzmann; T es la temperatura absoluta; r es la distancia del par de átomos; $f_{Vol_corr}^j(r)$ es el factor de corrección del volumen del ligando; $\frac{\rho_{seg}^{ij}(r)}{\rho_{bulk}^{ij}(r)}$ designa la función de distribución radial de un átomo de proteína de tipo i y un átomo de ligando de tipo j (Meng et al., 2011).

$$PM_score = \sum_{r < r_{cut-off}^{ij}} k_B A_{ij}(r) \quad A_{ij}(r) = -k_B T \ln \left[f_{Vol_corr}^j(r) \frac{\rho_{seg}^{ij}(r)}{\rho_{bulk}^{ij}(r)} \right]$$

Ecuación 3. Funciones de puntuación basadas en el conocimiento PMF. Tomado de (Meng et al., 2011).

La simplicidad computacional de las funciones basadas en el conocimiento proporciona una gran ventaja, especialmente cuando se tiene a la mano grandes bases de datos; sin embargo, la precisión de predecir el estado de referencia y la subrepresentación de las interacciones con halógenos y metales son los principales obstáculos (Sethi et al., 2019).

Para resumir, cada una de las funciones de puntuación clasificadas anteriormente tienen sus inconvenientes inherentes, en este sentido, la combinación de más de una función de puntuación ha dado mejores resultados. Este enfoque ha sido ampliamente considerado como "puntuación de consenso" (Sethi et al., 2019).

Una vez evaluadas las interacciones entre las moléculas, el programa inicia un análisis de estimación de fuerzas entre átomos dentro de moléculas y también entre moléculas, calculando la energía potencial de un conjunto de átomos y moléculas denominado campo de fuerza.

1.4.3. Campos de fuerza

El concepto de campos de fuerza se emplea ampliamente como una de las herramientas más simples en el modelado molecular. Son fundamentalmente importantes en los programas de diseño de fármacos de *novato*, en el mapeo de farmacóforos y representan las funciones de puntuación en muchos programas de acoplamiento. Los campos de fuerza son usados para la clasificación de las poses de ligandos obtenidas mediante un algoritmo de acoplamiento, o en programas de diseño de ligandos de *novato* para sugerir la posición de fragmentos en sitios de la enzima con la mayor afinidad de unión (Pissurlenkar et al., 2009).

Otra función importante es calcular la energía de interacción entre la proteína y el ligando como potenciales de interacción por pares que consisten en interacciones electrostáticas y de van der Waals, además de la energía del enlace de hidrógeno entre el ligando y la enzima, además de calcular las perturbaciones de energía libre (FEP) que permiten el diseño de nuevos inhibidores con una predicción precisa de su actividad (Pissurlenkar et al., 2009).

Algunos ejemplos de software de diseño de fármacos en los que se han implementado campos de fuerza como funciones de puntuación son AMBER, GOLD AutoDock, DOCK y GlideScore.

Al finalizar el proceso del cribado virtual, el investigador puede decidir entre conservar los datos del cribado virtual y finalizar su investigación o llevar este análisis a la parte experimental, que le permitirá acceder a un mejor entendimiento del verdadero impacto de esas interacciones en el individuo. Una de esas aplicaciones es la creación de nuevos insecticidas a base de metabolitos naturales, en donde utilizan los mecanismos computacionales para analizar el sitio de unión de la diana farmacológica con el compuesto e investigar su mecanismo de acción a través de pruebas *In vivo* e *In silico*.

1.4.4. Aplicación en insecticidas de las técnicas computacionales

El modelamiento molecular y todas sus opciones computacionales han permitido que la evolución de los insecticidas haya ido en progreso, además de que permite una evaluación casi precisa de las interacciones entre la diana farmacológica a evaluar y el compuesto desconocido, esto con el fin de disminuir el costo del análisis y así, poder analizar más de cuatro mil fármacos de forma rápida y sencilla, con tan solo un software. Muchas investigaciones han favorecido a la exploración de nuevos insecticidas por métodos computacionales, confirmando la importancia de estos.

En la investigación de Crisan y otros colaboradores en el año 2022, analizan el receptor de dopamina similar a D1 en la especie *Anopheles gambiae*, en donde construyen un modelo de homología 3D, y, logran identificar los posibles sitios dentro de la proteína, además de destacar el sitio de unión más probable. El modelo de homología, junto con una

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

serie de antagonistas del receptor de la dopamina con actividad conocida contra las larvas de *Anopheles gambiae* se utilizaron en experimentos de acoplamiento para obtener información sobre sus interacciones intermoleculares. Finalmente, lograron predecir la toxicidad y los peligros ambientales de un nuevo insecticida potencial contra el mosquito *Anopheles gambiae* (Crisan et al., 2022).

Por otro lado, en la búsqueda de Qudsia y otros colaboradores, lograron crear la estructura 3D de la corion peroxidasa de *Ae. aegypti* y *Ae. gambiae* que se predijo utilizando ITASSER y se refinó con los servidores 3Drefine y GalaxyWEB. Los sitios de unión de ligandos se predijeron mediante el uso de servidores 3DLigandSite, RaptorX y COACH. Los compuestos ligandos/inhibidores se obtuvieron de la bibliografía y del banco de fármacos. El acoplamiento proteína-ligando se realizó mediante AutoDock Vina. Los modelos de farmacóforo se generaron utilizando LigandScout. Las interacciones de proteínas y ligandos se determinaron a través de LIGPLOT. De esta manera, lograron seleccionar los diez compuestos principales con la mejor puntuación de ajuste para cada especie para el acoplamiento con la enzima a evaluar, lo que finalmente condujo a la selección de un compuesto principal que mostró la energía de enlace más baja y las mejores interacciones para cada especie (Qudsia et al., 2019).

Otra investigación muestra que los neonicotinoides son la clase de insecticidas de más rápido crecimiento aplicados con éxito en la protección de plantas, el cuidado de la salud humana y animal, pero poseen aumentos significativos en la resistencia, por lo que condujeron a la necesidad urgente de nuevos neonicotinoides alternativos, con actividad insecticida mejorada. En este análisis, usaron el acoplamiento molecular para describir un modo de unión común de los neonicotinoides en el receptor de acetilcolina nicotínico y

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

seleccionaron las conformaciones apropiadas para derivar modelos. Además, usaron un estudio QSAR que empleó enfoques tanto lineales como no lineales para modelar la actividad inhibitoria contra los pulgones del caupí, que se realizó mediante regresión lineal múltiple y mínimos cuadrados parciales y el modelado no lineal mediante redes neuronales artificiales y métodos de máquinas de vectores de soporte. Finalmente, se predijeron cinco nuevos insecticidas, de acuerdo con el dominio de aplicabilidad del modelo, las eficiencias del ligando y el modo de unión (Bora et al., 2019).

En conclusión, los modelos desarrollados a través de estructuras computacionales se pueden utilizar con confianza para la predicción de la actividad insecticida de nuevos productos químicos, ahorrando una cantidad sustancial de tiempo y dinero y, además, asistiendo a la evaluación del riesgo químico.

Por otro lado, la identificación de una buena diana farmacológica puede abordarse mediante inferencias computacionales, a través de técnicas para predecir las interacciones proteína-molécula (Schenone et al., 2013). Diferentes estudios para la creación de insecticidas han demostrado que la mitocondria es una excelente diana farmacológica de estudio para utilizar esas interacciones evaluadas por computadora y demostrar el efecto de las moléculas en los insectos objetivo, ya que las mitocondrias son un orgánulo intracelular importante, debido a sus roles funcionales en el metabolismo y la señalización celulares para la proliferación y muerte celular (Dhanasekaran et al., 2020; Goodman et al., 2017; Sene et al., 2021; Lima et al., 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, conocer las funciones específicas de la mitocondria y de cada uno de sus complejos, además de cómo se ejerce la transferencia de electrones, es un estrategia clave para su selección como diana farmacológica.

1.5. Estrategias para el diseño de insecticidas

1.5.1. La mitocondria como diana para el diseño de insecticidas

La mitocondria es el organelo encargado de la producción de ATP, y por tanto de generar energía dentro de la célula (Detmer & Chan, 2007). La producción de energía en la célula se da gracias a la cadena respiratoria mitocondrial, compuesta por cinco complejos donde los primeros cuatro, se encargan del flujo de electrones y creación de potencial de membrana mitocondrial, para finalizar el proceso en la ATP sintasa (complejo V), encargada de sintetizar el ATP (Sousa et al., 2018).

La producción de ATP comienza cuando el NADH se oxida por acción del complejo I o NADH deshidrogenasa (**Figura 2**), donando sus electrones. Una vez allí, pasan los electrones a la coenzima Q y se genera la energía necesaria para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (**Figura 2**). Luego, el FADH₂ es oxidado a FAD⁺, por acción del complejo II o succinato deshidrogenasa (**Figura 2**), llevando los electrones a la coenzima Q, siendo este el aceptor de electrones común del complejo I y II, para luego pasar estos electrones al complejo III o ubiquinol-citocromo-c reductasa (**Figura 2**), que, transporta los electrones hasta el citocromo C (Cyt C) (**Figura 2**), y posteriormente el Cyt C es oxidado por el complejo IV (**Figura 2**), quien a su vez entregará estos electrones al oxígeno para formar dos moléculas de agua, y el potencial electroquímico que será finalmente utilizado por el ATP sintasa (**Figura 2**), para convertir el ADP en ATP por acción del complejo V o ATP sintasa (Sousa et al., 2018).

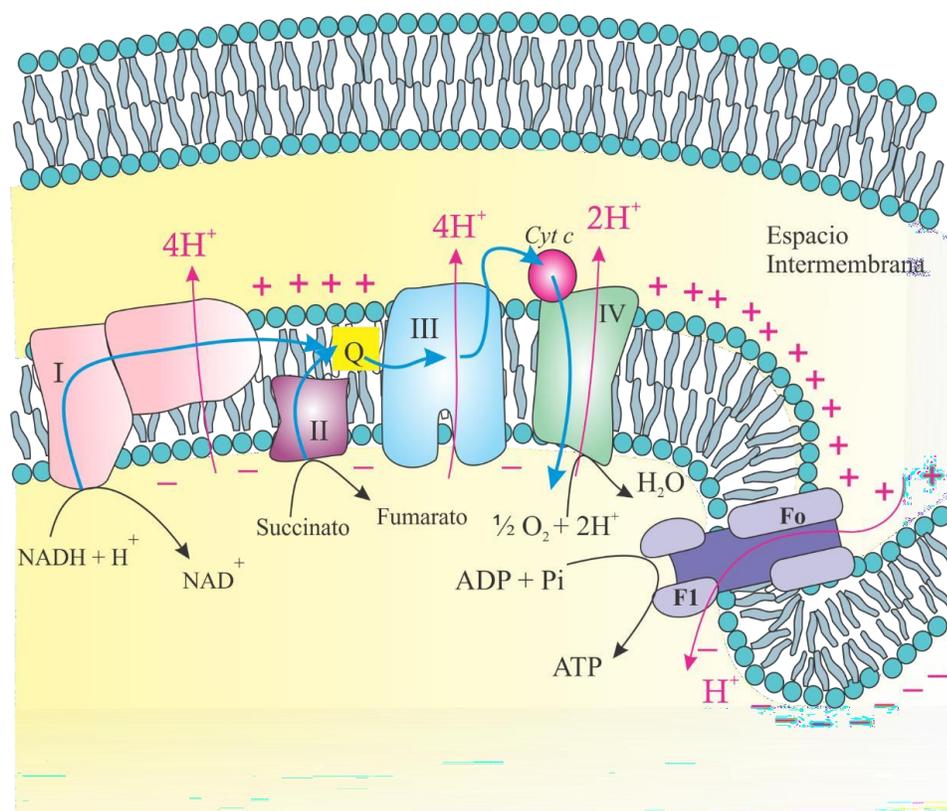


Figura 2. Cadena respiratoria mitocondrial. En la imagen se puede ver el complejo I (rosa), complejo II (morado), coenzima Q (amarillo), complejo III (azul celeste), citocromo C (fucsia), complejo IV (verde) y ATP sintasa (morado oscuro). (Imagen adaptada de Nelson, D. & Cox, M. 2008).

Así mismo, el objeto de estudio de este proyecto de investigación fue el complejo II y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, ya que, son importantes para el desarrollo del proceso de la fosforilación oxidativa, siendo el complejo II, un complejo proteico esencial en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) hipóxicos, y, su actividad catalítica cambia de succinato deshidrogenasa a fumarato reductasa a una tensión de oxígeno reducida, modulando así la direccionalidad del flujo de electrones (Paddenberget al., 2003), y el complejo IV, que cataliza el paso final en la cadena de transferencia de electrones mitocondrial y se considera uno de los principales sitios de regulación para la fosforilación oxidativa (Li et al., 2006). Además de estos dos complejos, se decidió evaluar

también la actividad de la acetilcolinesterasa por su función específica de terminar la transmisión neuronal y la señalización entre las sinapsis para evitar la dispersión de la ACh y la activación de los receptores cercanos (Trang & Khandhar, 2022).

1.5.2. Complejo II

El Complejo II funciona como un segundo punto de entrada en la cadena de transporte de electrones, que está involucrada en la producción de ATP para impulsar los procesos celulares. Los electrones proporcionados por el succinato viajan primero a FAD y luego a lo largo de una serie de grupos de azufre de hierro a un aceptor de ubiquinona (Schaller, 2022).

El complejo II, también juega un papel importante en otro proceso bioquímico, el ciclo del ácido cítrico. Uno de los pasos del ciclo del ácido cítrico es la oxidación del succinato a fumarato. Es durante esta oxidación que se introducen electrones adicionales en la cadena de transporte de electrones a través del complejo II. Al mismo tiempo, también se liberan dos protones del succinato, se forma un doble enlace en la nueva molécula de fumarato, que se dice que está "deshidrogenada" con respecto al succinato original. El complejo II es la enzima que lleva a cabo esta transformación en el ciclo del ácido cítrico, por lo que el complejo también se denomina "succinato deshidrogenasa" (Schaller, 2022).

Ahora bien, en todas las reacciones de deshidrogenación se requiere una molécula de NAD^+ o de FAD, produciéndose la forma reducida de estos compuestos: NADH o FADH_2 . Estas coenzimas, al ceder los electrones a la cadena respiratoria, se transforman nuevamente a su forma oxidada. Si hay un bloqueo en algún componente de la cadena respiratoria el NADH y el FADH_2 no podrán ceder los electrones al componente que normalmente los recibe puesto que va a estar saturado de estas partículas (reducido) y por lo tanto incapacitado

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

para ceder o aceptar electrones. Por lo tanto, cuando está presente un agente inhibidor del transporte de electrones, aumenta la concentración de NADH y FADH₂ y disminuye la de NAD⁺ y FAD, lo que va a ocasionar que también se detengan las deshidrogenasas que requieren esas moléculas como cofactores (Guerra, 2014).

Un inhibidor competitivo de la succinato deshidrogenasa es el malonato, el cual se une al sitio de unión del succinato en el complejo II, impidiendo la transferencia de electrones, ya que, la reacción que cataliza la enzima es la de deshidrogenar al succinato para producir fumarato y FADH₂, el malonato provoca un detenimiento en el ciclo de Krebs, deteniendo la cadena respiratoria y por lo tanto la maquinaria de producción de ATP (GonzálezCalvar & Corini, 2004).

Por otro lado, el complejo IV también fue seleccionado para su evaluación, ya que es el final de la cadena de transporte de electrones y cumple una función de gran importancia en el proceso de fosforilación oxidativa, ya que cataliza la oxidación del citocromo C transfiriendo sus electrones al oxígeno.

1.5.3. Complejo IV

El complejo IV o citocromo C oxidasa, es el complejo proteico final en la cadena de transporte de electrones. Es una gran colección de polipéptidos dispuestos en 13 subunidades, tres de las cuales están codificadas en el genoma mitocondrial. El citocromo c portador de electrones transfiere un solo electrón, pero se requieren múltiples electrones para intervenir con el oxígeno. Este proceso que reduce una molécula de oxígeno a una molécula de agua y proporciona 4 hidrógenos al espacio intermembrana empieza con la transferencia de electrones uno a la vez desde el citocromo C a través del centro de cobre al primer grupo

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

hemo que contiene hierro. Desde allí se transfieren al segundo grupo hemo y al tercer átomo de cobre. Cuando se reciben los dos primeros electrones, una molécula de oxígeno puede unirse al centro del complejo, pero el doble enlace se rompe para formar un puente de peróxido energético. La llegada de dos citocromos C más proporciona dos electrones más y la extracción de dos hidrógenos de la matriz conduce a la formación de dos hidróxidos. La entrada de dos protones adicionales desde la matriz conduce a la formación de dos moléculas de agua (Nave, 2005).

Cabe aclarar que este es un proceso redox que además de la reducción del oxígeno a agua, actúa como una bomba de protones para extraer 8 protones de la matriz y entregar 4 de ellos al espacio intermembrana donde pueden contribuir al proceso de fosforilación oxidativa para producir la molécula de alta energía, ATP (Nave, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior, al inhibir este complejo con alguna sustancia que pueda tener interacciones de cualquier tipo con su estructura, como el cianuro, inhibirá el complejo IV de la cadena de transporte de electrones, agotando el ATP, lo que culmina en la muerte celular (Csaba, 2015).

Como se ha mencionado antes, la mitocondria y sus complejos son una diana farmacológica apta para realizar estudios para la creación de nuevos insecticidas. Sin embargo, otra diana farmacológica a evaluar es la acetilcolinesterasa, ya que su función es primordial para el desarrollo de la vida del insecto, por tanto. Es de gran importancia tenerla en cuenta como un posible target para este tipo de análisis.

1.5.4. Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima presente en insectos y mamíferos que juega un rol importante en la sinapsis entre células nerviosas y musculares. Esta enzima es la encargada de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina en acetato y colina (**Figura 3**). La acetilcolina es sintetizada a partir de colina y acetil CoA a nivel neuronal, y tiene un papel fundamental en la neurotransmisión, ya que, una vez liberada al espacio sináptico, puede ejercer sus efectos sobre los receptores postsinápticos. Es allí cuando la acetilcolinesterasa rompe la acetilcolina para formar acetato y colina, deteniendo la señal del neurotransmisor en la célula sináptica, la colina nuevamente es absorbida a nivel neuronal, permitiendo que las partes puedan ser reconstruidas formando nuevamente moléculas de acetilcolina que pueden ser usados en la siguiente señal (Trang & Khandhar, 2022).

La inhibición de la AChE causa acumulación de la acetilcolina, lo que conlleva a la hiperestimulación de los receptores nicotínicos y muscarínicos, interrumpiendo la neurotransmisión y generando ataxia, es decir, pérdida total de la coordinación en el sistema neuromuscular y eventual muerte (**Figura 4**) (Fukuto, 1990; López & Pascual-Villalobos, 2010).

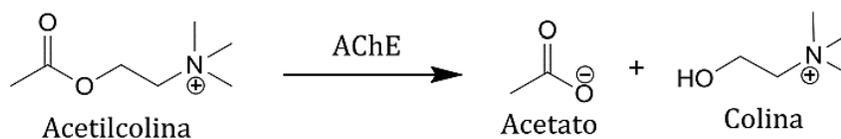


Figura 3. Mecanismo de acción de la hidrólisis de la acetilcolina.

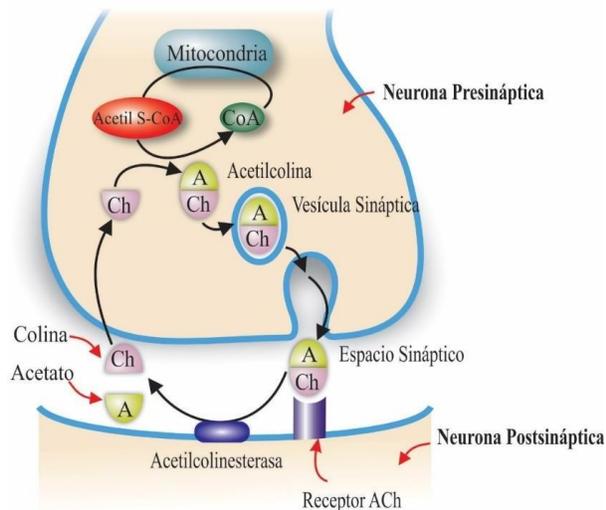


Figura 4. Mecanismo de acción de AChE en la neurotransmisión. Tomado de Borrero-Landazabal, 2018.

Continuando con el proceso analítico, una vez escogida la diana a evaluar, la selección de compuestos que presenten interacciones con esa diana específica sería el siguiente paso para continuar con el proceso de la investigación de nuevos insecticidas.

En la búsqueda de alternativas a los insecticidas convencionales, los secundarios de plantas aromáticas han sido ampliamente investigados. Su toxicidad hacia los insectos ha sido de especial interés durante la última década y han sido utilizados como objetivo de estudio para el descubrimiento de nuevos insecticidas amigables con el medio ambiente y con menos efectos secundarios que los insecticidas químicos (Zoubiri & Baaliouamer, 2014).

1.6. Plantas medicinales como alternativa para insecticidas convencionales

Uno de los enfoques alternos más efectivos bajo el programa de control de vectores es explorar la biodiversidad floral y entrar en el campo del uso de insecticidas de origen botánico más seguros como un método simple y sostenible de control de mosquitos (Ghosh et al., 2012). Los insecticidas a base de metabolitos de plantas medicinales son

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

extremadamente funcionales, pues, a diferencia de los insecticidas convencionales que se basan en un único ingrediente activo, los insecticidas derivados de plantas comprenden mezclas botánicas de compuestos químicos que afectan procesos conductuales y fisiológicos (Devine, 2008). Por lo tanto, baja la probabilidad de que las plagas desarrollen resistencia a tales sustancias, además de que son eco-amigables y económicamente factibles (Martínez, 2009). Los productos botánicos tienen propiedades insecticidas generalizadas y perceptiblemente funcionarán como una nueva arma en el arsenal de insecticidas sintéticos y, en el futuro, pueden actuar como un producto alternativo adecuado para luchar contra las enfermedades transmitidas por mosquitos (Leyva, 2017).

Por otra parte, para garantizar la viabilidad del mecanismo de acción de los insecticidas, se ha investigado la mitocondria como diana farmacológica para el diseño de estos, ya que, es el centro de obtención de energía en forma de ATP y es donde ocurre el transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, procesos de inducción de muerte celular programada, estrés oxidativo, producción de especies reactivas de oxígeno y producción de mensajeros secundarios (Detmer & Chan, 2007).

Teniendo en cuenta lo anterior, si se ataca esta organela, el tiempo de vida del organismo se reduciría radicalmente, objetivo principal de los insecticidas convencionales, y actualmente, de los insecticidas biológicos. Algunos ejemplos de la acción de compuestos provenientes de plantas o de aceites esenciales sobre la mitocondria, son aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* (Fam. Myrtaceae), evaluado sobre la bioenergética mitocondrial, aumenta la velocidad del consumo de oxígeno en los estados 3 y 4, disminuye el CCR, desacopla la fosforilación oxidativa, aumenta la actividad de la enzima citocromo c oxidasa

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

y aumenta la actividad ATPasa en mitocondrias íntegras, a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Vesga et al., 2014).

El linalol, a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$, también afecta la tasa de consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 de las mitocondrias energizadas con glutamato-malato y succinato, además, inhibe la actividad del complejo I, III y ATPasa (Bueno-Duarte et al. 2015).

Los metabolitos de naturaleza terpénica como el 1,8-cineol y de la α -tujona encontrados en el aceite esencial *Salvia officinalis*, evaluados sobre larvas de *Aedes aegypti*, mostraron que eran altamente permeables en las membranas biológicas sin riesgos mutagénicos, junto con alteraciones en la integridad del ADN en larvas expuestas y homogeneizadas; estos resultados indican que los metabolitos afectan la integridad del ADN, la cadena de respiración mitocondrial y la actividad de la AChE (Castillo-Morales et al. 2019).

Otra investigación señala que los metabolitos secundarios como el acetato de geranilo, el α -humuleno, el β -cariofileno, el nerol, el n-octanol y el geraniol inhibieron al menos uno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial con una eficiencia de entre el 25 y el 41 % a concentraciones de 44, 41, 48, 84, 87 y 98 ppm, respectivamente (Borrero-Landazabal et al. 2020).

Adicionalmente, el aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, con citral (geranial + neral) como componente principal, mostró una mayor actividad larvicida de *Aedes aegypti* a una concentración de 17,1 ppm (Smith Vera et al., 2014).

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

En consecuencia, estas investigaciones demuestran que algunos aceites esenciales de plantas presentan una letalidad frente al mosquito *Aedes aegypti*, siendo una opción efectiva y viable para ingeniar nuevos productos que sean insecticidas de origen natural y, que sean una posible solución a la problemática actual del vector responsable de los virus Dengue, Zika y Chikunguña. Así pues, se planteó la hipótesis de que los metabolitos secundarios son una potente alternativa para el diseño de nuevos insecticidas, y se buscó corroborar esta afirmación con los objetivos mostrados a continuación. Como objetivo general se propuso la identificación de metabolitos naturales que sirvan de control alternativo para el vector *Aedes aegypti*, teniendo como diana farmacológica la mitocondria, específicamente en los complejos II, IV y la acetilcolinesterasa, con ayuda de técnicas *In silico*, *In vitro* e *In vivo*, con el fin de desarrollar los siguientes objetivos específicos: identificar mediante técnicas *In silico* metabolitos de plantas medicinales con posible actividad larvicida teniendo como diana farmacológica la mitocondria y la acetilcolinesterasa; determinar la actividad larvicida de los metabolitos identificados en *Aedes aegypti*; y, evaluar la actividad enzimática de los metabolitos con mejor actividad larvicida sobre la bioenergética mitocondrial y sobre la actividad de la acetilcolinesterasa de larvas de *Aedes aegypti*.

CAPITULO 1. Análisis *In silico* e *In vivo* de metabolitos de plantas que afectan los complejos mitocondriales II, IV y la acetilcolinesterasa.

El análisis computacional presentado en este capítulo muestra una técnica ampliamente utilizada para predecir energías y modos de interacción entre ligandos y proteínas, lo que proporciona información de gran utilidad para el estudio de nuevos compuestos con efectos terapéuticos, dando una visión previa al estudio experimental y proporcionar un acercamiento de los resultados que se pueden obtener al final del proceso investigativo. Para este fin, se elabora un modelo de homología de cada proteína y una búsqueda, identificación y preparación de los compuestos a evaluar, y se da cumplimiento a los dos primeros objetivos específicos de la investigación:

Identificar mediante técnicas *In silico* metabolitos de plantas medicinales con posible actividad larvicida teniendo como diana la mitocondria y la acetilcolinesterasa.

Determinar la actividad larvicida de los metabolitos identificados en *Ae aegypti*.

1. Metodología de fase *In silico* e *In vivo*

La metodología detallada en la **figura 5**, representa las etapas computacionales y experimentales que fueron implementadas para la fase preliminar, fase *In silico* y fase *In vivo*.

En la fase *In vivo*, se realizó la evaluación de la actividad larvicida para los compuestos timol, quercetina, xantona, carvacrol y 1,8 cineol, para posteriormente evaluar su efecto en la bioenergética mitocondrial.

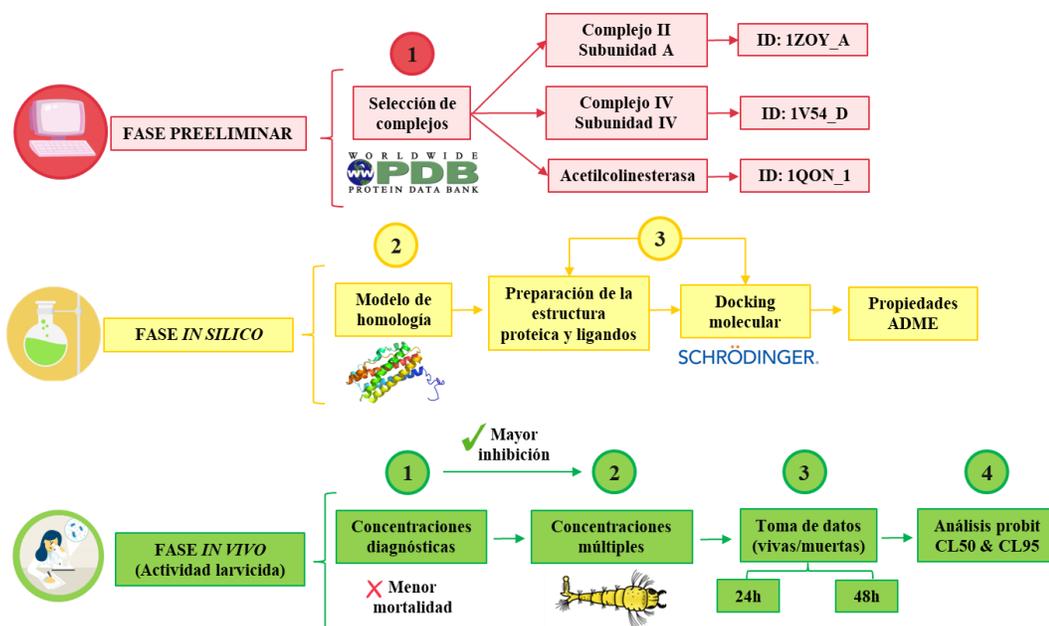


Figura 5. Mapa metodológico de la fase computacional e *In vivo* del proyecto de investigación.

1.1.Fase preliminar

Se identificaron 226 metabolitos secundarios de aceites esenciales derivados de plantas con actividad insecticida registrada en la literatura (**Anexo 1**). De acuerdo con estos compuestos se estableció una base de datos, seleccionando la estructura química en formato SDF de cada uno de ellos, obtenidas de la plataforma Pubchem, para ejecutar la siguiente fase de la metodología computacional en el programa Maestro (Schrödinger, Inc.).

1.2.Fase *In Silico*

1.2.1. Modelos de homología para los complejos II, IV y selección de la estructura cristalina de la acetilcolinesterasa

Los complejos mitocondriales II, IV, propios de la cadena respiratoria mitocondrial, y la acetilcolinesterasa, de la especie *Ae. aegypti*, fueron el foco central de este estudio, ya que son piezas fundamentales para el desarrollo de las actividades básicas del mosquito, y,

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

por tanto, principal objetivo de inhibición. Las investigaciones computacionales se llevaron a cabo utilizando el software Maestro Small Molecule Drug Discovery de Schrödinger.

Actualmente, la estructura cristalina de los complejos II, IV y acetilcolinesterasa para *Ae. aegypti* no se encuentra caracterizada en la literatura, por lo que se realizaron modelos de homología en donde se utilizaron criterios de similitud para la selección de plantillas de los complejos teniendo en cuenta la semejanza de secuencias. Las secuencias FASTA de cada subunidad se importaron de la base de datos de la Uniprot (Karine et al., 2012; Uniprot, 2019); en este caso, solo se eligieron subunidades para el complejo II (subunidad A ID: A0A6I8TJS2) y IV (subunidad IV ID: Q16KF6).

Con ayuda del software BLAST Homology Search se identificó el template modelo de cada complejo: el template del complejo II (subunidad A) PDB ID: 1ZOY_A (2,40 Å) de la especie *Sus scrofa* (Inaoka DK et al., 2015) con una identidad de 80% y template complejo IV (subunidad IV) PDB ID: 1V54_D (1,80 Å) con una identidad de 41% de la especie *Bos Taurus* (Mesquita et al., 2021).

Para la creación del modelo de homología de las dos proteínas se empleó el aplicativo Prime incluido en la interfaz Maestro (Schrödinger, Inc.) (Schrödinger Release 2021-4: Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021), haciendo la alineación de secuencia con los valores predeterminados del programa. A continuación, el sistema se sometió a minimización de energía y refinamiento de loops usando la herramienta Protein Preparation Wizard, solucionando los problemas estructurales, agregando átomos de hidrógeno de acuerdo con el pH fisiológico (7,4), identificando cadenas laterales y residuos faltantes, utilizando el campo de fuerza del OPLS3e y un modelo de solvatación VSGB, para finalmente aprobar el modelo requerido (Jianing et al., 2011) (Roos et al., 2019).

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Para la acetilcolinesterasa no se realizó modelo de homología, ya que, en las bases de datos presentes, no existe ninguna estructura cristalina registrada de la especie de *Ae. aegypti*, así que se usó la estructura cristalina de esta proteína en la especie *Drosophila melanogaster*, debido a su alta similitud en su secuencia genética con la especie de interés, en donde se realizó un alineamiento en los software Cluster Omega y Sequence Manipulation Suite, y su porcentaje de identidad obtenido fue del 62,63% y el porcentaje de similitud fue del 72,28%. Además, en la investigación de Harel y otros científicos confirman que la estructura cristalina de la especie *Drosophila melanogaster* es adecuada para realizar estudios con *Aedes aegypti* (Harel et al., 2000); por lo cual, se empleó la estructura cristalina con código PDB ID: 1QON_1 (Resolución: 2,72 Å).

1.2.2. Preparación y screening virtual de los ligandos y la proteína

Para evaluación de la interacción de los metabolitos secundarios con las proteínas que fueron dianas farmacológicas, se prepararon por medio de la herramienta LipPrep Schrödinger, Inc (Natarajan A, et al., 2015), generando todos los estados de protonación posibles en un rango de pH de $7,2 \pm 0,2$ y tautómeros basados en el valor de pKa teórico calculado (Pietro et al., 2016; Martin, 2009). Una vez preparados los ligandos, se determinaron las propiedades ADME por medio de la interfaz Qik Prop de Maestro, Schrödinger, Inc (Natarajan A, et al., 2015) correspondientes a cada uno de ellos, con el fin de calcular el descriptor molecular y predecir el perfil ADME de estos compuestos, y, de esta manera prever alguna violación de las reglas de Lipinski (Natarajan A, et al., 2015).

Entre los valores analizados se examinó el peso molecular, el coeficiente de partición octanol/agua (logP), enlaces de hidrógeno donados y aceptados por el soluto a moléculas de

agua y el área de superficie polar molecular (PSA, Polar Surface Area), el valor de CL₅₀ previsto para el bloqueo de los canales HERG K⁺ (LogHERG), siendo un canal bien conocido por su importante papel en la actividad eléctrica del corazón que coordina los latidos del corazón (Chemi et al., 2017), la absorción oral humana, la permeabilidad cutánea (logK_p), entre otras, como se muestra en el **Anexo 2**.

La estructura cristalina de la acetilcolinesterasa se preparó mediante la interfaz Protein Preparation Wizard (PrepWiz) de Schrödinger, Inc (Sastry et al., 2013), agregando átomos de hidrógeno de acuerdo al pH fisiológico (7,4), la identificación de cadenas laterales y residuos faltantes, siendo completados con ayuda del software Prime de Schrödinger, Inc. (Pietro et al., 2016; Martin, 2009), la minimización del sistema manteniendo el RMSD debajo del umbral, la corrección de estados de protonación con un campo de fuerza OPLS3e y cadenas laterales faltantes. (Pietro et al., 2016; Martin, 2009).

1.2.3. Docking molecular de los ligandos

El docking molecular predice el sitio y modo de unión de la molécula acoplada en una región específica llamada “binding pocket” de la diana a evaluar, mejorando la determinación y el diseño de nuevos inhibidores. Además, brinda una descripción precisa geométrica de las cargas electrostáticas (Sulimov et al., 2020), y proporciona varias poses para el mismo ligando, cambiando los ángulos de torsión de la estructura y dándoles un score específico; dicho puntaje se aprovecha para determinar la actividad o inactividad de cierta sustancia sobre la proteína a evaluar (Ferreira et al., 2015). Finalmente, descarta las regiones del espacio donde es más improbable encontrar una pose final con un buen docking score (Halgren et al., 2004).

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Para este proyecto, el docking se llevó a cabo empleando Glide (Schrödinger, Inc) (Friesner et al., 2004; Halgren et al., 2004) considerando los ligandos como flexibles paracada subunidad de los complejos.

Para el complejo II, la caja de acoplamiento se centró en los siguientes residuos: Thr 302, His 290, Glu 303, Gly 99; ya que es el sitio de unión de la ubiquinona, y allí mismo interactúa el flutolanil, un inhibidor de esta subunidad del complejo II (Inaoka DK et al., 2015); y se obtuvo una dimensión suficiente para acomodar los ligandos con una longitud ≤ 20 Å.

Para el complejo IV, se obtuvo una caja de acoplamiento centrada en los residuos: Thr 65, Asp 67, Lis 61, Ser 83, ya que este espacio actúa como sitio clave para el proceso de fosforilación oxidativa, favoreciendo el efecto del ATP sobre el complejo IV (Mesquita et al., 2021); y una dimensión de ≤ 20 Å de longitud.

Finalmente, la acetilcolinesterasa se centró en el “grid” o caja de acoplamiento de uno de los inhibidores cocrystalizado reportado en la literatura: el I40 (Ramos et al., 2020), y, una dimensión de ≤ 22 Å de longitud.

El acoplamiento se desarrolló a diferentes niveles de precisión (de menor a mayor precisión: SP (6 poses por ligando), XP (15 poses por ligando), respectivamente). Las poses mejor ranqueadas a partir del docking con precisión XP se les realizó un análisis por medio de la interfaz PLIP (Protein-Ligand Interaction Profile), a través de inspección visual, analizando el mejor docking score, número de interacciones, cantidad de enlaces de hidrógeno (Dharmagadda et al., 2005), la cual utiliza el cribado basado en interacciones, en contraste con los enfoques fundados en ligandos y targets, con fundamento en la estructura química o proteica, respectivamente (Halgren T et al., 2004; Adasme et al. PLIP, 2021; Salentin et al., 2015; Batista & Bajorath, 2010). Finalmente, a dichas poses, se les ejecutó el

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

debido análisis de la energía de afinidad (MM-GBSA) por medio de la interfaz Prime, Schrödinger, Inc, analizando propiedades como la masa molecular, los componentes débilmente polares SASA, el número estimado de enlaces de hidrógeno que serían donados por el soluto a las moléculas de agua en una solución acuosa, el número estimado de enlaces de hidrógeno que aceptaría el soluto de las moléculas de agua en una solución acuosa, el coeficiente de reparto octanol/agua, el valor previsto de LC₅₀ para el bloqueo de los canales HERG K⁺, la permeabilidad aparente prevista de las células Caco-2 en nm/seg, la absorción oral humana cualitativa, la absorción oral humana prevista en una escala del 0 al 100 % y el área superficial de van der Waals de átomos polares de nitrógeno y oxígeno; todo esto para predecir la energía libre entre receptor y ligandos, y, así, seleccionar de los metabolitos más aptos, por medio de una inspección visual, analizando el valor más negativo de esa energía, demostrando que la unión de los metabolitos es favorable y espontánea (Singh & Muthusamy, 2013; Ahumado Monterosa, 2018).

1.2.4. Visualización

Finalizado el proceso *In silico*, se realizaron los respectivos gráficos de cada proteína con las interacciones del ligando correspondientes en el software PyMOL by Schrödinger, usando un editor de gráficos vectoriales InkScape, para mejorar la edición y resolución de las figuras, con el fin de visualizar las poses e interacciones de cada compuesto con su respectiva proteína.

1.3.Fase *In Vivo*: actividad larvicida

La actividad larvicida se evaluó sobre larvas en tercer y cuarto estadio larval de *Ae. aegypti* cepa rockefeller de la colonia del laboratorio de entomología médica y Centro de investigación en enfermedades tropicales CINTROP, ubicado en el parque tecnológico guatiguara EDI laboratorio 110.

La colonia se mantuvo en jaulas de cría con dimensiones 40×40×40 cm en un insectario a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad de $70 \pm 5\%$, alimentada con una solución azucarada de miel al 10%. Las hembras fueron alimentadas, según la necesidad experimental, con sangre de rata albina raza Wistar WI IOPS AF/Han, proveniente del bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, con el fin de obtener huevos a los que se induce a eclosionar en bandejas de plástico con agua de clorada, hasta que alcancen la etapa larval requerida. Lo anterior, cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

La actividad larvicida de los metabolitos secundarios de plantas se evaluó transfiriendo 10 individuos a vasos plásticos de 200 mL con 99,5 mL de agua. A cada vaso de plástico se le agregó 0,5 mL de una solución inicial (compuesta del metabolito disuelto en DMSO), hasta un volumen final de 100 mL donde se realizaron los bioensayos concentración-respuesta.

En primer lugar, se evaluaron concentraciones diagnosticas de 30, 90 y 190 ppm, debido a que uno de los criterios para guiar la investigación de nuevos larvicidas es que las sustancias candidatas tengan un $LC_{50} < 100 \text{ mg/L}$ (Vera et al. 2014). Posteriormente, se evaluaron concentraciones múltiples para cada compuesto para establecer mortalidades entre

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

2 y 98 %. En cada caso, el tratamiento de control negativo fue DMSO al 0,5 %. Se realizaron pruebas por cuadruplicado (n = 40 larvas) para cada concentración evaluada repitiendo el experimento tres veces en días diferentes hasta utilizar un total de 120 larvas por cada tratamiento. Las larvas no fueron alimentadas durante todo el tratamiento. En cada ensayo se registró la mortalidad a las 24 y 48 h de exposición al metabolito evaluado.

Finalmente, luego de obtener los porcentajes de mortalidad, se realizó un procesamiento de datos, en función de la concentración, calculando los parámetros estadísticos, por medio de un método de regresión logarítmica usando los softwares PoloPlus y Graphpad Prism 8, y así, determinar Concentraciones Letales Media, CL₉₅, CL₅₀ (Dharmagadda et al., 2005), ayudando a establecer los metabolitos con mejor mortalidad en la actividad larvicida.

2. Resultados y discusión

2.1.Resultados de los modelos de homología para los complejos II y IV

2.1.1. Complejo II, subunidad A

El modelo de homología para la subunidad A (Figura 6) se diseñó comparando la secuencia A0A6I8TJS2 (Uniprot, 2019) con la estructura cristalina de código PDB: 1ZOY_A (2,40 Å), obteniendo una identidad de homología máxima del 80% y un score de 2619,0, con los respectivos arreglos de refinamiento y minimización del sistema.

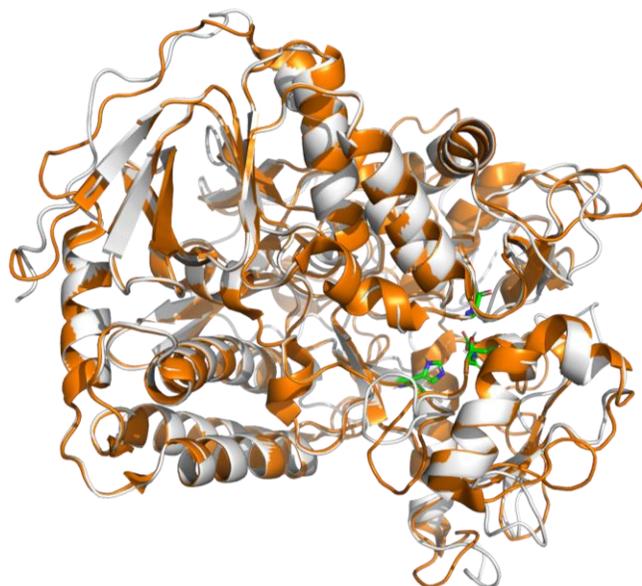


Figura 6. Modelo de homología creado (color blanco) alineado con un template PDB: 1ZOY_A (2.40 Å) (color naranja) para la subunidad A del complejo II.

La enzima modelada (**Figura 6, color naranja**) subunidad A, es una flavoproteína (Fp) hidrofílica que tiene unida covalentemente como cofactor una molécula de FAD, y contiene el sitio de unión del succinato. Contiene un pliegue tipo Rossmann con cuatro subdominios (Sun et al., 2005): un gran dominio de unión a FAD, un dominio de protección con una estructura $\beta\alpha\beta$, un dominio helicoidal que consta de una sola hélice y un haz de tres hélices, y un dominio C-terminal que consta principalmente de un bucle y dos hojas β . El dominio de unión a FAD se puede dividir en tres partes: un subdominio de barril β N-terminal, un subdominio flotante con dos hélices y siete hebras β pequeñas y un subdominio incrustado entre los dos dominios anteriores. El núcleo para la unión de FAD está compuesto por un cilindro β similar a una lámina β de diez hebras con tres hélices paralelas en un lado y un bucle similar a una hélice en el otro (**Figura 7**) (Sun et al., 2005).

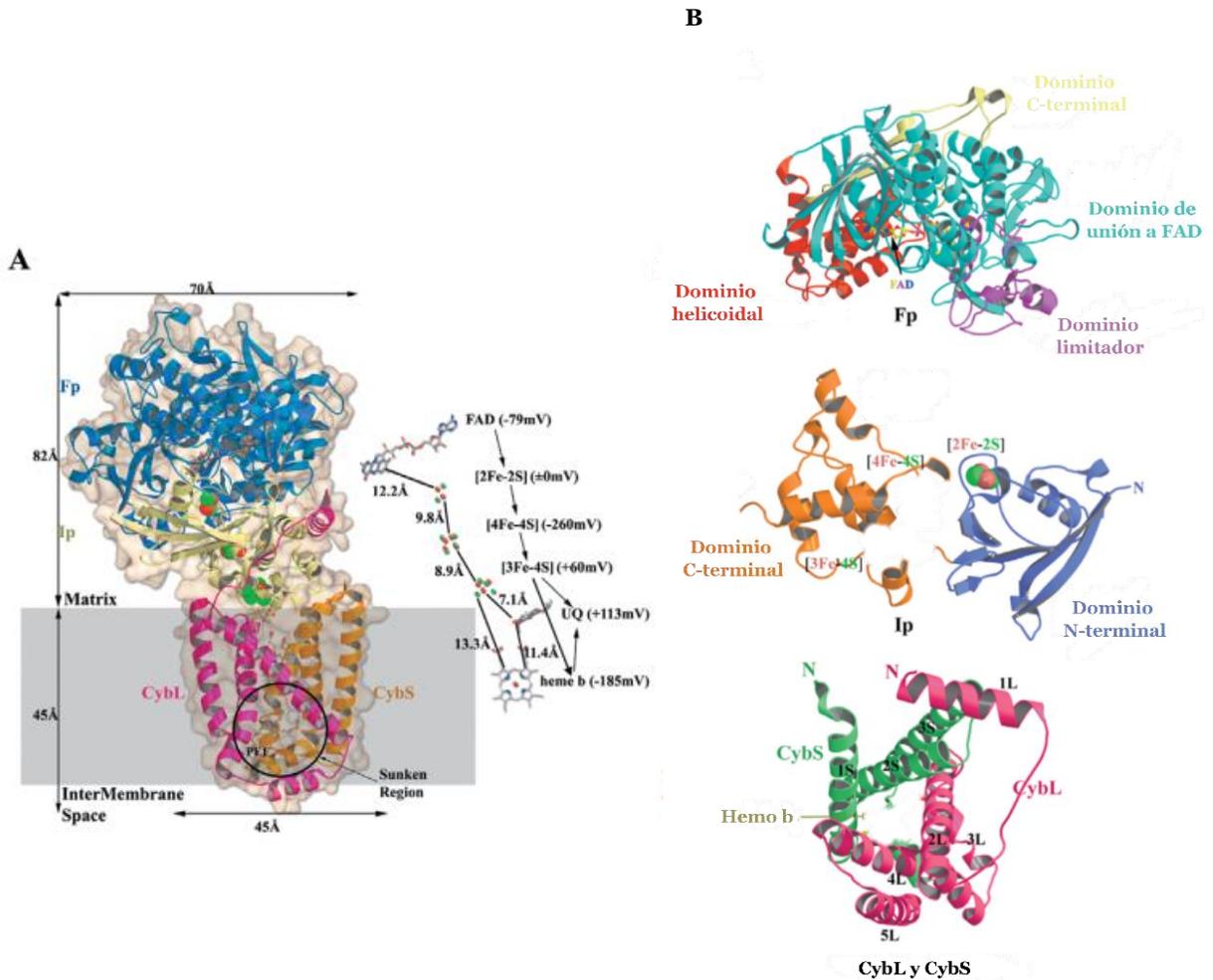


Figura 7. Estructura del complejo respiratorio mitocondrial II. (A) Estructura general del complejo respiratorio mitocondrial II, succinato: ubiquinona oxidorreductasa (SQR). El diagrama del complejo se superpone a la superficie molecular semitransparente. La proteína de unión a FAD (Fp) se muestra en azul; la proteína hierro-azufre (Ip) se muestra en crema; las proteínas transmembrana CybL y CybS se muestran en rosa y dorado, respectivamente. La supuesta región de la membrana está sombreada en gris. En el lado derecho, los grupos prostéticos que constituyen la vía de transferencia de electrones (FAD, [2Fe-2S], [4Fe-4S], [3Fe-4S] y hemo b se muestran junto con la ubiquinona (UQ), junto con sus distancias de borde a borde y potenciales redox de punto medio (Hagerhall, 1997). El flujo de transferencia de electrones en el sitio Qp se indica con flechas. (B) Descripción de las subunidades. Las subunidades de Fp, Ip y el anclaje de la membrana (CybL y

CybS) se muestran en una representación de dibujos animados, con sus respectivos grupos protésicos mostrados en representación de bola y palo o como esferas. A menos que se especifique lo contrario, los átomos de oxígeno están coloreados en rojo, el nitrógeno en azul, el azufre en verde, el fosfato en magenta y el hierro en oro en todas las figuras. (Tomado y adaptado de Sun et al, 2005).

2.1.1.1. Validación del modelo de homología del complejo II

El modelo creado se compone de 613 residuos de aminoácidos, con una desviación cuadrática media (RMSD) de 1,753 Å. El RMSD se calcula basándose únicamente en aquellos residuos que se han alineado con éxito y no representa una comparación general de las estructuras. En cuanto a la puntuación de alineación, que fue de 0,132, si el valor es superior a 0,7, revela que no hay suficiente similitud estructural para una alineación significativa, por lo que se considera en este caso un modelo representativo (Schrödinger Release, 2021). De acuerdo con la gráfica de Ramachandran del complejo II (**Figura 8**), se pudo observar que el modelo predicho tiene un 98,39% (597) de aminoácidos en la región permitida después del refinamiento del loops, lo que hace que la estructura sea confiable para el estudio requerido. Este modelo fue obtenido gracias a la exploración de estructuras plantilla de macromoléculas del programa Maestro (Schrödinger Inc.).

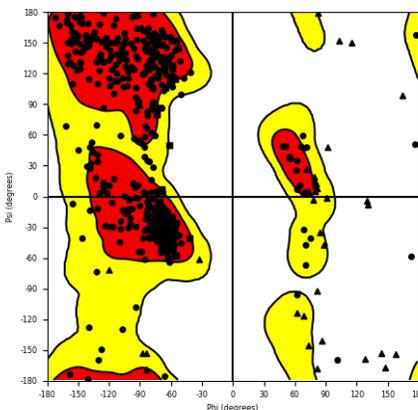


Figura 8. Gráfica de Ramachandran del modelo creado a partir del complejo II.

2.1.2. Complejo IV, subunidad IV

El modelo de homología para la subunidad IV del complejo IV (**Figura 9**) se diseñó comparando la secuencia Q16KF6 (Uniprot, 2019) con la estructura cristalina de código PDB: 1V54_D (1,80 Å), obteniendo una identidad de homología máxima del 41% y un score de 686,0, con los respectivos arreglos de refinamiento y minimización del sistema.



Figura 9. Modelo de homología creado (color cyan) alineado con un template PDB: 1V54_D (1,80 Å) (color naranja) para la subunidad IV del complejo IV.

La enzima modelada, subunidad IV (**Figura 9**), es la subunidad codificada nuclear más grande que juega un papel fundamental en la regulación del complejo IV. Se encuentra en la membrana mitocondrial interna en el lado de la matriz. Está conformada por dos isoformas, cada una con una hélice α , y posee una región N terminal que se encuentra dentro de la matriz mitocondrial en la parte superior y una C terminal ubicada

en el espacio intermembrana de la parte inferior (Mesquita et al., 2021). El modelo de homología presentado posee cuatro hélices α y cinco bucles.

2.1.2.1. Validación del modelo de homología del complejo IV

El modelo creado se compone de 136 residuos de aminoácidos, con una desviación cuadrática media (RMSD) de 2,743 Å. En cuanto a la puntuación de alineación, que fue de 0,302, se considera un modelo representativo, ya que su valor fue menor de 0,7 (Schrödinger Release, 2021).

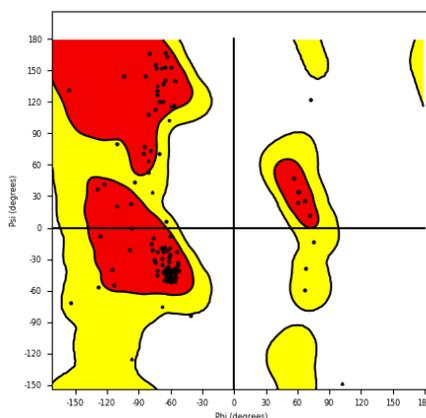


Figura 10. Gráfica de Ramachandran del modelo creado a partir del complejo IV.

De acuerdo con la gráfica de Ramachandran del complejo IV (**Figura 10**), se pudo observar que el modelo tiene un 97,79% (133) de aminoácidos en la región permitida después del refinamiento del loops, lo que hace que la estructura sea confiable para el estudio requerido. Este modelo fue obtenido gracias a la exploración de estructuras plantilla de macromoléculas del programa Maestro (Schrödinger Inc.).

2.1.3. Acetilcolinesterasa

Para la enzima acetilcolinesterasa, no se realizó modelo de homología porque ya existe una estructura cristalina caracterizada, que, si bien no es de la misma especie (*Drosophila melanogaster*), la secuencia es bastante similar a la de *Ae. Aegypti* (**Figura 12**). Por tal razón, la estructura cristalina seleccionada fue la de la enzima acetilcolinesterasa para la especie *Drosophila melanogaster* con código PDB: 1QON_1 (**Figura 11**).

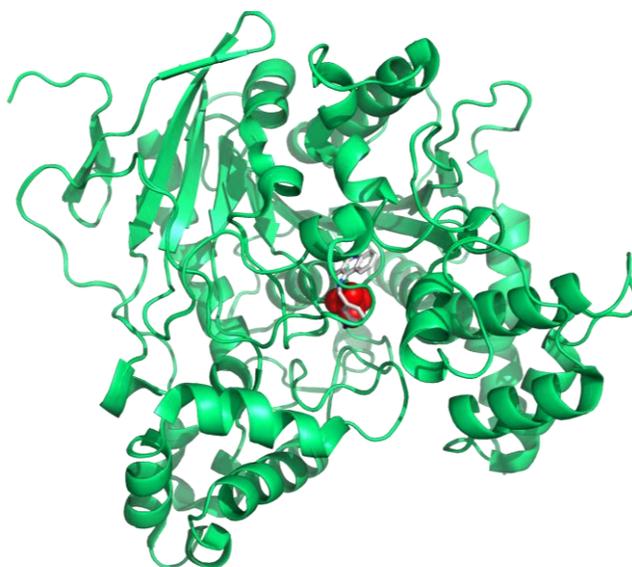


Figura 11. Estructura cristalina de la acetilcolinesterasa de la *Drosophila melanogaster* (color verde), con PDB: 1QON_1 y resolución de 2,72 Å. 9-(3-iodobencilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina (I40) (color blanco). SO₄ (color rojo).

Para comprobar la similitud entre estas dos secuencias, se realizó un alineamiento en los software gratuitos Cluster Omega y Sequence Manipulation Suite. El porcentaje de identidad obtenido fue del 62,63% y el porcentaje de similitud fue del 72,28% (**Figura 12**). Por lo tanto, la estructura cristalina de la especie *Drosophila melanogaster* es adecuada para realizar los estudios determinados en el proyecto de investigación.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

XP_021704817.1      MKMSAVVRLCCNMISLLLCITVISPVYGFDRLLVQVSSGPIRGRSTHVLGREVHVFNGV      60
1QON_1|Chain      -----VIDRLVVQVSSGPIRGRSVTVQGREVHVVYGTI      32
                   :*****:*****:*****:
                   :*****:*****:*****:

XP_021704817.1      PFAKPPVDGLRFKRPVPAEPWHGVLDATRLPSPCIQERYEYFPGFAGEEMWNPNTNVSED      120
1QON_1|Chain      PYAKPPVEDLRFKRPVPAEPWHGVLDATGLSATCVQERYEYFPGFSGEEIWNPNNTNVSED      92
                   *:****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
                   *:****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

XP_021704817.1      CLYLNIVVPTKTRLRHGRGLNFGNNDYFQDDDDF----QRQHQSCKGLAMLVWIYGGGF      175
1QON_1|Chain      CLYINWVAPAKARLRHGRGANGGHEHPNGKQADTDLIHNGNPNQITNGLPILWIYGGGF      152
                   **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                   **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

XP_021704817.1      MSGTSLDVVNAEMLAAGNVIVASMQYRVGSFGFFYLAPYLN---DDDAPGNVGLWDQA      232
1QON_1|Chain      MTGSATLDIYNADIMAAVGNVIVASFQYRVGAFGLHAPMPSEFAEEAPGNVGLWDQA      212
                   *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                   *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

XP_021704817.1      LAIRWLKENAKAFGGDPDLITLFGESAGGSSVSLHLLSPVTRGLSRRGILQSGTLNAPWS      292
1QON_1|Chain      LAIRWLDNAHAFGGNPEHMTLFGESAGSSVNAQLMSPVTRGLVLRGMQSGTMNAPWS      272
                   *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                   *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

XP_021704817.1      HMSAEKALSVAEALIDDCNCNVTLKDNPNYVMNCRMVDAKTISVQQWNSYSGILGFPS      352
1QON_1|Chain      HMTSEKAVEIGKALINDCNCNASMLKTNPAHVMSCMRSVDAKTISVQQWNSYSGILSFPS      332
                   **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                   **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

XP_021704817.1      APTIDGVFMTADPMTLREANLEGVEILVGSNDEGTYFLLYDFIDYFEKDAATSLPRDK      412
1QON_1|Chain      APTIDGAFLPADPMTLMKTADLKDYDILMGNVRDEGTYFLLYDFIDYFDKDDATALPRDK      392
                   *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                   *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

XP_021704817.1      FLEIMNTIFSASEPEREAIIFQYTWESGNDGYQNNQVGRSVGDHFFICPTNEFALGL      472
1QON_1|Chain      YLEIMNIFGKATQAEREAIIFQYTSWE-GNPGYQNNQVIGRAVGDHFFTCPTNEYAQL      451
                   :*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                   :*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

XP_021704817.1      AERGASVYYYYFTHRTSTSLWGEWMGVLHGDEVEYFQGPMNVSMQYRQREDLSRRMVL      532
1QON_1|Chain      AERGASVHYVYFTHRTSTSLWGEWMGVLHGDEIEYFQGPLNNSLQYRVERELGKRMLS      511
                   *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
                   *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

XP_021704817.1      SVSEFARSGNPALEGEHWPVYTKENPIYFIFNAEGEDDLRGEKYGRGPMTACAFHNDFL      592
1QON_1|Chain      AVIEFAKTGNPAQDGEWPNFSKEDPVYVYIFSTDD---KIEKLARGPLAARCSFWNDYL      567
                   :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                   :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

XP_021704817.1      PRLRAWVPPKSSCNILEQTSAAITLYVDIKIVTLVLMVILVRLY      637
1QON_1|Chain      PKVRSWAGTCDDGSGSAS-----      585
                   *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                   *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

Figura 12. Alineamiento realizado en el programa gratuito Clustal Omega entre las especies *Drosophila melanogaster* y *Aedes aegypti*. Un asterisco indica posiciones que tienen un único residuo completamente conservado; dos puntos indica conservación entre grupos de propiedades muy similares. Un punto indica conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

2.2. Resultados y discusión del docking molecular

Una vez terminado el proceso de los modelos de homología de las subunidades A y IV de los complejos II y IV, respectivamente, y la selección de la estructura cristalina correspondiente a la acetilcolinesterasa, se procedió a realizar el docking de precisión estándar (SP) y extra precisión (XP) a la base de datos, y con los valores obtenidos del docking score se tuvieron en cuenta ciertos parámetros para el análisis de esos resultados,

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

como las propiedades ADME, el intervalo de costos para moléculas insecticidas y las características de las moléculas. Luego, se realizó un proceso de selección donde se identificaron siete metabolitos que formaban interacciones moleculares a los residuos más importantes de los complejos y la enzima correspondiente. El análisis farmacocinético de estos compuestos mostró que son solubles o medianamente solubles en agua, con alta absorción gastrointestinal, y también pueden ser capaces de atravesar la barrera dérmica (Wan, 2013).

2.2.1. Resultados y discusión del docking molecular del Complejo II, subunidad A

Previo a realizar el análisis computacional de los metabolitos seleccionados, se hizo el análisis de interacción entre el flutolanil y el complejo II, inhibidor reportado de dicho complejo (Inaoka et al., 2015), con el fin de tener un compuesto de referencia que interactúe con la subunidad de interés (**Figura 13**). El compuesto mantiene interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos Glu 303, Arg 446, Thr 302, Gly 99 y His 290, aminoácidos correspondientes al sitio de unión de la quinona (Inaoka et al., 2015).

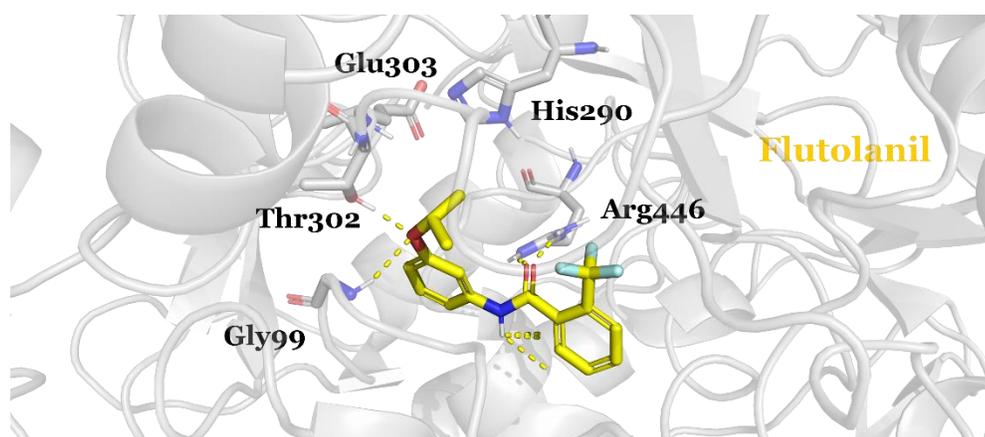


Figura 13. Visualización del flutolanil (amarillo), el complejo II, subunidad A, se encuentra de color gris. Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

(oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; flúor, cian). Las interacciones proteína-ligando de puente de hidrógeno están representadas por líneas discontinuas amarillas.

Ahora bien, después de realizar el docking SP de la base de datos de 226 metabolitos en donde a cada uno se le inspeccionaron 6 poses por ligando, se seleccionaron los 50 mejores metabolitos para realizar la siguiente fase de docking denominada extra-presición (XP por sus siglas en inglés), donde finalmente inspeccionaron 15 poses por ligando y se seleccionaron 10 metabolitos mediante inspección visual, por su docking score y su energía de afinidad (**Tabla 1**). Los estudios computacionales mencionados anteriormente, sugiere que los mejores metabolitos que interactúan con la proteína o complejo son metilendioxfenilnonatrienoilpirrolidina, cappariloside B, 1,8-cineol, eugenol, timol, quercetina, β -bisabolol, fentiión, verbenona y xantona.

Tabla 1. Valores de docking molecular, energía de afinidad y propiedades ADME para los 10 mejores compuestos con actividad insecticida reportada para el complejo II.

| Compuesto | MMGBSA dG Bind (kcal/mol) | Docking Score | mol MW | WPSA | Donor HB | Accept HB | logPo/w | logHERG | Caco-2 | MDCK | logKp | Absorción Oral Humana |
|-----------------------------------------|---------------------------|---------------|--------|--------|----------|-----------|---------|---------|---------|---------|-------|-----------------------|
| Metilendioxfenilnonatrienoilpirrolidina | -50,82 | -6,16 | 325,4 | 0,00 | 2 | 4,5 | 3,91 | -5,82 | 743,35 | 359,03 | -1,83 | 3,00 |
| Capparilosida B | -68,39 | -10,37 | 496,47 | 0,00 | 8 | 19,25 | -2,4 | -5,48 | 4,48 | 1,43 | -5,97 | 1,00 |
| 1,8 cineol | -26,34 | -4 | 156,26 | 0,00 | 0 | 2 | 2,88 | -3,99 | 3375,59 | 1842,62 | -1,75 | 3,00 |
| Eugenol | -44,7 | -6,57 | 164,2 | 0,00 | 1 | 1,5 | 2,66 | -3,95 | 3043,59 | 1647,53 | -1,61 | 3,00 |
| Timol | -28,01 | -4,97 | 150,22 | 0,00 | 1 | 0,75 | 3,29 | -3,58 | 3816,5 | 2104,08 | -1,78 | 3,00 |
| Quercetina | -40,93 | -7,57 | 302,24 | 0,00 | 1 | 5,25 | 0,36 | -5,11 | 18,19 | 6,51 | -5,54 | 2,00 |
| Beta-Bisabolol | -40,56 | -4,46 | 222,37 | 0,00 | 1 | 0,75 | 4,56 | -4,09 | 5888,68 | 3239,13 | -1,34 | 3,00 |
| Fention | -47,13 | -4,83 | 278,32 | 101,78 | 1 | 2 | 4,04 | -3,7 | 9906,04 | 10000 | -0,75 | 3,00 |
| Verbenona | -13,53 | -4,29 | 150,22 | 0,00 | 0 | 2 | 1,92 | -2,51 | 3152,65 | 1711,45 | -2,40 | 3,00 |
| Xantona | -49,19 | -4,1 | 196,2 | 0,00 | 0 | 2,5 | 2,72 | -4,75 | 3521,28 | 1928,71 | -1,14 | 3,00 |

Para el complejo II, subunidad A, los ligandos se acoplaron en una caja de rejilla de 20 Å. La cuadrícula del receptor se generó indicando las coordenadas de los residuos de aminoácidos del sitio activo, centrados en los residuos Thr 302, His 290, Glu 303, Gly 99. Como se muestra en la **tabla 1**, el acoplamiento molecular sugiere compuestos que podrían

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

inhibir el funcionamiento del complejo II, y a su vez el transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, después de un proceso de selección en donde se tuvieron en cuenta el mejor valor de docking score, la mayor energía de afinidad, la menor violación de los rangos QikProp y las reglas de Lipinski (**Tabla 1**), además de su disponibilidad y costo, los compuestos seleccionados para la evaluación mitocondrial fueron 1,8-cineol, eugenol, timol, quercetina y xantona.

La quercetina obtuvo una puntuación de acoplamiento molecular de -40,93 y una energía libre de unión de -7,57 kcal/mol, debido a la cantidad e interacciones presentadas con la subunidad analizada. Los resultados de acoplamiento molecular del compuesto quercetina sugieren interacciones fuertes de tipo puentes de hidrógeno con los residuos His 93, Gly 99, Gly 100, Thr 302, Glu 435 y Arg 446 (**Figura 14. A**); compartiendo dos interacciones con el compuesto de referencia, flutolanil, que se une al sitio de unión de la quinona a través de enlaces de hidrógeno con los residuos Thr 302, Hys 290, Glu303, Gly99; lo que lo convierte en un gran potencial inhibidor del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial. La quercetina es un flavonol antioxidante que pertenece al grupo de los flavonoides y generalmente se presenta como glucósido de quercetina, ejerce efectos biológicos clave sobre la progresión del ciclo celular y la regulación de la vía de transducción de señales celulares. Posee efectos antiinflamatorios y antioxidantes que son esenciales para su actividad como inhibidor oxidativo de cinasas y del ciclo celular, así como para la supervivencia neuronal, además, posee efectos inductores de la apoptosis, que son la clave de su potencial anticancerígeno (Bahare et al., 2020).

Por otro lado, el timol (puntuación de acoplamiento de -6,57 y energía libre de unión de -28,01 kcal/mol) también sugiere como posible inhibidor del complejo II (**Tabla 1**). El

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

compuesto se une a los residuos del sitio de unión de la quinona por medio de dos enlaces de hidrógeno con la Gly 99, sugerido por acoplamiento molecular (**Figura 14. B**). Del mismo modo, el acoplamiento sugiere dos enlaces de tipo puente de hidrógeno con los residuos Gly 100. El timol es un monoterpeno fenólicos que ha sido reconocidos como uno de los componentes bioactivo más potentes producidos por plantas superiores. La investigación sobre la toxicidad de estos monoterpenos fenólicos en varias plagas de insectos ha destacado su potencial como ovicidas, fumigantes y tóxicos de contacto, además, se puede encontrar en grandes cantidades en aceites esenciales de especies de *Thymus*, *Ocimum gratissimum L.* y *Trachyspermum ammi (L.) Sprague*. Se informó que este compuesto tiene una amplia actividad insecticida contra especies de artrópodos de importancia agrícola, médica y veterinaria (Youssefi et al. 2019).

Otro compuesto sugerido como inhibidor del complejo II fue el eugenol (puntuación de acoplamiento de -6,57 y energía libre de unión de -44,7 kcal/mol), el principal componente del aceite de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), se ha utilizado como material de partida y molécula de bloque de construcción para la fabricación de compuestos bioactivos, debido a su estructura particular y fácil disponibilidad, además de numerosas aplicaciones encontradas en la industria farmacéutica, industrias alimentaria, agrícola y cosmética; ha demostrado actividades antimicrobianas y antioxidantes, siendo también un potente insecticida, eficaz en una amplia variedad de plagas de artrópodos domésticos (Fernandes et al., 2020). El acoplamiento molecular obtenido sugiere dos enlaces de tipo puente de hidrógeno con el residuo Gly 99 (**Figura 14. C**), compartiendo interacción con el compuesto de referencia, flutolanil, además de tener otros dos enlaces de tipo puente de hidrógeno con

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

los residuos Gln 98 y Gly 100, lo que lo hace un posible inhibidor del complejo II, al generar una posible interacción con el sitio de unión de la quinona.

El 1,8-cineol (puntuación de acoplamiento de -4,00 y energía libre de unión de -26,34 kcal/mol) es un monoterpeno natural, también conocido como eucaliptol, compuesto principal de muchos aceites esenciales de plantas, principalmente extraído del aceite de *Eucalyptus globulus* (Juergens U. R, 2014). Los resultados de acoplamiento molecular del compuesto 1,8-cineol, sugieren una interacción fuerte de tipo puentes de hidrógeno con los residuos Gln 98, Gly 99 y Gly 100 (**Figura 14. D**), compartiendo una interacción con el compuesto de referencia, flutolanil, que se une al sitio de unión de la quinona a través de puentes de hidrógeno, el cual, también mantiene una fuerte interacción de tipo puente de hidrógeno con el residuo Gly 99 (Figura 14. D), lo que puede representar para el 1,8-cineol, una posible interacción con el sitio de unión de la quinona (Inaoka et al., 2015) y generando una posible inhibición del complejo II.

Finalmente, la xantona es un metabolito secundarios que se encuentran en algunas plantas superiores, hongos y líquenes. Se ha despertado un notable interés por sus propiedades farmacológicas debido a sus altos valores taxonómicos (Kamal et al., 2020). En este estudio, el ensayo de acoplamiento molecular, el metabolito mencionado presentó interacciones de tipo enlace de hidrógeno con los residuos Ser 451 y Leu 452, (**Figura 14. E**), con una energía libre de unión de -49,19 Kcal/mol y una puntuación de acoplamiento molecular de -4,10. Aunque no presentara relación con el sitio de unión de la quinona, representativo para ser un compuesto de posible inhibición del complejo II, fue seleccionado por el valor de los parámetros de energía libre y acoplamiento molecular, ya que representan una fuerte interacción con la subunidad a evaluar.

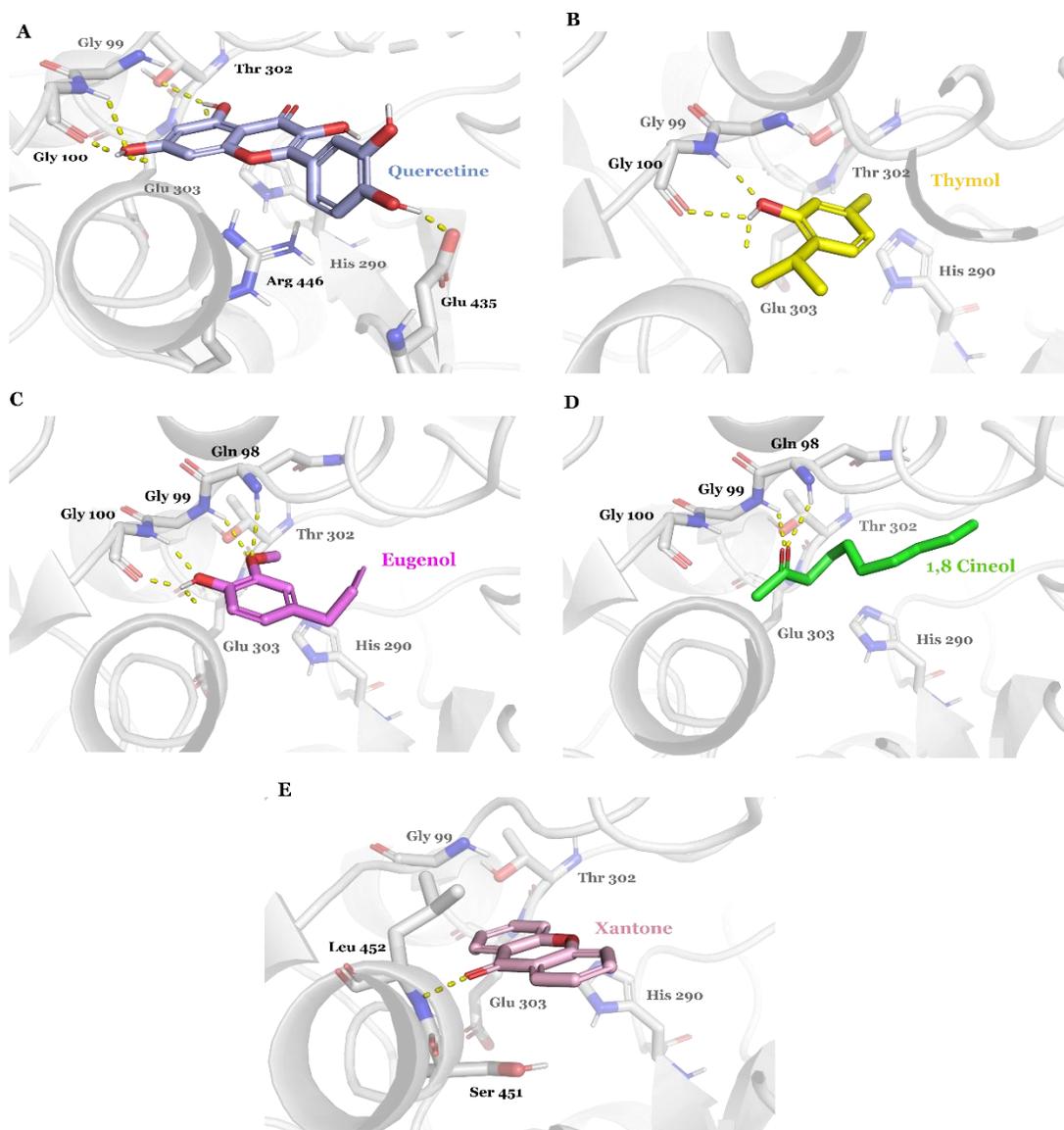


Figura 14. Visualización de interacción proteína-ligando en el complejo II (A) Quercetina (Azul claro) (B) Timol (amarillo) (C) Eugenol (morado) (D) 1,8 Cineol (verde claro) (E) Xantona (rosado claro). Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando de puente de hidrógeno están representadas por líneas discontinuas amarillas.

La mayoría de los metabolitos representados, mostraron interacciones con los residuos del sitio activo del complejo: Thr 302, His 290, Glu 303 y Gly 99, reportados en la literatura como los residuos con mayor importancia para el complejo II, su unidad A, debido a que es

el sitio de unión de la quinona, además, es donde se enlaza el compuesto de referencia (flutolanil) a través de enlaces de tipo puente de hidrogeno (Inaoka et al., 2015).

2.2.2. Resultados y discusión del docking molecular del Complejo IV, subunidad IV

Una vez evaluados los compuestos seleccionados para el complejo II mediante el cribado virtual, el siguiente paso fue realizar el mismo procedimiento para la siguiente proteína objetivo: el complejo IV. Para el complejo IV, el compuesto inhibitorio de referencia seleccionado fue el 6-hidroxi-dopamina reportado en la literatura (Yelena et al., 1995), (**Figura 15**). El compuesto interactúa con cuatro enlaces de tipo puente de hidrógeno con los residuos Glu 63 y Glu 86 de la proteína a evaluar. Además, este compuesto es responsable de la neurotoxicidad de este complejo a través de la inhibición de las enzimas de la cadena respiratoria (Yelena et al., 1995).

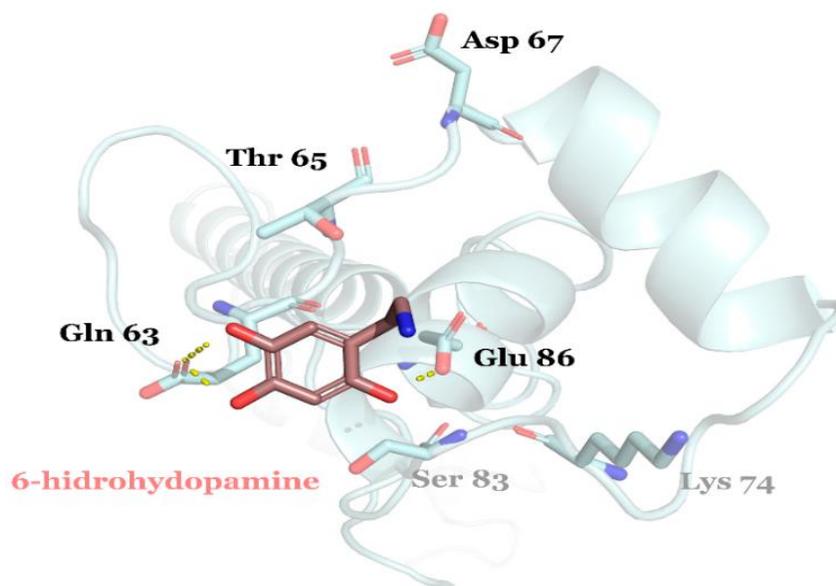


Figura 15. Visualización de interacción del ligando inhibitorio en el complejo IV donde la 6-hidroxi-dopamina (rosa oscuro), y el complejo IV, subunidad IV se encuentra en color cian claro. La molécula interactúa con puentes de hidrógeno con los residuos Glu

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

63 y Glu 86. Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando de puente de hidrógeno están representadas por líneas discontinuas amarillas.

Este compuesto fue evaluado en mitocondrias de cerebro de ratas tipo Sprague-Dawley, que, después de realizar los experimentos indicados por Yelena y colaboradores, se logró concluir que la 6-hidroxidopamina inhibió las actividades del complejo I y el complejo IV en preparaciones mitocondriales cerebrales con valores LC_{50} de $10,5 \pm 0,5$ y $34 \pm 2 \mu M$ respectivamente.

Se realizó el análisis del acoplamiento molecular SP de la base de datos de 226 metabolitos en donde a cada uno se le inspeccionaron 6 poses por ligando, luego se seleccionaron los 50 mejores metabolitos para realizar la siguiente fase de docking denominada extra-presición (XP por sus siglas en inglés), donde finalmente inspeccionaron 15 poses por ligando y se seleccionaron 5 metabolitos mediante inspección visual, por su docking score y su energía de afinidad. Los estudios computacionales mencionados anteriormente, sugieren que los mejores metabolitos que interactúan con la proteína o complejo son el caparilosido B, la emimicina, el guaiol y la quercetina (**Tabla 2**).

Sin embargo, después de un proceso de selección en donde se tuvieron en cuenta el mejor valor de docking score, la mayor energía de afinidad, la menor violación de los rangos QikProp y las reglas de Lipinski (**Tabla 2**), además de su disponibilidad y costo, el compuesto seleccionado para la evaluación mitocondrial fue la quercetina, con una puntuación de acoplamiento molecular de -2,48, que fue, sin duda, el único que cumplió con los parámetros requeridos para llevarlo al análisis *In vitro* e *In silico*.

Tabla 2. Valores de docking molecular, energía de afinidad y propiedades ADME para los 4 mejores compuestos con actividad insecticida reportada para el complejo IV.

| Compuesto | MMGBSA dG Bind (kcal/mol) | Docking Score | mol MW | WPSA | Donor HB | Acpt HB | logPo/w | logHERG | Caco-2 | MDCK | logKp | Absorción Oral Humana |
|--------------|---------------------------|---------------|--------|------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|-----------------------|
| Capariloso B | -39,72 | -3,73 | 496,47 | 0,00 | 8,00 | 19,25 | -2,41 | -5,48 | 4,49 | 1,43 | -5,98 | 1,00 |
| Emimicina | -13,21 | -4,20 | 112,09 | 0,00 | 1,00 | 3,50 | -0,38 | -2,99 | 445,05 | 206,22 | -3,67 | 2,00 |
| Guaiol | -40,98 | -3,42 | 222,37 | 0,00 | 1,00 | 0,75 | 4,12 | -3,21 | 4670,83 | 2617,50 | -1,96 | 3,00 |
| Quercetina | -17,55 | -2,49 | 302,24 | 0,00 | 1,00 | 5,25 | 0,36 | -5,12 | 18,20 | 6,51 | -5,54 | 2,00 |

La quercetina presenta cuatro interacciones de tipo puente de hidrógeno los residuos Glu 63, Lys 74 y Thr 65 de la subunidad seleccionada (**Figura 16**), siendo este último, uno de los residuos más importantes para la subunidad evaluada, ya que, según Mesquita y colaboradores, al realizar el alineamiento correspondiente (**Anexo 3**) a las especies *Mus musculus*, *Bos Taurus* y *Aedes aegypti*, se comprobó que los residuos Thr 65, Asp 67, Lis 61, Ser 83, corresponden a la especie a evaluar (*A. aegypti*), y son de gran importancia, al ser este espacio el sitio clave que previene el efecto inhibitor del ATP sobre el complejo IV, mediado por la proteína cinasa A (Mesquita et al., 2021).

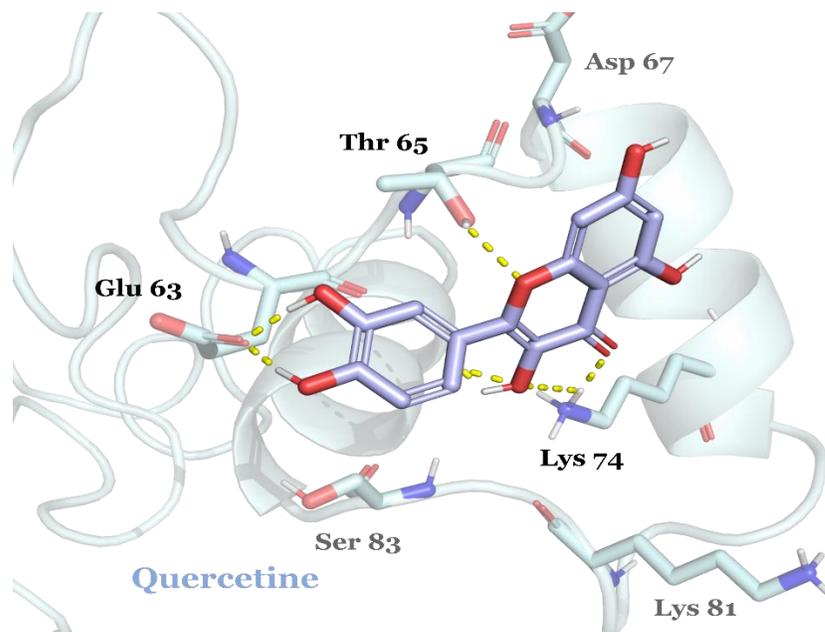


Figura 16. Visualización de interacción proteína-ligando en el complejo.

Quercetina (azul claro). Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (oxígeno, rojo; nitrógeno, azul), y el complejo IV, subunidad IV se encuentra en color cian claro. Las interacciones proteína-ligando de puente de hidrógeno están representadas por líneas discontinuas amarillas.

2.2.3. Resultados de docking de la Acetilcolinesterasa

Para la acetilcolinesterasa, se realizó el mismo análisis del acoplamiento molecular SP y XP a un total de 226 compuestos insecticidas naturales reportados previamente en la literatura (**Anexo 1**), tomando los 9 mejores como se muestra en la **Tabla 3**. Se realizó el análisis del acoplamiento molecular SP de la base de datos en donde a cada uno se le inspeccionaron 6 poses por ligando, luego se seleccionaron los 50 mejores metabolitos para realizar la siguiente fase de docking denominada extra-presición (XP por sus siglas en inglés), donde finalmente inspeccionaron 15 poses por ligando y se seleccionaron 9 metabolitos mediante inspección visual, por su docking score y su energía de afinidad. Los estudios computacionales mencionados anteriormente, sugieren que los mejores metabolitos que interactúan con la proteína o complejo son el 4-nerolidil catecol, el burchelin, el caparilosido A, el caparilosido B, el carvacrol, el eugenol, la formononetina, la sarniensina y la quercetina.

Tabla 3. Valores de docking molecular, energía de afinidad y propiedades ADME para los 9 mejores compuestos con actividad insecticida reportada para la acetilcolinesterasa.

| Compuesto | MMGBSA dG Bind (kcal/mol) | Docking Score | mol MW | WPSA | Donor HB | Accept HB | logPo/w | logHERG | Caco-2 | MDCK | logKp | Absorción Oral Humana |
|---------------------|---------------------------|---------------|--------|------|----------|-----------|---------|---------|----------|---------|-------|-----------------------|
| 4-nerolidil catecol | -50,97 | -11,59 | 314,47 | 0,00 | 2,00 | 2 | 4,93 | -4,07 | 1.303,08 | 658,60 | -1,86 | 3,00 |
| Burchelin | -69,89 | -9,91 | 340,38 | 0,00 | 0,00 | 5 | 3,30 | -3,94 | 3.592,75 | 1971,06 | -1,43 | 3,00 |
| Caparilosido A | -44,24 | -13,32 | 334,33 | 0,00 | 5,00 | 11 | -0,47 | -4,39 | 67,93 | 27,04 | -4,27 | 2,00 |
| Caparilosido B | -38,29 | -11,82 | 496,47 | 0,00 | 8,00 | 19 | -2,41 | -5,48 | 4.487,00 | 1,43 | -5,98 | 1,00 |
| Carvacrol | -25,33 | -7,83 | 150,22 | 0,00 | 1,00 | 0,75 | 3,30 | -3,61 | 3.687,62 | 2027,38 | -1,82 | 3,00 |
| Eugenol | -26,38 | -7,32 | 164,20 | 0,00 | 1,00 | 2 | 2,66 | -3,96 | 3.043,60 | 1647,53 | -1,62 | 3,00 |
| Formononetina | -36,04 | -8,41 | 268,27 | 0,00 | 1,00 | 4 | 2,63 | -5,22 | 1.242,04 | 625,32 | -1,88 | 3,00 |
| Sarniensina | -62,03 | -13,53 | 315,41 | 0,00 | 0,00 | 5 | 2,75 | -4,28 | 2.082,38 | 1209,36 | -3,19 | 3,00 |
| Quercetina | -38,80 | -10,19 | 302,24 | 0,00 | 1,00 | 5 | 0,36 | -5,12 | 18,20 | 6,51 | -5,54 | 2,00 |

El compuesto de referencia utilizado para la acetilcolinesterasa fue el 9-(3-iodobencilamino)-1,2,3,4-tetrahydroacridina (I40) (**Figura 17**), ya que, se une a los residuos aminoacídicos del sitio activo de la proteína, alrededor de la hélice α ubicada entre los residuos de aminoácidos Thr 369 y Asp 375 y comprendida en la hoja β ubicada entre los residuos Ile 82 y Trp 83. Además, es el ligando co-cristalizado de la acetilcolinesterasa y, es posible observar interacciones hidrofóbicas con la gran mayoría de residuos en Tyr 71, Trp 83, Tyr 370, Phe 371, Tyr 374 e His 480, cuyos resultados concuerdan con los estudios de Harel y Ramos (Harel et al.,2000; Ramos et al., 2020).

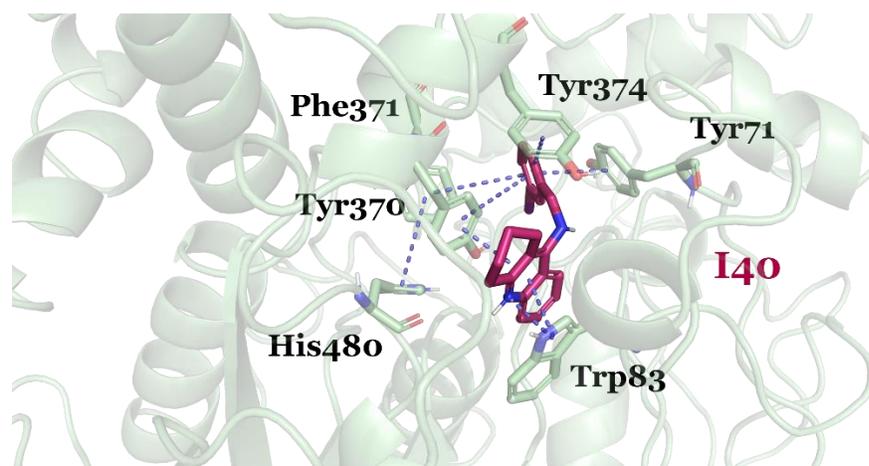


Figura 17. Visualización de interacción entre el ligando inhibidor en la acetilcolinesterasa donde el I40 (uva), se une con interacciones hidrofóbicas con los residuos Tyr 71, Trp 83, Tyr 370, Phe 371, Tyr 374 e His 380. Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (oxígeno, rojo; nitrógeno, azul), y la acetilcolinesterasa se encuentra en color verde claro. Las interacciones proteína-ligando de tipo hidrófobo están representadas por líneas discontinuas azules.

No obstante, después de un proceso de selección en donde se tuvieron en cuenta el mejor valor de docking score, la mayor energía de afinidad, la menor violación de los rangos QikProp y las reglas de Lipinski (**Tabla 3**), además de su disponibilidad y costo, los compuestos seleccionados para la evaluación mitocondrial fueron la quercetina, el eugenol y

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

el carvacrol, ya que siguieron los parámetros establecidos por el proyecto de investigación para la fase de selección.

Para el eugenol, con una energía libre de unión de -44,70 kcal/mol y una puntuación de acoplamiento molecular de -6,57 (**Figura 18. A**). El análisis de acoplamiento molecular mostró una interacción de tipo puente de hidrógeno con el residuo His 480, compartiendo un sitio de unión a la enzima con el metabolito de referencia, el I40.

La quercetina, con una energía libre de unión de -38,80 kcal/mol y una puntuación de acoplamiento molecular de -10,19, facilita las interacciones entre insectos y plantas, además, es responsable de la coloración de los pétalos de las flores de algunas plantas y, en consecuencia, atrae a los insectos (polinizadores) hacia las flores y el polen; puede funcionar como estimulante de la alimentación, estimulante de la oviposición o disuasivo de la alimentación, y, demuestra repelencia o actividad insecticida contra plagas de herbívoros, por ejemplo, áfidos (Xia et al., 2021). Según el acoplamiento molecular realizado, se pudo evidenciar interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos Trp 83, Asp 375, Tyr 370 (**Figura 18. B**), aminoácidos correspondientes al sitio activo de la proteína a evaluar, donde se une el compuesto de referencia: el I40, lo que lo convierte en un potencial inhibidor de la acetilcolinesterasa.

Finalmente, el carvacrol (**Figura 18. C**) es un fenol monoterpénico que se encuentra en muchos aceites esenciales de la familia *Lamiaceae*, incluidos *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus* y *Coridothymus*; es isómero del componente timol y tienen una amplia actividad insecticida contra especies de artrópodos de importancia agrícola, médica y veterinaria (Youssefi et al., 2019). Según el análisis molecular, presentó interacciones de tipo enlace de hidrógeno con el residuo His 480, (Fig 17. D), compartiendo un sitio de unión a la

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

enzima con el metabolito de referencia, el I40, que, según la literatura, es un compuesto capaz de disminuir la actividad de la enzima, por lo que lo hace un potencial inhibidor de la acetilcolinesterasa, además, el carvacrol ocupa un subsitio formado por los residuos Ser 238, His 480 y Glu 327, reportado como lugar de acilación de la acetilcolinesterasa y su hidrólisis (Cruz et al., 2017). Los resultados obtenidos anteriormente de los metabolitos seleccionados concuerdan con el lugar informado por Harel et al., 2020 (Harel et al., 2000) como un sitio activo de AChE, y algunos inhibidores de AChE informados, como I40 y Δ^3 -careno, que se encuentran en este sitio activo y generan interacciones proteína-ligando con la tríada catalítica Trp 83, Phe 329 y Tyr 333 (Karimi et al., 2021; Ramos et al., 2020).

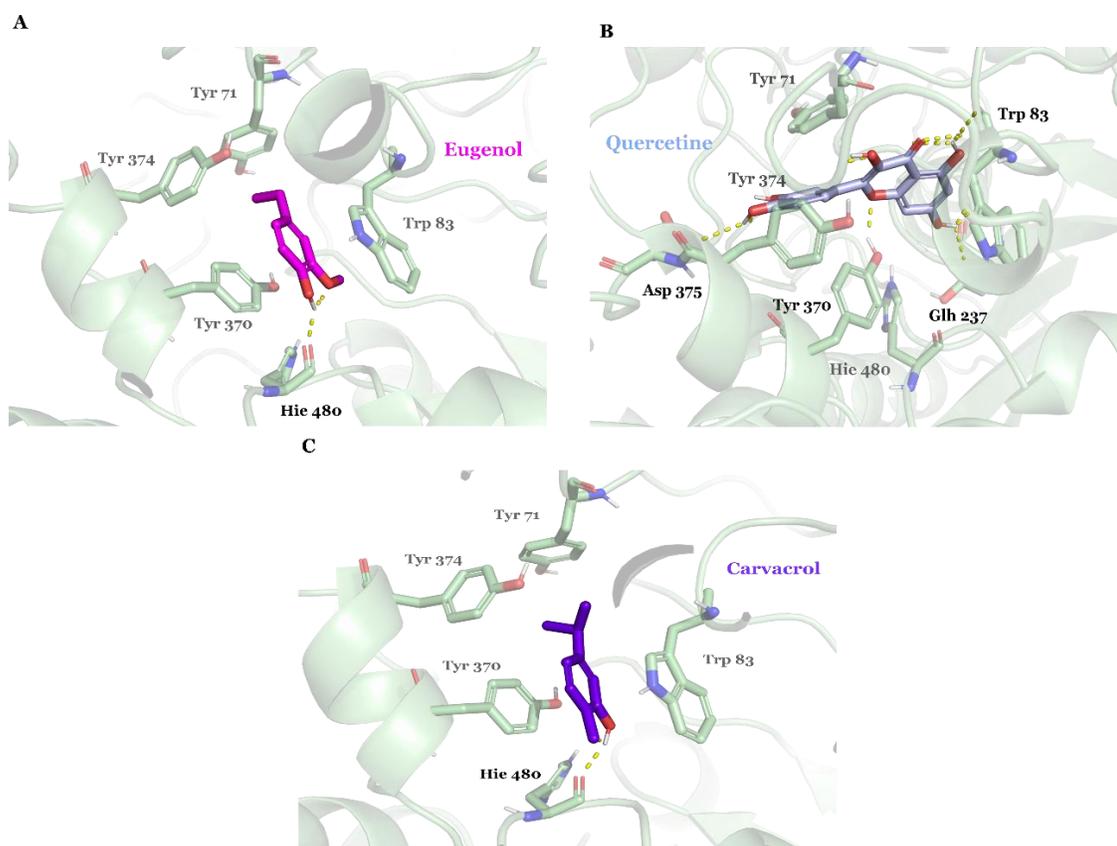


Figura 18. Visualización de interacción proteína-ligando en la acetilcolinesterasa (A) Eugenol (fucsia) (B) Quercetina (azul claro) (C) Carvacrol (morado). Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (oxígeno, rojo;

nitrógeno, azul), y, la acetilcolinesterasa se encuentra en color verde claro. Las interacciones proteína-ligando de puente de hidrógeno están representadas por líneas discontinuas amarillas.

2.3.Resultados de la actividad larvicida

Según los resultados de docking molecular, se seleccionaron los compuestos 1,8-cineol, eugenol, timol, carvacrol y xantona, gracias a las interacciones con las subunidades A y IV de los complejos II y IV respectivamente, además de la acetilcolinesterasa, ya que todos poseían enlaces de tipo puente de hidrógeno con los residuos aminoacídicos más importantes de cada proteína; así mismo, también los enlaces de tipo hidrofóbico, π -catión y π - π , fueron importantes para deducir que los metabolitos seleccionados serían posibles inhibidores del transporte de electrones en los complejos II, IV y la acetilcolinesterasa. Por ello, la actividad larvicida se evaluó en base a los valores de CL₅₀ y CL₉₅ a las 24 y 48 h de exposición en larvas de mosquitos de *Aedes aegypti*, que corresponden a las concentraciones letales que causan el 50% y 95% de mortalidad de los individuos expuestos al tratamiento. Inicialmente se evaluaron concentraciones diagnosticas de 30, 90 y 190 ppm, para poder determinar el rango de mortalidad más probable del metabolito y definir cuáles de ellos fueron los más aptos para generar actividad larvicida.

Después de ello, se seleccionaron unas concentraciones denominadas múltiples, teniendo en cuenta el intervalo visualizado, donde se percibió una mortalidad entre el 2 y el 98% para cada compuesto. Los análisis estadísticos se ajustaron al modelo probit, χ^2 chi cuadrado. Para realizar la selección de los metabolitos para la siguiente fase (fase *In vitro*), se tuvo en cuenta que, cuando las concentraciones CL₅₀ de un metabolito, son superiores a 100 ppm, se considera un compuesto inactivo con respecto al individuo (Dias & Moraes, 2014).

2.3.1. 1,8-cineol

Como se observa en la **figura 19**, el 1,8-cineol generó una mortalidad del 3,3%, 7,5% y 15,8% a las 24 horas, y del 4,2%, 15,0% y 25,8% a las 48 horas, en las concentraciones de 30, 90 y 190 ppm, respectivamente, siendo las concentraciones de 190 ppm a las 24 y 48 horas, estadísticamente significativas respecto al control. No obstante, dado que la mortalidad presentada no fue mayor que el 50% a la mayor concentración evaluada, se decidió no continuar evaluando el mecanismo de acción de este compuesto.

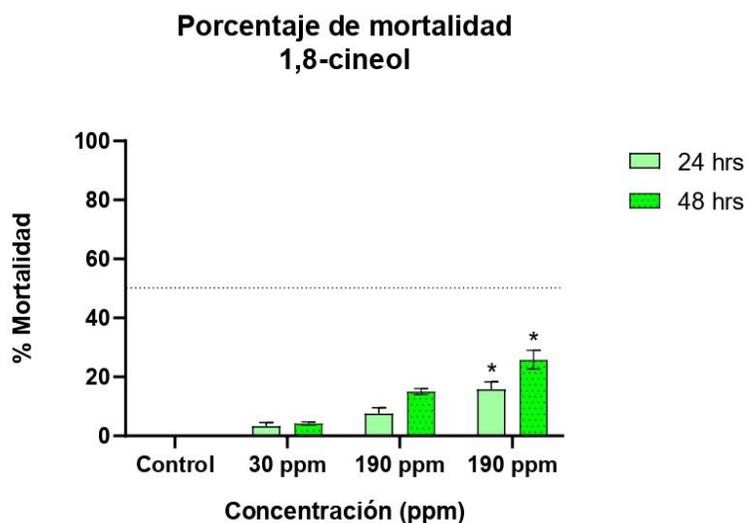


Figura 19. Porcentaje de mortalidad de 1,8-cineol sobre larvas de *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado.

*Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p \leq 0,05$).

2.3.2. Quercetina

El anterior procedimiento de evaluar concentraciones a 30, 90 y 190 ppm se realizó con los demás metabolitos seleccionados, y se seleccionó el intervalo de mortalidad para cada compuesto, para así, seleccionar las concentraciones múltiples para el metabolito en cuestión.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Después de realizar las concentraciones diagnósticas y múltiples para el metabolito quercetina, se ejecutó el análisis probit, en donde se pudo observar un efecto dosis dependiente, evidenciándose diferencias estadísticamente significativas respecto al control, a partir de la concentración de 130 ppm para 24 y 48 h de tratamiento. De allí, se pudo determinar el CL₅₀ para las 24 y 48 h, siendo valores de concentración de 147,4 ppm y de 102,7 ppm respectivamente (**Tabla 4**).

Teniendo en cuenta los resultados (**Figura 20**), la quercetina no fue seleccionada para continuar los estudios en la fase *In vitro*, y no se consideró como un metabolito activo en la actividad larvicida, ya que su CL₅₀ para las 24 y 48 h fue superior a 100 ppm, violando el parámetro de selección de los metabolitos para la siguiente fase (fase *In vitro*), que menciona que cuando las concentraciones CL₅₀ de un metabolito, son superiores a 100 ppm, se considera un compuesto inactivo con respecto al individuo (Dias & Moraes, 2014).

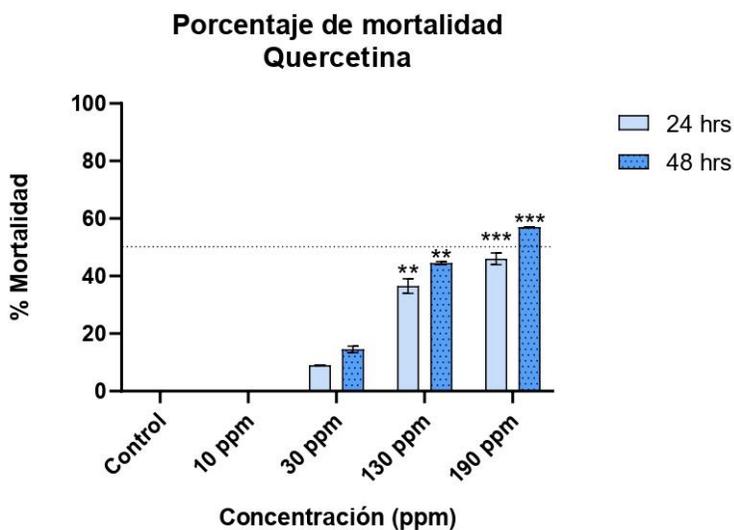


Figura 20. Porcentaje de mortalidad de la quercetina sobre larvas de *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos independientes por

triplicado. *Diferencias estadísticamente significativa respecto al control: ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

Tabla 4. Concentraciones letales de quercetina sobre *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza.

| Concentración Letal | | | | | |
|---------------------|------------------|------------|------------------|------------------|------------|
| 24h | | | 48 h | | |
| CL ₅₀ | CL ₉₅ | χ^2^* | CL ₅₀ | CL ₉₅ | χ^2^* |
| 147,4 | 668,1 | 3,0 | 102,7 | 431,8 | 6,3 |
| [113,4 - 100,5] | [402,7 - 338,9] | | [71,6 - 58,0] | [252,1 - 210,6] | |

*La distribución chi cuadrado para evaluar la probabilidad de una discrepancia igual o mayor que la que exista entre los datos y las frecuencias esperadas según la hipótesis nula. La exactitud de dicha evaluación dependerá de que los valores esperados no sean muy pequeños, y en menor medida de que el contraste entre ellos no sea muy elevado (Mitjana, 2019).

2.3.3. Carvacrol

Los resultados de la actividad larvicida de carvacrol sobre larvas *Ae. aegypti* se describen en porcentajes de mortalidad, evaluado en tiempos de 24 horas y 48 horas de exposición a concentraciones de 24 ppm, 32 ppm, 43 ppm y 51 ppm (**Figura 21**).

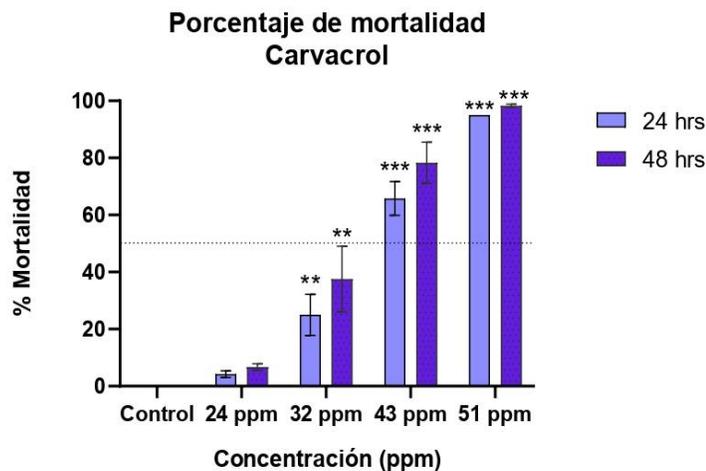


Figura 21. Porcentaje de mortalidad del carvacrol sobre larvas de *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado.

*Diferencias estadísticamente significativa respecto al control: ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

Los resultados obtenidos (**Tabla 5**) mostraron una distribución normal donde existen diferencias significativas entre el tratamiento de carvacrol y el control, esto se observó por medio de una prueba Kruskal-Wallis, donde el metabolito presenta mortalidad desde 4,2% (concentración de 24 ppm) a las 24 horas, hasta una mortalidad del 98,3% (concentración de 51 ppm) a las 48 horas.

Se obtuvo una mortalidad estadísticamente significativa con el metabolito respecto al control, ya que las concentraciones de CL_{50} a las 24 horas y 48 horas son de 37,4 ppm y de 34,5 ppm, respectivamente (**Tabla 5**). Dado que la probabilidad observada por medio de probit y chi cuadrado es mayor a 5, se acepta la hipótesis nula, esto significa que los datos observados se ajustan a la distribución teórica.

Tabla 5. Concentraciones letales de Carvacrol sobre *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza.

| Concentración Letal | | | | | |
|---------------------|------------------|------------|------------------|------------------|------------|
| 24h | | | 48 h | | |
| CL ₅₀ | CL ₉₅ | χ^2 * | CL ₅₀ | CL ₉₅ | χ^2 * |
| 37,4 | 55,1 | 5,9 | 34,5 | 50,5 | 4,3 |
| [34,1-40,9] | [48,6-88,5] | | [31,8-37,2] | [45,4- 60,2] | |

*La distribución chi cuadrado para evaluar la probabilidad de una discrepancia igual o mayor que la que exista entre los datos y las frecuencias esperadas según la hipótesis nula. La exactitud de dicha evaluación dependerá de que los valores esperados no sean muy pequeños, y en menor medida de que el contraste entre ellos no sea muy elevado (Mitjana, 2019).

Teniendo en cuenta los datos anteriormente descritos, el carvacrol se consideró un metabolito con actividad larvicida en *Ae. aegypti*, ya que los valores de CL₅₀ tanto para las 24 como las 48 horas, son menores de 100 ppm, favoreciendo el hallazgo de un posible insecticida para la especie evaluada.

2.3.4. Timol

Los resultados de la actividad larvicida de timol sobre individuos *Ae. aegypti* se describen en porcentajes de mortalidad, evaluado en tiempos de 24 horas y 48 horas de exposición a concentraciones de 18 ppm, 33 ppm, 45 ppm y 60 ppm (**Figura 22**).

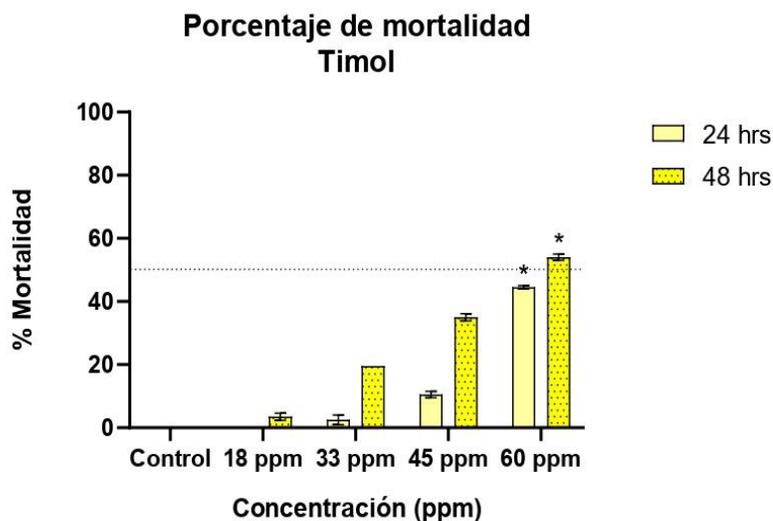


Figura 22. Porcentaje de mortalidad del timol sobre larvas de *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado. *Diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0,05$).

Los datos mostraron una distribución normal donde existen diferencias significativas entre el tratamiento de timol y el control, esto se observó por medio de una prueba Kruskal-Wallis, donde el metabolito presenta mortalidad desde 6,8% (concentración de 18 ppm) a las 24 horas, hasta una mortalidad del 54,0% (concentración de 60 ppm) a las 48 horas.

La mortalidad del metabolito fue estadísticamente significativa con respecto al control desde la concentración de 60 ppm, ya que las CL_{50} a las 24 horas y 48 horas son de 63,3 ppm y de 56,7 ppm, respectivamente (**Tabla 6**).

Tabla 6. Concentraciones letales de timol sobre *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza.

| Concentración Letal | |
|----------------------------|-------------|
| 24h | 48 h |
| | |

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

| CL ₅₀ | CL ₉₅ | χ^2 * | CL ₅₀ | CL ₉₅ | χ^2 * |
|------------------|------------------|------------|------------------|------------------|------------|
| 63,3 | 104,3 | 2,4 | 56,7 | 159,8 | 0,1 |
| [58,5 – 71,9] | [86,8 – 148,7] | | [53,2 – 61,3] | [133,3 - 203,8] | |

*La distribución chi cuadrado para evaluar la probabilidad de una discrepancia igual o mayor que la que exista entre los datos y las frecuencias esperadas según la hipótesis nula. La exactitud de dicha evaluación dependerá de que los valores esperados no sean muy pequeños, y en menor medida de que el contraste entre ellos no sea muy elevado (Mitjana, 2019).

Teniendo en cuenta los datos anteriores, el timol se considera activo en *Ae. aegypti*, ya que los valores obtenidos para la CL₅₀ son menores de 100 ppm, favoreciendo el hallazgo de un posible insecticida para la especie evaluada.

2.3.5. Xantona

Los resultados de la actividad larvica de xantona sobre individuos *Ae. aegypti* se describen en porcentajes de mortalidad, evaluado en tiempos de 24 horas y 48 horas de exposición a concentraciones de 1 ppm, 1,5 ppm, 2,5 ppm y 4,5 ppm (**Figura 23**).

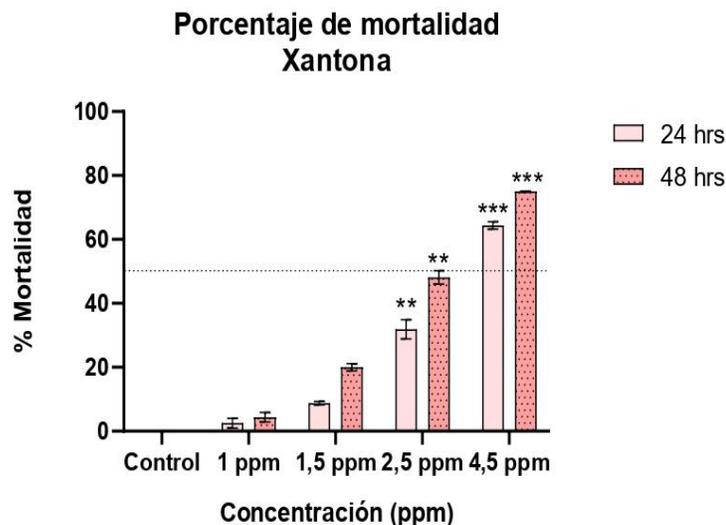


Figura 23. Porcentaje de mortalidad de la xantona sobre larvas de *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado.
*Diferencias estadísticamente significativa respecto al control: ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$).

Los datos mostraron una distribución normal donde existen diferencias significativas entre el tratamiento de xantona y el control, esto se observó por medio de una prueba Kruskal-Wallis, donde el metabolito presenta mortalidad desde 4,1% (concentración de 1 ppm) a las 24 horas, hasta una mortalidad del 75,0% (concentración de 4,5 ppm) a las 48 horas.

La mortalidad del metabolito fue estadísticamente significativa respecto al control desde la concentración de 2,5 ppm, ya que las CL_{50} a las 24 horas y 48 horas son de 3,5 ppm y de 2,7 ppm, respectivamente (**Tabla 7**). Dado que la probabilidad observada por medio de probit y chi cuadrado es mayor que 5, se acepta la hipótesis nula, esto significa que los datos observados se ajustan a la distribución teórica.

Tabla 7. Concentraciones letales de quercetina sobre *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza.

| Concentración Letal | | | | | |
|---------------------|------------------|------------|------------------|------------------|------------|
| 24h | | | 48 h | | |
| CL ₅₀ | CL ₉₅ | χ^2 * | CL ₅₀ | CL ₉₅ | χ^2 * |
| 3,5 | 7,9 | 0,4 | 2,7 | 6,4 | 0,1 |
| [3,3 -3,2] | [6,9 – 6,7] | | [2,4 – 2,3] | [5,0 – 4,6] | |

*La distribución chi cuadrado para evaluar la probabilidad de una discrepancia igual o mayor que la que exista entre los datos y las frecuencias esperadas según la hipótesis nula. La exactitud de dicha evaluación dependerá de que los valores esperados no sean muy pequeños, y en menor medida de que el contraste entre ellos no sea muy elevado (Mitjana, 2019).

Teniendo en cuenta los datos anteriores, la xantona se considera activo en *Ae. aegypti*, ya que los valores de CL₅₀ en las 24 y 48 son menores de 100 ppm. Incluso presentan un valor bastante bajo de actividad larvicida (3,5 ppm para las 24 h y 2,7 ppm para las 48 h), por lo que se considera un excelente compuesto para un posible insecticida de la especie a evaluar, además, permite disminuir el costo de producción del insecticida.

3. Conclusiones del capítulo 1

Los modelos de homología creados para el complejo II y IV, con base a las plantillas de mamíferos, fueron efectivos según su porcentaje de identidad que fue del 88% y 41%, respectivamente, por lo que se concluye que la estructura proteica de los complejos mitocondriales II y IV de diferentes especies presenta similitudes que pueden ser comparables.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que los análisis *In silico* fueron acertados en sugerir que los compuestos 1,8-cineol, eugenol, timol, quercetina, y carvacrol presentan afinidad con las subunidades del complejo II (subunidad A), IV (subunidad IV) y la acetilcolinesterasa.

Basado en los resultados de docking molecular, se pudo identificar tres compuestos con actividad insecticida: carvacrol, timol y xantona, siendo buenas alternativas como larvicidas, debido a su bajo CL₅₀, lo que denota que estas técnicas son excelentes filtros para estudios posteriores.

CAPÍTULO 2. Actividad enzimática de metabolitos de plantas que afectan los complejos mitocondriales II, IV y la acetilcolinesterasa de mosquitos *Aedes aegypti*

Una vez determinada la actividad larvicida de los compuestos carvacrol, timol y xantona, se corroboró si efectivamente el efecto tóxico estaba relacionado con la inhibición directa de los complejos II, IV y la acetilcolinesterasa. Es por ello por lo que en el siguiente capítulo se evaluó el posible mecanismo de acción en la mitocondria y la acetilcolinesterasa, con el fin de poder correlacionar la actividad insecticida con una posible inhibición de la actividad de las enzimas mencionadas. Los resultados presentados en este capítulo responden al siguiente objetivo:

Evaluar la actividad enzimática de los metabolitos con mejor actividad larvicida sobre la bioenergética mitocondrial y sobre la actividad de la acetilcolinesterasa de larvas de *Aedes aegypti*.

1. Metodología Fase *In vitro*

En esta fase, se realizó la evaluación de la actividad enzimática con el fin de estudiar el efecto de los metabolitos seleccionados en la fase *In vivo* (timol, xantona y carvacrol), en la bioenergética mitocondrial, y dar cumplimiento al tercer objetivo del proyecto de investigación según el esquema presentado en la **figura 24**.

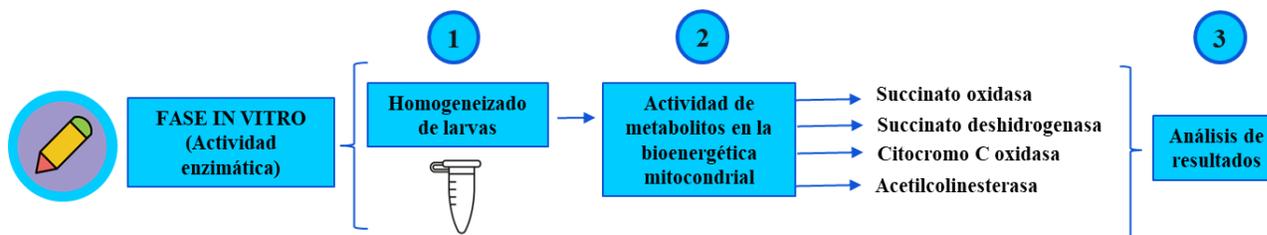


Figura 24. Esquema metodológico experimental de la fase *In vitro* del proyecto de investigación.

1.1.Determinación de la actividad enzimática mitocondrial

Con el objetivo de correlacionar el efecto larvicida de los metabolitos vegetales secundarios seleccionados con su efecto sobre el transporte de electrones a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, se evaluó polarográficamente la actividad de la succinato oxidasa utilizando un oxímetro de alta resolución (Oxygraph-2k OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria) (Firmante, 1974), y las enzimas succinato deshidrogenasa, citocromo C oxidasa y acetilcolinesterasa se determinaron usando espectrofotómetro, Multiscan GO (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) manipulando el programa SkanIt.

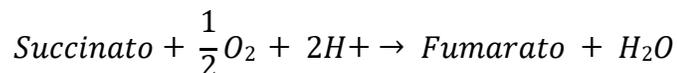
1.1.1. Homogeneizado y cuantificación del extracto de larvas de *Aedes aegypti*

Se separaron alrededor de 50-100 larvas por ensayo, se filtraron y lavaron con agua Tipo I para retirar cualquier residuo presente de comida y se dispusieron en 500 μ L de un medio de aislamiento compuesto de sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, a un pH 7,2, EGTA 1 mM y BSA 0,1%. Luego se realizó una homogenización en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, La suspensión obtenida, se filtró utilizando fibra de vidrio en una jeringa de 25 mL. Finalmente se realizó la cuantificación de proteínas de larva total, mediante el método de Bradford (Bradford & Marion, 1976). Después de realizar este procedimiento, el homogeneizado de larvas se usó para analizar las respectivas enzimas.

1.1.2. Succinato oxidasa

La actividad de esta se enzima evaluó haciendo seguimiento de la velocidad de consumo de oxígeno dada por la oxidación de succinato a fumarato, mediante el método Singer (Singer, 1974). El sistema de reacción está compuesto por un buffer fosfato 80 mM

(pH 7,4), succinato 10 mM y 0,1 mg/mL de proteína homogeneizada, como se observa en la **ecuación 4**.



Ecuación 4. Esquema de reacción de succinato oxidasa.

1.1.3. Succinato deshidrogenasa

La actividad de la enzima se evaluó por medio del método de Singer (Singer, 1974) utilizando 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP) y fenazina metosulfato (PMS) como receptores artificiales de electrones, haciendo seguimiento de la velocidad de reducción del DCPIP a 600 nm en un sistema de reacción compuesto por: buffer fosfato 50 mM (pH 7,4), succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM, KCN 1 mM, rotenona 1 μ M, PMS 1 mM y 0,1 mg/mL de proteína homogeneizada, a una temperatura controlada, teniendo en cuenta como coeficiente de extinción molar del DCPIP 16,983 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 600 nm, mecanismo expresado en la **ecuación 5**.

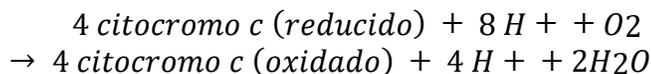


Ecuación 5. Esquema de reacción de succinato deshidrogenasa.

1.1.4. Citocromo C oxidasa

La actividad de la citocromo c oxidasa se determinó por el método de Mason (Mason, 1973) siguiendo la velocidad de oxidación del citocromo C a 550 nm, en un sistema de reacción que se compone de un buffer fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, citocromo C reducido 30 μ M y 0,1 mg/mL de proteína homogeneizada, determinando la concentración

del citocromo c oxidado por medio de su coeficiente de extinción molar redox (ϵ_{redox}) 19,8 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 550 nm, mecanismo observado en la **ecuación 6**.



Ecuación 6. Esquema de reacción de citocromo c oxidasa.

1.2. Inhibición de la acetilcolinesterasa

1.2.1. Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa a partir del extracto de larvas

Para determinar el efecto de los metabolitos sobre la actividad de la acetilcolinesterasa, se empleó el método de Ellman (Ellman et al., 1961). Este método se basa en la velocidad de formación de la tiocolina generada por la hidrólisis de la acetiltiocolina, para luego reaccionar con el ion 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB). La actividad de la enzima es medida espectrofotométricamente monitoreando la formación del ion acido 2-nitro, 5-mercapto-benzoico (TNB-), confirmando el progreso de la reacción con una coloración amarilla (**Figura 25**).

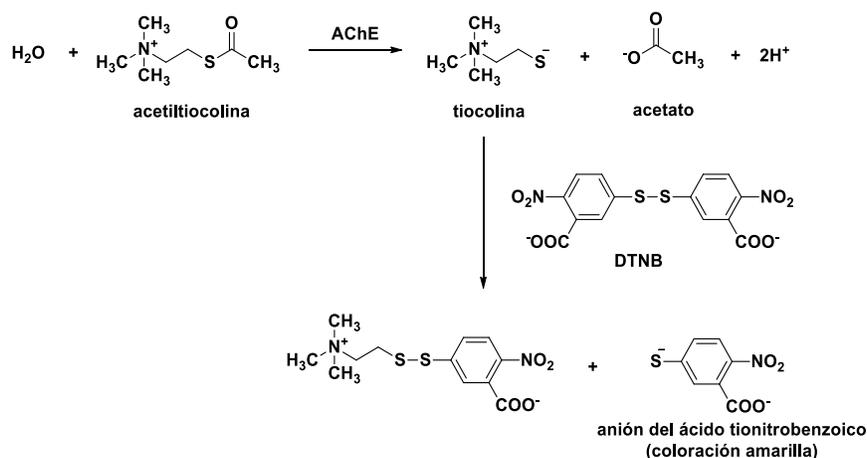


Figura 25. Reacción de Ellman, (Ellman et al., 1961).

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

El medio de reacción se dispuso de una solución buffer PBS (Na_2HPO_4 8mM, NaH_2PO_4 2,3 mM, NaCl 0,15 M, $\text{pH} = 7,5$) y una suspensión de homogeneizado de alrededor de 300 larvas como fuente enzimática a 0,1 mg/mL de concentración aproximadamente, usando un medio con sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, y EGTA 1 mM a un pH 7,2. La reacción fue incubada por diez minutos y posteriormente iniciada por la adición de 100 μL de sustrato (DTNB 0,2 mM, yoduro de acetiltiocolina 0,24 mM y NaH_2PO_4 54,4 mM). El volumen final de cada pozo fue de 200 μL . Finalmente se monitoreó la reacción una hora a 405 nm. La enzima y el sustrato se prepararon el mismo día, máximo cuatro horas antes del ensayo. Este ensayo se desarrolló en microplacas de 96 pozos. Para realizar los cálculos de la actividad enzimática se tuvo en cuenta el coeficiente de extinción molar del DTNB 12,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 405 nm.

1.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos se representaron por la media \pm desviación estándar (SD) de tres ensayos independientes cada uno por triplicado, y se analizaron estadísticamente usando el software GraphPad Prism 8 mediante un análisis de varianza (ANOVA) en una vía, seguido por la prueba de Tukey y Kruskal-Wallis, para la comparación de las medias. Los resultados con un valor $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos respecto al control.

2. Resultados y discusión del capítulo

2.1. Efecto de los metabolitos sobre la actividad de las enzimas mitocondriales y la acetilcolinesterasa

Debido a la mortalidad presentada por el efecto larvicida en los metabolitos seleccionados (carvacrol, timol y xantona, con CL_{50} de 37,4 ppm, 63,3 ppm y 3,5 ppm respectivamente), se decidió determinar si ese efecto en la mortalidad era debido una alteración en el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, puntualmente en los complejos II y IV. Razón por la cual se evaluó el efecto de los compuestos sobre la actividad de las enzimas succinato oxidasa, succinato deshidrogenasa (complejo II) y citocromo c oxidasa (complejo IV), ya que, estas enzimas evalúan el paso de electrones desde el complejo II al IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

2.1.1. Enzima succinato oxidasa

En este ensayo, se evaluó la succinato oxidasa como el paso de electrones provenientes del succinato, fluyendo a través del complejo II hacia el complejo III y IV, y finalmente hacia el oxígeno. Se evaluó la xantona, timol y el carvacrol en su CL_{50} para evaluar el efecto sobre la actividad de la enzima. Luego, sus concentraciones se redujeron hasta encontrar la menor concentración que indujese un efecto estadísticamente significativo sobre el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial desde complejo II hasta el complejo IV.

Teniendo en cuenta lo anterior, como se observa en la **figura 26**, se muestra un efecto inhibitorio dosis dependiente para la actividad de la enzima, donde todos los compuestos probados mostraron una inhibición enzimática fuerte cuando se oxida el succinato. El carvacrol inhibió la actividad de la succinato oxidasa en un 10,84% ($89,2\% \pm 3,64$) a una concentración de 9,7 ppm. De la misma forma, el timol y la xantona disminuyeron la

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

actividad de la succinato oxidasa en 10,31% ($89,7\% \pm 2,2$) y 29,5% ($70,5\% \pm 6,4$) a 7,9 ppm y 0,9 ppm, respectivamente.

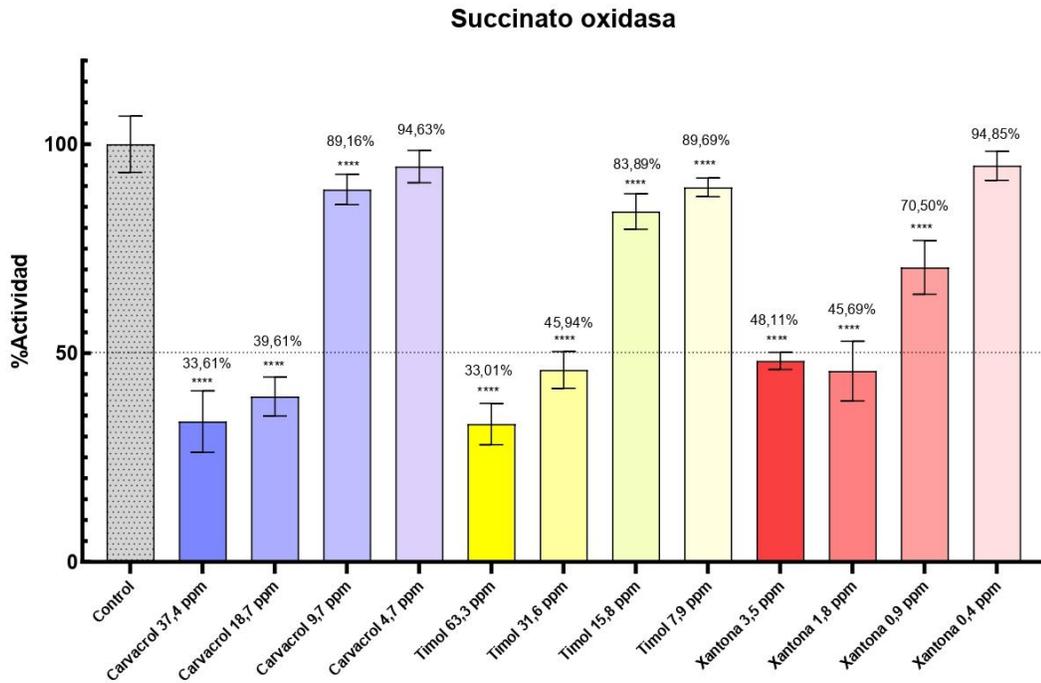


Figura 26. Actividad para succinato oxidasa, en mitocondria de larva *Ae. aegypti* en presencia de carvacrol (37,4 ppm, 18,7 ppm, 9,7 ppm y 4,7 ppm), timol (63,3 ppm, 31,6 ppm, 15,8 ppm y 7,9 ppm) y xantona (3,5 ppm, 1,8 ppm, 0,9 ppm y 0,4 ppm). El control fue tomado como el 100% y corresponde a $127,03 \pm 10,45$ nmol O_2 / min·mg de proteína. *Diferencias estadísticamente significativa respecto al control: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), $p < 0,0001$ (****).

Los anteriores resultados implican que tanto el carvacrol, como el timol y la xantona inhiben el transporte electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, desde el complejo II hasta el complejo IV. Luego, se evaluaron las actividades de las enzimas succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa, para dilucidar el punto de inhibición específico en la cadena transportadora de electrones y proponer así un posible mecanismo de acción de estos compuestos en la bioenergética mitocondrial.

2.1.2. Enzima succinato deshidrogenasa

La enzima succinato deshidrogenasa cataliza la oxidación del succinato a fumarato en el ciclo de Krebs, y los electrones derivados del succinato alimentan al complejo III de la cadena respiratoria, llegando al fumarato, para reducir el oxígeno y formar agua (Rustin et al., 2002).

Con este ensayo se muestra el paso de electrones desde el succinato hacia el complejo II vía FAD pasando por varios centros Fe-S hacia el receptor de electrones DCPIP, que se utiliza en las mediciones de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria debido a su mayor afinidad por los electrones que la ferredoxina (Leiva-Mora et al., 2010).

Como se muestra en la **figura 27**, el carvacrol (9,7 ppm) no presenta diferencias estadísticas con respecto al control en la actividad de la succinato deshidrogenasa ($92,65\% \pm 13,54$). Esto muestra que el carvacrol no afectó la tasa de oxidación del succinato (complejo II), por lo que es probable que la inhibición del flujo de electrones debe estar ocurriendo en otro complejo de la cadena respiratoria mitocondrial, posiblemente, inhibiendo el paso de electrones al complejo III o IV. Por otro lado, para el timol y la xantona, el comportamiento fue distinto, ya que se observó que ambos compuestos disminuyeron la tasa de oxidación de succinato con diferencias estadísticas, en el transporte de electrones del complejo II. El timol disminuyó la actividad de la succinato deshidrogenasa en un $55,66\%$ ($45,34\% \pm 4,4$), mientras que la xantona disminuyó la actividad de la enzima en un $27,35\%$ ($72,7\% \pm 4,2$). Estos resultados sugieren que el timol y la xantona inhibieron la actividad del complejo II. Las concentraciones utilizadas para evaluar la enzima succinato deshidrogenasa fueron: para carvacrol, 9,7 ppm, para timol 7,9 ppm y para la xantona, 0,4 ppm; esta última, teniendo en cuenta los resultados previos del laboratorio, en donde se evaluó la xantona sobre la enzima

NADH oxidasa y se reportó que la mínima concentración con inhibición estadísticamente significativa fue de 0,4 ppm (Pérez Rojas, 2022)

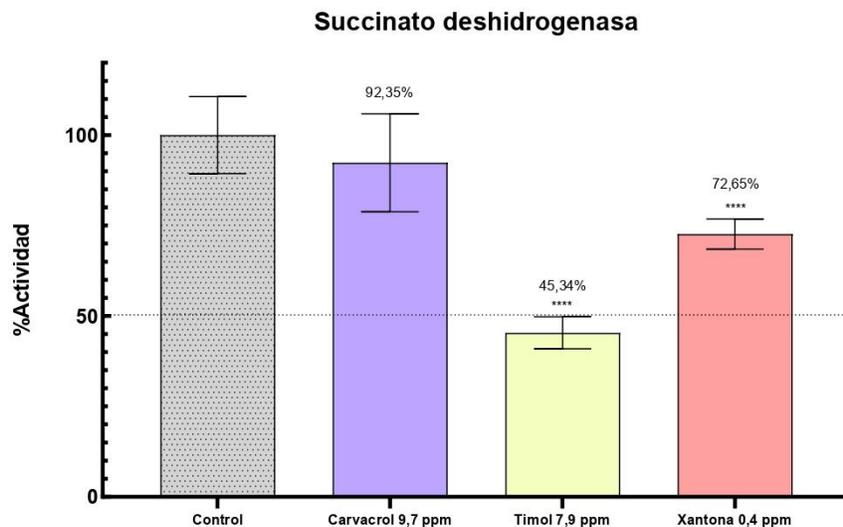


Figura 27. Actividad para succinato deshidrogenasa, en mitocondria de larva *Ae. aegypti* en presencia de carvacrol (9,7 ppm), timol (7,9 ppm) y xantona (0,4 ppm). El control fue tomado como el 100% y corresponde a $63,96 \pm 6,81$ nmol DCPIP/min·mg proteína. *Diferencias estadísticamente significativa respecto al control: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), $p < 0,0001$ (****).

Después de evaluar la enzima succinato deshidrogenasa y encontrar que los compuestos timol y xantona inhibían el paso de electrones al complejo II, fue necesario el análisis de la enzima citocromo c oxidasa para poder dilucidar si alguno de los tres compuestos (carvacrol, timol y xantona), inhibía el paso de electrones al complejo IV.

2.1.3. Enzima citocromo C oxidasa

La citocromo c oxidasa es la enzima terminal de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. Este proceso acopla la reducción de portadores de electrones durante el

metabolismo con la reducción de oxígeno molecular a agua y la translocación de protones desde la matriz mitocondrial interna al espacio intermembrana (Watson et al., 2021).

En este ensayo se cuantifica la oxidación del citocromo C reducido anteriormente con ditionito de sodio por columna.

Como se muestra en la **figura 28**, el carvacrol, durante la oxidación del citocromo c y la reducción del oxígeno molecular en el complejo IV, fue capaz de reducir la actividad en un 40,79 % ($59,21\% \pm 8,6$), lo que sugiere una inhibición del complejo mitocondrial IV, aquí se comprueba la inhibición mostrada en la actividad de la enzima succinato oxidasa. De forma contraria, los compuestos timol y xantona aumentan la actividad de la citocromo c oxidasa en un 303% ($403,8\% \pm 13,0$) después del tratamiento con timol y para la xantona, aumentó en un 167,74% ($267,7\% \pm 15,6$), probablemente para compensar la deficiencia de electrones del complejo II.

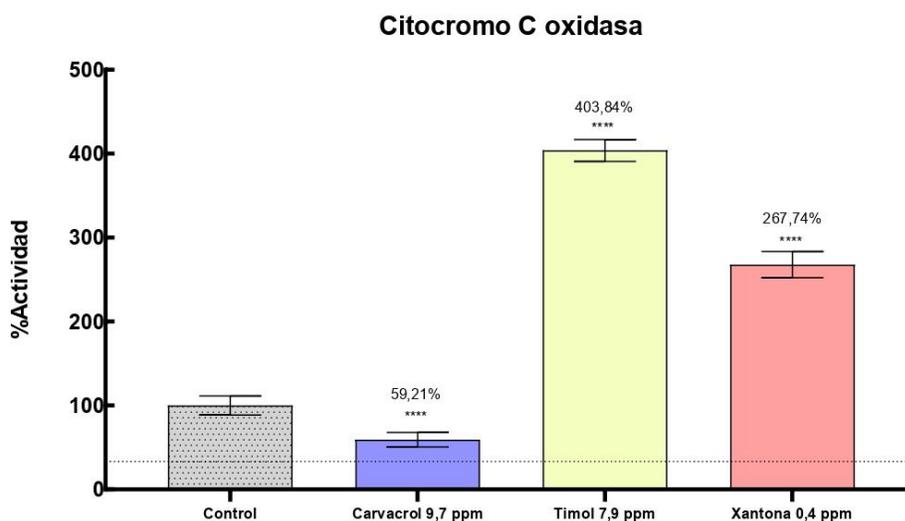


Figura 28. Actividad para citocromo C oxidasa, en mitocondria de larva *Ae. aegypti* en presencia de carvacrol (9,7 ppm), timol (7,9 ppm) y xantona (0,4 ppm) El

control fue tomado como el 100% y corresponde a $3,92 \pm 1,89$ nmoles de citocromo c oxidado/min·mg de proteína *Diferencias estadísticamente significativa respecto al control: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), $p < 0,0001$ (****).

Además de la interrupción de la bioenergética mitocondrial observada, el efecto letal sobre las larvas también podría estar relacionado con la inhibición de la acetilcolinesterasa. Para ello, todos los compuestos probados se evaluaron a las mismas concentraciones encontradas en los ensayos mitocondriales.

2.1.4. Enzima acetilcolinesterasa

Los centros de conmutación eléctrica, llamados sinapsis, se encuentran en todo el sistema nervioso de los humanos, otros vertebrados e insectos. Los músculos, las glándulas y las fibras nerviosas llamadas neuronas son estimuladas o inhibidas por el envío constante de señales a través de estas sinapsis. Las señales estimulantes generalmente son transportadas por un químico llamado acetilcolina y, son interrumpidas por un tipo específico de enzima colinesterasa, la acetilcolinesterasa, que descompone la acetilcolina (Smith, 1983).

Ahora bien, si los insecticidas que afectan a la colinesterasa están presentes en las sinapsis, esta situación se desequilibra. La presencia de sustancias químicas inhibidoras de la colinesterasa evita la descomposición de la acetilcolina. Entonces, la acetilcolina puede acumularse, provocando un atasco en el sistema nervioso. Por lo tanto, cuando un individuo recibe una gran exposición a los compuestos inhibidores de la colinesterasa, el cuerpo no puede descomponer la acetilcolina (Smith, 1983).

Teniendo en cuenta lo anterior, es por ello por lo que se quiso evaluar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en presencia de los metabolitos seleccionados, en donde se analizó la inhibición de la enzima en presencia de todas las proteínas, enzimas y demás

moléculas y macromoléculas presentes en un homogeneizado de larvas, con el fin de observar el efecto indirecto sobre la actividad de la enzima cuando la biodisponibilidad del metabolito es menor, ya que este podría interactuar con diferentes dianas dentro de una gran cantidad de biomoléculas presentes en el homogeneizado. Para ver el efecto de los compuestos sobre la acetilcolinesterasa se llevó a cabo la metodología descrita anteriormente, midiendo la formación del ion ácido 2-nitro,5-mercapto-benzoico (TNB-).

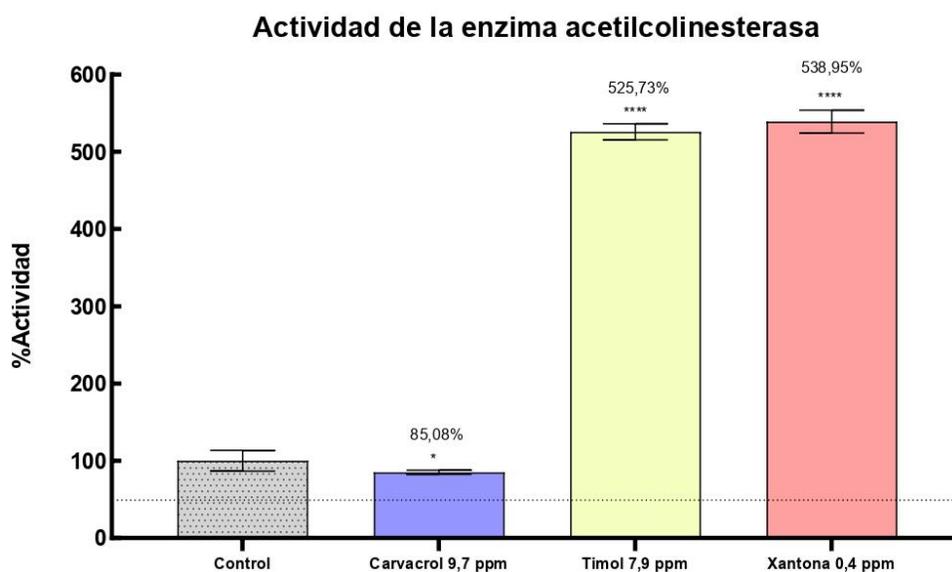


Figura 29. Actividad para acetilcolinesterasa, en mitocondria de larva *Ae. aegypti* en presencia de carvacrol (9,7 ppm), timol (7,9 ppm) y xantona (0,4 ppm). El control fue tomado como el 100% y corresponde a $2,58 \pm 0,34$ pmol nmoles de DTNB /min·mg de proteína. *Diferencias estadísticamente significativa respecto al control: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), $p < 0,0001$ (****).

Como se muestra en la **figura 29**, todos los compuestos probados afectaron la actividad de la acetilcolinesterasa. El carvacrol disminuyó la actividad enzimática en 14,92 % a 9,7 ppm, generando que el sistema nervioso funcione incorrectamente. Por el contrario,

el timol y la xantona aumentaron la hidrólisis de la acetilcolina. En este sentido, timol y xantona incrementaron la actividad de la acetilcolinesterasa en 425,73 % y 438,95 %, respectivamente. El aumento de la actividad de la acetilcolinesterasa puede darse debido a que es un mecanismo compensatorio para disminuir los niveles altos de acetilcolina, ocasionando síntomas depresivos y afectando negativamente la calidad de vida y la función cognitiva de los organismos, hasta llegar a su pronta muerte (Ullas et al., 2019).

3. Conclusiones del capítulo 2

Todos los metabolitos secundarios evaluados inhiben en un cierto punto de la cadena respiratoria mitocondrial. El carvacrol es capaz de inhibir el complejo IV, y el timol y la xantona inhiben el complejo II. La acetilcolinesterasa fue inhibida por el metabolito carvacrol; además se pudo notar que el timol y la xantona aumenta la actividad de esta enzima, posiblemente, con el fin de contrarrestar los niveles de acetilcolina.

CAPÍTULO 3. Discusión y conclusiones globales

1. Discusión global

En el siguiente apartado se presentará una discusión global de todos los resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

El carvacrol es un fenol monoterpénico que ha sido utilizado ampliamente en estudios que involucran diferentes especies y su mecanismo de control, siendo parte de diferentes plantas y aceites esenciales (Park et al., 2017). En este estudio el carvacrol contó con las características fisicoquímicas consignadas en el **anexo 2**, que incluyen polaridad, masa, hidrofobicidad y reactividad, lo cual permitió su avance en las siguientes fases de ensayo que monitorearon la potencia larvicida y actividad enzimática.

En los ensayos larvicidas, el carvacrol presentó un CL_{50} de 37,4 ppm a las 24 horas y 34,5 ppm a las 48 horas (**Tabla 5**), este eficiente resultado puede deberse a que, fenoles como el carvacrol, se relacionan con el daño mitocondrial, ya que desestabilizan la estructura de la membrana mitocondrial, produciendo permeabilidad irregular de radicales, iones de calcio y liberando citocromo C (Aydın et al., 2013; Kong et al., 2019; Ozkan & Erdogan, 2012). Esta liberación podría llevar a una activación de caspasa 9 en el apoptosoma, como resultado de estrés oxidativo y las fallas bioenergéticas, reduciendo el gradiente de pH que afecta la bomba de protones y la reserva de ATP, causando lisis y muerte celular (**Figura 30**) (Braun et al., 2010; Ozkan & Erdogan, 2012).

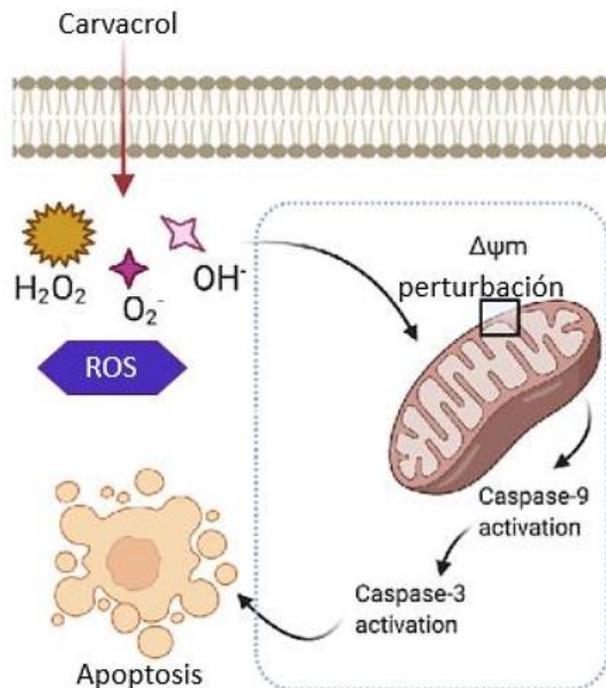


Figura 30. Posible mecanismo de apoptosis mitocondrial generado por carvacrol.
Adaptada de Bano et al., 2022.

Por otro lado, según los resultados enzimáticos, el carvacrol inhibió la actividad de la succinato oxidasa en la concentración de 9,7 ppm en un 10,84% (**Figura 26**). En la enzima succinato deshidrogenasa no obtuvo resultados estadísticamente significativos (**Figura 27**), lo que indica que el compuesto no está inhibiendo el complejo II. Ahora bien, al observar los resultados de la enzima citocromo C oxidasa (**Figura 28**), el carvacrol inhibió su actividad en un 40,79%, lo que corresponde a la inhibición del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial. En cuanto al resto de la cadena de transporte de electrones, el metabolito puede estar inhibiendo otro complejo enzimático, ya sea el complejo I o el III, debido a su inhibición en la enzima succinato oxidasa, que evalúa el paso de electrones desde el complejo II hasta el oxígeno.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Para la acetilcolinesterasa, el carvacrol inhibió la enzima en un 14,92% (**Figura 29**), lo podría relacionarse con los metabolitos seleccionados en el docking molecular para la AChE, obteniendo interacciones de tipo puentes de hidrógeno con la His 480, que es uno de los residuos aminoacídicos que hacen parte de la triada catalítica de la enzima, es decir, uno de los tres residuos de aminoácidos que funcionan en conjunto en el centro del sitio activo, además es uno de los residuos donde se ubican la hélice α y β de la enzima (Harel et al., 2000). Asimismo, forma interacciones tipo π - π con los residuos Tyr 71 y Tyr 370. Estas interacciones y enlaces con estos residuos en ese sitio específico (centro activo de la enzima) podrían impedir la unión de una molécula de sustrato o su hidrólisis, mediante el bloqueo del sitio por su alta actividad reaccionando irreversiblemente con la serina próxima al centro catalítico (Lenaz et al., 2002; Ohnishi et al., 2005; Selivanov et al., 2008; Carretero, 2003).

Cabe resaltar, que los terpenoides, como el carvacrol, interactúan usualmente con el sitio hidrofóbico, además del sitio activo, como muestran los resultados del docking molecular, así como los insecticidas organofosforados y carbamatos (Ryan & Byrne, 1988).

Otro estudio realizado por el científico Jun-Hwan Park y colaboradores, muestra que, con diferentes especies de insectos, las toxicidades insecticidas de los análogos estructuralmente relacionados con el carvacrol, y que el grupo funcional en el carvacrol es necesario para la toxicidad insecticida, ya que al eliminar el grupo funcional metilo, redujo la toxicidad insecticida. Además, la posición del grupo funcional metilo e isopropilo altera la toxicidad insecticida. Estos resultados indican que el modo de acción insecticida de los análogos del carvacrol puede atribuirse en gran medida al grupo funcional metilo (Park et al., 2017). Esta observación contrasta con un hallazgo anterior de que el grupo funcional isopropilo en los

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

análogos de carvacrol es clave para impartir toxicidad insecticida contra plagas de alimentos almacenados (Jeon et al., 2015).

Por su parte, el timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un monoterpeno que se encuentra como compuesto principal de varios aceites esenciales, como el de orégano y tomillo, además ha sido ampliamente utilizado en estudios para el desarrollo de nuevos insecticidas, pesticidas y antifúngicos (Bogdan et al., 2015). En este estudio el timol contó con las características fisicoquímicas consignadas en el anexo 2, que incluyen polaridad, masa, hidrofobicidad y reactividad, lo cual permitió su avance en las siguientes fases de ensayo que monitorearon la potencia larvicida y actividad enzimática.

En los ensayos larvicidas, el timol presentó un CL_{50} de 63,3 ppm para las 24 horas y de 56,7 ppm para las 48 horas (**Tabla 6**), este resultado puede deberse a que, para diferentes especies de insectos, esta derivación está relacionado con el efecto insecticida de este monoterpeno sobre las células de los insectos diana, ya que provocan desorganización en la membrana celular, llevándola a perder permeabilidad (Medeiros et al., 2011). Además, como se mencionó anteriormente, al ser un isómero estructural del carvacrol, el modo de acción insecticida del timol puede atribuirse en gran medida al grupo funcional metilo (Park et al., 2017).

Para los ensayos enzimáticos, el timol causó una inhibición de la enzima succinato oxidasa en la concentración de 7,9 ppm en un 10,31% (**Figura 26**), por lo que se puede decir que tiene la posibilidad de inhibir cualquier complejo de la cadena respiratoria mitocondrial desde el paso de electrones del complejo II al IV, pasando por el complejo III. Por otro lado, se pudo observar que este metabolito también inhibió eficazmente la enzima succinato deshidrogenasa en un 54,66% (**Figura 27**), por lo que se puede notar, que este compuesto

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

inhibe el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, afirmando los resultados obtenidos en el docking molecular, es pues, fue un metabolito seleccionado para este complejo, formando un enlace de tipo puente de hidrógeno con la Gly 100, y dos enlaces de tipo puente de hidrógeno con el residuo aminoacídico Gly 99 (**Figura 14. B**), que es uno de los residuos del sitio de unión de la quinona (Inoaka et al., 2015).

Para la enzima citocromo C oxidasa, el metabolito aumentó la actividad de la enzima en un 303,84% (**Figura 28**), lo que hace que incremente la producción del citocromo C oxidado, traduciéndose como un aumento del flujo de electrones al complejo IV.

El efecto de la acetilcolinesterasa fue de incremento, ya que aumentó la actividad de la enzima en un 425,73% (**Figura 29**). Este aumento puede deberse a que se incrementa la hidrólisis de la acetilcolina debido a esta actividad enzimática incrementada, además, es tentador especular que la mayor liberación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas, que luego se terminará liberando también en la sangre y otros fluidos del insecto, puede desencadenar un mecanismo de defensa en el individuo contra el estrés fisiológico inducido por neurotransmisores, siendo responsable del aumento de la actividad de la enzima (Tiwari et al., 1982).

Por último, la xantona, resultó ser un compuesto bastante interesante para estudios posteriores, ya que según los ensayos larvicidas el CL₅₀ fue de 3,5 ppm a las 24 horas y de 2,7 ppm para las 48 horas (**Tabla 7**). Su actividad larvicida tan eficaz puede deberse a que el mecanismo de acción de las xantonas comúnmente involucra a las proteínas apoptóticas Bax y antiapoptóticas Bcl-2, que son dos de los marcadores más importantes de la apoptosis (Wang et al., 2017). la activación de Bax y la inhibición de Bcl-2 inducen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, la formación de apoptosomas y la activación de las

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

caspasas -3 y -7 (Campbell and Tait, 2018). En consecuencia, la célula comienza a desmantelarse y se produce la apoptosis. Otros mecanismos de acción incluyen la detención del ciclo celular y la interrupción de las vías de señalización de MAPK y PI3K/Akt que modulan el crecimiento y la proliferación de las células cancerosas de la piel (Hambright et al., 2015; Gunter et al., 2020).

En cuanto a la actividad enzimática, la xantona fue capaz de inhibir la enzima succinato deshidrogenasa (**Figura 27**) en un 27,35%, lo que puede indicar una disminución del paso de electrones al complejo II, además se demostró un aumento de actividad en el complejo IV de un 167,74% (**Figura 28**). Esto tiene lugar debido a que sus características moleculares son especiales, es decir, la presencia de un sistema de anillo tricíclico heteroaromático predominantemente plano y rígido y un grupo carbonilo en el anillo central son capaces de realizar varias interacciones; posee un grupo éter biarílico que contribuye al sistema electrónico, y el núcleo de xantona que acomoda una gran variedad de sustituyentes en diferentes posiciones (Pinto et al., 2021). Es decir, su capacidad para atrapar esos electrones se debe a su núcleo, que a simple vista parece muy simple, pero puede mostrar un perfil de reactividad muy rico, que resulta principalmente de las formas de resonancia (**Figura 31**). Los átomos de oxígeno pertenecientes al grupo éter biarílico y al grupo carbonilo están involucrados en esas formas; el sistema tricíclico planar, asociado a una forma zwitteriónica, hace que la molécula se convierta en un sistema muy electronegativo que será capaz de atrapar electrones que retribuirían a su estado de resonancia (Pinto et al., 2020).

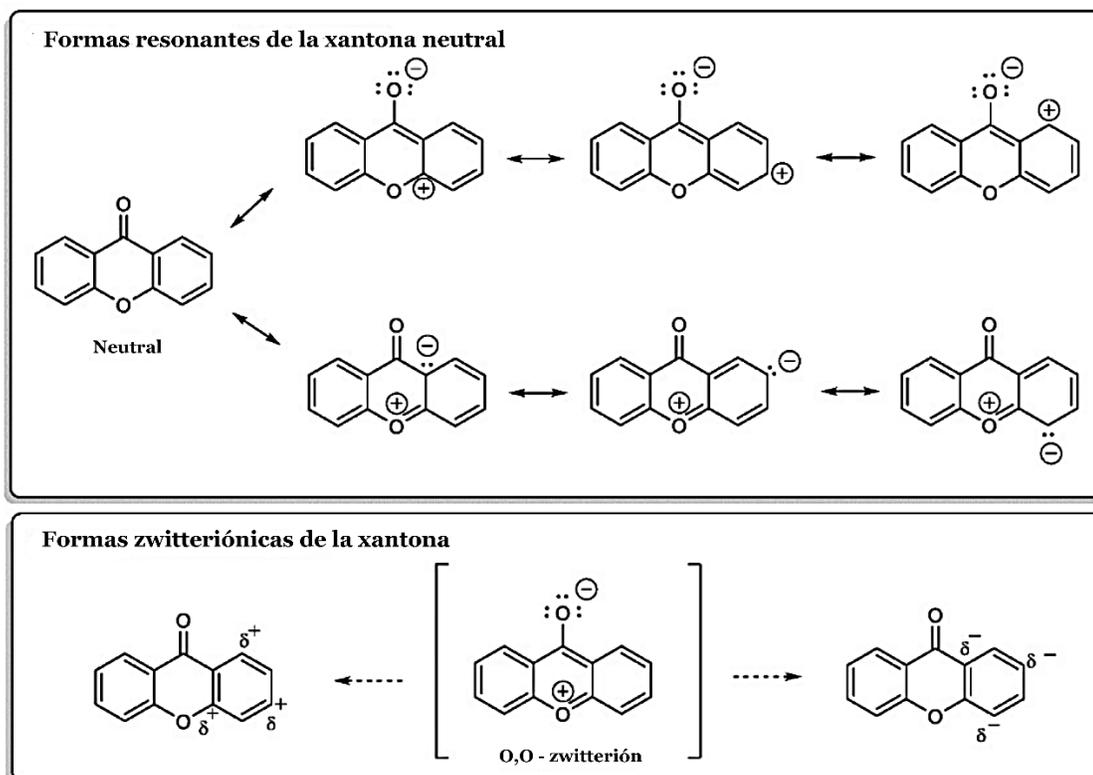


Figura 31. Formas de resonancia de la molécula de xantona. Adaptado de Pinto et al., 2020.

Por otro lado, las mitocondrias son organelas esenciales para la supervivencia de las células eucariotas, que ejercen múltiples funciones bioquímicas (Rojas, 2022). Un estudio muestra que las xantonas actúan como inhibidores de la proteína transportadora de esteroides (SCPI) y es una nueva clase de insecticidas que se dirigen al SCP-2, que es parcialmente responsable del transporte de colesterol intracelular en insectos (Larson et al., 2008) y el modo de acción que suprime absorción de colesterol de la fuente dietética. El tráfico de colesterol es esencial para los insectos porque no pueden sintetizar colesterol de *novo* y, como resultado, los insectos dependen de fuentes dietéticas o microbios simbióticos para adquirir colesterol para un desarrollo y viabilidad adecuados (Kim & Lan, 2010). El mecanismo de los SCPI es la reducción e inhibición de la captación de colesterol, como resultado, la

interrupción de la proliferación celular y la biosíntesis de ecdisona para el crecimiento y la supervivencia (Larson et al., 2010; Sasikumar & Ghosh, 2017).

Igualmente, al realizar los ensayos con la larva entera, el compuesto podría estar reaccionando con otras organelas. Un estudio demostró la naturaleza crítica de la hidroxilación en la mitad inferior del núcleo de xantona para la formación de complejos con hemo. El modo de acción de las xantonas se ejerce contra las últimas etapas del desarrollo eritrocitario del insecto, observaciones completamente consistentes con la noción de que las xantonas bloquean la formación de hemozoína (un proceso que es más activo en la última mitad de la etapa de desarrollo eritrocitario) y que la acumulación de complejos hemo-fármaco solubles aumenta la presión osmótica en la vacuola digestiva, provocando su lisis (Riscoe et al., 2005).

Finalmente, la xantona aumentó la actividad de la enzima AChE en un 438,95% (**Figura 29**). Estos resultados fueron contrarios a lo encontrado en la literatura, en donde la relación estructura-actividad de las xantonas puede contribuir a la inhibición de la acetilcolinesterasa por el tipo y la posición de los sustituyentes. Es pues, la fracción hidrofóbica conduce a una actividad mejorada al contribuir a las interacciones π - π , así como a los sustituyentes hidroxilo mediante la formación de interacciones de enlaces de hidrógeno (Vanessa et al., 2021). Otras investigaciones muestran que el subsitio esterático, donde la AChE se hidroliza a acetato y colina, contiene la tríada catalítica de tres aminoácidos: Ser 238, His 480 y Glu 327 (para la estructura cristalina usada en este proyecto de investigación), cuyo revestimiento contiene principalmente residuos aromáticos que forman una entrada estrecha a la Ser 238 catalítica. La activación de Ser 238 permite la acilación entre el grupo hidroxilo de ese residuo y el oxígeno AChE (Cruz et al., 2017). Es por ello por lo que la xantona, por tener el grupo

carbonilo en su estructura, puede interactuar con el grupo hidroxil de la serina presente en la triada catalítica de la acetilcolinesterasa, e inhibir su funcionamiento. Sin embargo, en esta investigación, la xantona aumentó la actividad de la enzima, entonces podría estarse comportando como el timol, aumentando la producción de la acetilcolina, y generando un mecanismo de defensa en el insecto.

2. Conclusiones globales

Los resultados de docking proponen al timol y xantona como posibles inhibidores de la subunidad del complejo II, cuya ubicación permite interacción de tipo puente de hidrógeno con el residuo Gly 99, presente en el sitio de unión de la ubiquinona. Además, ambos compuestos inhibieron la enzima succinato deshidrogenasa en un porcentaje de 54,66% y 27,35%, a concentraciones de 7,9 y 0,4 ppm respectivamente, lo que confirma los resultados del docking molecular, mostrando que sus interacciones causan una disminución de la actividad del complejo II en la cadena de transporte de electrones.

Para el complejo IV, el inhibidor potencial evaluado fue el carvacrol, ya que fue capaz de disminuir la actividad de la enzima citocromo C oxidasa en un 40,79% a una concentración de 9,7 ppm, lo que puede relacionarse con el impedimento del flujo de electrones hacia el complejo IV.

Se pudo notar que es probable que la acetilcolinesterasa se vea afectada por el metabolito carvacrol, ya que presentó interacciones con los residuos His 480, Tyr 71 y Tyr 370, residuos importantes del sitio activo de la enzima, siendo seleccionado como potencial inhibidor gracias a la disminución de la actividad en la acetilcolinesterasa en un 14,92% a una concentración de 9,7 ppm.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Tanto carvacrol, el timol y la xantona son compuestos con actividad larvicida. Además, inducen inhibición de la bioenergética mitocondrial en los complejos II, IV y la acetilcolinesterasa.

3. Recomendaciones

El control de vectores como *Ae. aegypti* debe ser estudiado desde diferentes ángulos, por lo que el aporte de este trabajo y futuras investigaciones podría alimentar una base de datos con compuestos naturales más amplia, por lo que son necesarios nuevos estudios que se enfoquen en el descubrimiento de nuevos metabolitos activos para el control de individuos.

Se recomienda ampliar la cantidad de subunidades que son tomadas de cada complejo, para que se pueda definir que residuos son los que presentan actividad en cada proteína completa. De igual manera, se recomienda ampliar el número de dianas a las que se les evalúa la acción insecticida, enfoque computacional, y la actividad enzimática, para ampliar con esto, la posibilidad de descubrir los mecanismos de acción de los compuestos que puedan servir como mecanismos de control.

Finalmente, se recomienda adicionar el estudio de mezclas, que pueda proporcionar un efecto sinérgico en la actividad larvicida con el fin de tener varios targets moleculares y disminuir aún más la concentración de metabolito que pueda tener un buen efecto larvicida

4. Divulgación científica

Los resultados de este trabajo fueron presentados en el evento “I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas 2021” con el título “Actividad insecticida de metabolitos de plantas medicinales que influyen en la bioenergética mitocondrial y la acetilcolinesterasa en larvas de mosquitos *Aedes aegypti*” (**Anexo 4**).

Además, los resultados de esa investigación se encuentran sometidos en la revista *Medical and Veterinary Entomology*, editorial Wiley, indexada en pubindex categoría A1, con el nombre de “High-throughput screening of natural compounds with an insecticidal activity using specific protein targets of *Aedes aegypti*” (**Anexo 5**).

5. Agradecimientos

Agradecimientos al programa Bioreto, macro-proyecto 11, denominado “Desarrollo de nuevos productos con actividades antimicrobiana, insecticida y repelente a partir de moléculas aisladas de plantas aromáticas colombianas”, al grupo de investigación Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, al Laboratorio de Entomología Médica y a la Universidad Industrial de Santander.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

ANEXOS

Anexo 1. Base de datos de metabolitos con actividad insecticida.

| PUCHEM ID | Nombre del metabolito | Planta de origen | Score de Biodisponibilidad | Masa molecular |
|-----------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------|
| 643779 | Neral | <i>Cymbopogon nardus</i> | 0.55 | 152.23 |
| 638011 | Geranial | <i>Backhousia citriodora</i> | 0.55 | 152.23 |
| 6987 | Piperitona | <i>Lippia alba</i> | 0.55 | 152.23 |
| 381152 | Piperitenona | <i>Cymbopogon, Andropogon, and Mentha Teucrium</i> | 0.55 | 150.22 |
| 62566 | β -Bourboneno | <i>montanum, Chromolaena odorata</i> | 0.55 | 204.35 |
| 519764 | Biciclosesquifelandreno | <i>Baccharis L. Origanum</i> | 0.55 | 204.35 |
| 17868 | α -Tujeno | <i>syriacum, Teucrium asiaticum</i> | 0.55 | 136.23 |
| 31253 | β -mirceno | <i>Teucrium montanum, Xylopiaromatica</i> | 0.55 | 136.23 |
| 7462 | α -terpineno | <i>Xylopiaromatica, Eupatorium cannabinum</i> | 0.55 | 136.23 |
| 7463 | p-cimeno | <i>Nepeta nepetella, Xylopiaromatica, Lippia organoides</i> | 0.55 | 134.22 |
| 7461 | γ -terpineno | <i>Teucrium montanum, Xylopiaromatica</i> | 0.55 | 136.23 |
| 6989 | Timol | <i>Xylopiaromatica, Stachys obliqua</i> | 0.55 | 150.22 |
| 10364 | Carvacrol | <i>Xylopiaromatica, Lonicera japonica, Chenopodium ambrosioides</i> | 0.55 | 150.22 |
| 7150 | Benzoato de metilo | <i>Vitis rotundifolia, Lonicera japonica</i> | 0.55 | 136.15 |
| 8785 | Acetato de bencilo | <i>Cananga odorata, Vitis rotundifolia, Tanacetum parthenium</i> | 0.55 | 150.17 |
| 7731 | p-cresol metil éter | <i>Cananga odorata and Antidesma laciniatum</i> | 0.55 | 122.16 |
| 2758 | 1,8-Cineol | <i>Pimenta racemosa</i> | 0.55 | 154.25 |
| 6654 | α -Pinenol | <i>Teucrium montanum, Xylopiaromatica</i> | 0.55 | 136.23 |
| 14896 | β -Pinenol | <i>Nepeta nepetella, Teucrium montanum</i> | 0.55 | 136.23 |
| 17100 | Terpineol | <i>Nepeta nepetella, Xylopiaromatica</i> | 0.55 | 154.25 |
| 31253 | Mirceno | <i>Teucrium montanum, Xylopiaromatica</i> | 0.55 | 136.23 |

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

| | | | | |
|----------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 29025 | Verbenona | <i>Eucalyptus fasciculosa, Eucalyptus intertexta</i> | 0.55 | 150.8 |
| 3314 | Eugenol | <i>Syzygium aromaticum, pimineta racemosa</i> | 0.55 | 164.2 |
| 442497 | Rotundifolona | <i>Platostoma hispidum, Mentha arvensis</i> | 0.55 | 166.22 |
| 5144 | safrol | <i>Piper auritium</i> | 0.55 | 162.18 |
| 4276 | miristicina | <i>Piper auritium</i> | 0.55 | 192.21 |
| 10231 | Dilapiol | <i>Piper auritium</i> | 0.55 | 222.24 |
| 13187 | 2-Nonanona | | 0.55 | 142.24 |
| 8163 | 2-Undecanona | | 0.55 | 170.29 |
| 23634636 | Triterpeno | <i>Ruta graveolens</i> | 0.55 | 516.799 |
| 12741 | 2-Decanona | | 0.55 | 156.26 |
| 12310053 | Geijereno | <i>Chromolaena odorata, Lallelantia peltata</i> | 0.55 | 162.27 |
| 7460 | α -felandreno | <i>Annona vepretorum</i> | 0.55 | 136.23 |
| 326 | cuminaldehído | <i>Xylopiaromatica, Thymus longicaulis</i> | 0.55 | 148.2 |
| 7439 | carvona | <i>Tanacetum vulgare, Lindera erythrocarpa</i> | 0.55 | 150.22 |
| 637563 | trans-anetol | <i>Erucaria microcarpa, Anemopsis californica</i> | 0.55 | 148.2 |
| 10659 | apiol | <i>Niphogeton dissecta, Asarum hypogynum</i> | 0.55 | 222.24 |
| 442347 | carotol | <i>Ligusticum striatum, Ligusticum chuanxiong</i> | 0.55 | 222.37 |
| 10248 | elemicina | <i>Anemopsis californica, Asarum celsum</i> | 0.55 | 208.25 |
| 617233 | aliltetrametoxibenceno | <i>Arabidopsis thaliana and Licaria chrysophylla</i> | 0.55 | 238.28 |
| 10856614 | α -selinene | <i>Rhododendron mucronulatum, Hypericum dyeri</i> | 0.55 | 204.35 |
| 176983 | 1,3,8- p- mentatrieno | <i>Dracocephalum kotschyi, Vitis vinifera</i> | 0.55 | 134.22 |
| 11869417 | asaricina | <i>Zanthoxylum austrosinense, Horsfieldia irya</i> | 0.55 | 354.4 |
| 636750 | isoasarona | <i>Blumea mollis, Asarum yakusimense</i> | 0.55 | 208.25 |
| 636822 | trans-asarona | <i>Sphallerocarpus gracilis, Asarum hypogynum</i> | 0.55 | 208.25 |
| 22311 | limoneno | <i>Teucrium montanum, Xylopiaromatica</i> | 0.55 | 136.23 |
| 5284507 | (E) nerolidol | <i>neroli, jengibre, jazmín, la vanda, árbol de té, Cannabis sativa, y hierba de limón.</i> | 0.55 | 222.37 |
| 5281553 | β -ocimene | <i>Porophyllum ruderale</i> | 0.55 | 136.24 |
| 65575 | cedrol | <i>Cunninghamia konishii</i> | 0.55 | 222.37 |

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

| | | | | |
|----------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------|
| 442461 | δ -3-Carene | <i>Dysphania multifida</i> , <i>Nasutitermes ephratae</i> | 0.55 | 136.24 |
| 440966 | (-)-Camphene | <i>Juniperus drupacea</i> , <i>Molopospermum peloponnesiacum</i> | 0.55 | 136.23 |
| 28930 | α -Fenchene | <i>Xylopiaromatica</i> , <i>Juniperus drupacea</i> | 0.55 | 136.23 |
| 18818 | Sabinene | <i>Teucrium montanum</i> , <i>Xylopiaromatica</i> | 0.55 | 136.23 |
| 10545 | Ascaridole | <i>Athamantamacedonica</i> , <i>Achillea millefolium</i> | 0.55 | 168.23 |
| 64685 | Borneol | <i>Eupatorium capillifolium</i> , <i>Chromolaena odorata</i> | 0.55 | 154.25 |
| 442495 | Pulegone | <i>Hedeomamultiflora</i> , <i>Clinopodium dalmaticum</i> | 0.55 | 152.23 |
| 77844 | 3,5- dimethoxytoluene | | 0.55 | 152.19 |
| 80922 | 3,4,5- Trimethoxytoluene | | 0.55 | 182.22 |
| 21160126 | Pregeijerene | <i>Lallemantia peltata</i> , <i>Pimpinella anisum</i> , and <i>Ruta graveolens</i> | 0.55 | 162.27 |
| 27208 | β -Bisabolol | <i>Persicaria mitis</i> , <i>Teucrium asiaticum</i> | 0.55 | 222.37 |
| 12044484 | (E),(E)-Farnesol | <i>Lonicera japonica</i> , <i>Alpinia hainanensis</i> | 0.55 | 312.5 |
| 520687 | 16-Kaurene | <i>Podocarpus nivalis</i> , <i>Sinapis arvensis</i> , and <i>Liochlaena subulata</i> | 0.55 | 272.5 |
| 637563 | (E)-Anethole | <i>Erucaria microcarpa</i> , <i>Anemopsis californica</i> | 0.55 | 148.2 |
| 636822 | E)-Asarone | <i>Sphallerocarpus gracilis</i> , <i>Asarum hypogynum</i> | 0.55 | 208.25 |
| 5281758 | (Z)-Asarone | <i>Asarum hypogynum</i> , <i>Asarum costatum</i> | 0.55 | 208.25 |
| 8815 | Estragole | <i>Vitis rotundifolia</i> , <i>Pinus sylvestris</i> var. <i>hamata</i> | 0.55 | 148.2 |
| 71402779 | 2,2-Dimethyl-6-vinylchroman-4- one | <i>Trichogonia grazielae</i> | 0.55 | 202.25 |
| 14104353 | 2-Senecioid-4- vinylphenol | <i>Platypodanthera melissifolia</i> , <i>Trichogonia campestris</i> , and <i>Trichogonia villosa</i> | 0.55 | 202.25 |
| 17525 | Hexyl butyrate | <i>Malpighia emarginata</i> , <i>Pelargonium quercifolium</i> | 0.55 | 172.26 |
| 8163 | Undecan-2-one | | 0.55 | 170.29 |
| 1615 | 3,4,5'-trimetóxi-3',4'-metilenodióxi-7-9:7'9 diepoxilignan | | 0.55 | 193.24 |
| 9974595 | pipernonaline | <i>Piper retrofractum</i> , <i>Piper nigrum</i> | 0.55 | 341.4 |
| 11012859 | retrofractamide A | <i>Piper mullesua</i> , <i>Piper retrofractum</i> | 0.55 | 327.4 |

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

| | | | | |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------|--------|
| 131751424 | Retrofractamide D | <i>Piper retrofractum</i> | 0.55 | 341.4 |
| 10022321 | 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene | | 0.55 | 375.2 |
| 6755 | 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone | <i>Hojas de Lawsonia inermis</i> | 0.55 | 174.15 |
| 9651 | Galantamine | | 0.55 | 287.35 |
| 62566 | B-bourbonene | <i>Teucrium montanum, Chromolaena odorata</i> | 0.55 | 204.35 |
| 91457 | b-eudesmol | <i>Rhododendron calostrotum, Rhododendron lepidotum</i> | 0.55 | 222.37 |
| 7020 | Xantona | <i>Maclura cochinchinensis, Harungana madagascariensis, and Rhachidosorus mesosorus</i> | 0.55 | 196.2 |
| 13894537 | Bicyclogermacrene | <i>Teucrium montanum, Dacrydium nausoriense</i> | 0.55 | 204.35 |
| 12097317 | Borneol acetate | | 0.55 | 196.29 |
| 11261615 | pipsaedinine | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 570.7 |
| 11203891 | Pipbinine | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 570.7 |
| 5372162 | Pipercide | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 355.7 |
| 6442405 | Guineensine | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 383.52 |
| 5318516 | Pellitorine | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 223.35 |
| 11222182 | pipnoohine | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 361.6 |
| 157010714 | Pipwaqarine | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 397.55 |
| 94896 | tert-butyl dodecadienamide | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 255.44 |
| 108624 | tert-butyl hexadecadienamide | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 311.55 |
| 5320618 | Piperanine | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 287.35 |
| 247220 | [(2E)-hexadecanoyl]-pyrrolidine | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 309.53 |
| 11141599 | (E)-Piperolein A | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 315.41 |
| 638024 | Piperine | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 285.34 |
| 10970518 | Pipzorine | <i>P. nigrum</i> | 0.55 | 363.62 |
| 12309449 | delta-Elemene | | 0.55 | 204.35 |
| 442359 | alpha-Cubebene | | 0.55 | 204.35 |
| 19725 | Copaene | | 0.55 | 204.35 |
| 99856 | Cyperene | | 0.55 | 204.35 |
| 93081 | beta-Cubebene | | 0.55 | 204.35 |
| 6918391 | Beta Elemelene | | 0.55 | 204.35 |
| 91354 | Aromadendrene | | 0.55 | 204.35 |
| 13894537 | Bicyclogermacrene | | 0.55 | 204.35 |
| 12313020 | gamma-muurolene | | 0.55 | 204.35 |
| 441005 | delta-Cadinene | | 0.55 | 204.35 |
| 6432404 | gamma-Cadinene | | 0.55 | 204.35 |
| 92231 | Spathulenol | | 0.55 | 220.35 |
| 16590 | Diallyl disulfide | <i>Allium sativum L</i> | 0.55 | 146.27 |
| 16315 | Diallyl trisulfide | <i>Allium sativum L</i> | 0.55 | 178.34 |
| 5368821 | Alloocimene | <i>Blumea eriantha DC</i> | 0.55 | 136.23 |
| 519872 | Santolina triene | <i>Crossostephium chinense (L.) Makino</i> | 0.55 | 136.23 |
| 8815 | Estragole | <i>Tagetes lucida Cav</i> | 0.55 | 148.2 |
| 10955174 | Patchouli alcohol | <i>Lonicera caprifolium L</i> | 0.55 | 222.37 |
| 12592 | n-Tetracosane | <i>Coccinia grandis (L.) Voigt</i> | 0.55 | 338.65 |

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

| | | | | |
|----------|------------------------------|------------------------------------------------------------|------|--------|
| 6949 | β -trans-Guaiene | <i>Croton argyrophylloides</i> <i>Muell</i> | 0.55 | 204.35 |
| 8222 | n-Eicosane | | 0.55 | 282.55 |
| 595385 | epi-Zonarene | <i>Cupressus arizonica</i> var. <i>glabra</i> Little | 0.55 | 204.35 |
| 341779 | Sesquicineole | <i>Croton rhamnifolioides</i> <i>Pax & K.Hoffm.</i> | 0.55 | 222.37 |
| 121719 | Pinocarvone | <i>Hyssopus officinalis</i> L. | 0.55 | 150.22 |
| 6427105 | Pinocamphone | | 0.55 | 152.23 |
| 92762 | alpha-Eudesmol | <i>Melaleuca leucadendra</i> (L.) L. | 0.55 | 222.37 |
| 227829 | Guaiol | | 0.55 | 222.37 |
| 12304570 | Sylvestrene | <i>Zanthoxylum fagara</i> (L.) <i>Sarg.</i> | 0.55 | 136.23 |
| 637520 | Methyl cinnamate | | 0.55 | 162.19 |
| 3036 | Clofenotane | | 0.55 | 354.49 |
| 3346 | Fenthion | | 0.55 | 278.33 |
| 12304985 | Globulol | <i>P. arboreum</i> | 0.55 | 222.37 |
| 11996452 | Viridiflorol | <i>Calycolpus moritzianus</i> , <i>Piper aduncum</i> | 0.55 | 222.37 |
| 10398656 | α -Cadinol | <i>Ocimum basilicum</i> | 0.55 | 222.37 |
| 442353 | beta-Chamigrene | <i>P. marginatum</i> | 0.55 | 204.35 |
| 14601153 | (E)-isocroweacin | <i>P. aduncum</i> | 0.55 | 192.21 |
| 558221 | AR-tumerone | | 0.55 | 216.32 |
| 441612 | Squamocin | <i>Annonaceae</i> | 0.55 | 622.92 |
| 16871 | 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone | <i>Balsaminaceae</i> | 0.55 | 188.18 |
| 160006 | Bruceine A | <i>Simaroubaceae</i> (<i>Brucea javanica</i>) | 0.17 | 522.54 |
| 167963 | Mahanimbine | <i>Rutaceae</i> | 0.55 | 331.45 |
| 96943 | Girinimbine | | 0.55 | 263.33 |
| 96942 | Murrayanine | | 0.55 | 225.24 |
| 68229 | Seselin | | 0.55 | 228.24 |
| 72307 | Sesamin | | 0.55 | 354.35 |
| 6440616 | Sarniensine | <i>Nerine sarniensis</i> | 0.55 | 221.34 |
| 375117 | 3-Epimacronine | | 0.55 | 329.35 |
| 345501 | Desoxy podophyllotoxin | <i>Berberidaceae</i> | 0.55 | 398.41 |
| 11972305 | Cappariloside B | <i>Capparidaceae</i> | 0.55 | 496.46 |
| 5280666 | Chrysoeriol | | 0.55 | 300.26 |
| 13942832 | Glochidone | | 0.55 | 422.69 |
| 222284 | β -Sitosterol | <i>Melanthiaceae</i> | 0.55 | 414.71 |
| 445154 | Resveratrol | | 0.55 | 228.24 |
| 445639 | Oleic acid | <i>Piperaceae</i> | 0.85 | 282.46 |
| 479931 | Elatol | | 0.55 | 333.69 |
| 100633 | Karanjin | | 0.55 | 292.29 |
| 14033983 | Karanjachromene | | 0.55 | 334.37 |
| 97487 | Koenimbine | | 0.55 | 293.36 |
| 10467 | Arachidic acid | | 0.85 | 312.53 |
| 8215 | Behenic acid | | 0.85 | 340.58 |
| 73067 | (+)-Medicarpin | | 0.55 | 270.28 |
| 5280378 | Formononetin | | 0.55 | 268.26 |
| 10978265 | Lanceolatin B | | 0.55 | 262.26 |
| 24772948 | Violanone | | 0.55 | 316.31 |
| 6432475 | Carvotanacetone | <i>Asteraceae</i> | 0.55 | 152.23 |
| 5353001 | Spilanthol | | 0.55 | 221.34 |
| 8205 | Dodecyl acetate | | 0.55 | 228.37 |
| 28481 | Calarene | | 0.55 | 204.35 |
| 26049 | careno | <i>Elaphandra quinquenervis</i> | 0.55 | 136.24 |

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

| | | | | |
|----------|------------------|------------------------|------|--------|
| 100199 | Burchellin | <i>Lauraceae</i> | 0.55 | 340.37 |
| 5470187 | Zerumbone | <i>Zingiberaceae</i> | 0.55 | 218.33 |
| 443014 | Podophyllotoxone | <i>Berberidaceae</i> | 0.55 | 412.39 |
| 11851219 | Pacharin | <i>Caesalpinoideae</i> | 0.55 | 270.28 |
| 64971 | Betulinic acid | <i>Platanaceae</i> | 0.55 | 456.70 |

Anexo 2. Propiedades ADME de los metabolitos seleccionados.

| Compuesto | mol MW | WPSA | Donor HB | Accept HB | logPo/w | logHERG | Caco-2 | logKp | % Human Oral Absorption | PSA |
|------------------------------------------|---------|---------|----------|-----------|---------|---------|----------|--------|-------------------------|---------|
| Metilendioxiifenilnatrienoil pirrolidina | 325.407 | 0.000 | 2.000 | 4.500 | 3.914 | -5.825 | 743.354 | -1.838 | 100 | 69.153 |
| Capparilósido B | 496.47 | 0.000 | 8.000 | 19.250 | -2.405 | -5.481 | 4.487 | -5.978 | 0 | 215.570 |
| 1,8 cineol | 156.267 | 0.000 | 0.000 | 2.000 | 2.884 | -3.99 | 3375.613 | -1.756 | 100 | 29.019 |
| Eugenol | 164.204 | 0.000 | 1.000 | 1.500 | 2.662 | -3.958 | 3043.597 | -1.616 | 100 | 29.948 |
| Timol | 150.22 | 0.000 | 1.000 | 0.750 | 3.299 | -3.589 | 3816.505 | -1.782 | 100 | 20.866 |
| Quercetina | 302.24 | 0.000 | 1.000 | 5.250 | 0.363 | -5.115 | 18.195 | -5.544 | 51.623 | 143.336 |
| B-Bisabolol | 222.37 | 0.000 | 1.000 | 0.750 | 4.56 | -4.091 | 5888.684 | -1.344 | 100 | 18.557 |
| Fention | 278.32 | 0.000 | 1.000 | 2.000 | 4.047 | -3.708 | 9906.038 | -0.751 | 100 | 22.809 |
| Verbenona | 150.22 | 0.000 | 0.000 | 2.000 | 1.924 | -2.518 | 3152.657 | -2.42 | 100 | 28.035 |
| Xantona | 196.205 | 0.000 | 0.000 | 2.5.000 | 2.722 | -4.755 | 3521.282 | -1.144 | 100 | 35.417 |
| Ácido 3-[hidroxi(oxido) amino]propanoico | 121.093 | | 3.000 | 3.000 | -0.402 | -0.710 | 30.001 | -4.776 | 51.031 | 99.153 |
| Emimicina | 112.088 | 0.000 | 1.000 | 3.500 | -0.378 | -2.989 | 445.054 | -3.669 | 72.132 | 67.456 |
| Guaiol | 222.37 | 0.000 | 1.000 | 0.750 | 4.117 | -3.206 | 4670.831 | -1.96 | 100 | 19.449 |
| 4-nerolidil catecol | 314.467 | 0.000 | 2.000 | 1.50 | 4.927 | -4.065 | 1303.084 | -1.86 | 100 | 44.240 |
| Burchellin | 340.375 | 0.000 | 0.000 | 5.000 | 3.3 | -3.942 | 3592.748 | -1.429 | 100 | 62.874 |
| Caparilósido A | 334.328 | 0.000 | 5.000 | 10.750 | -0.47 | -4.389 | 67.930 | -4.267 | 56.982 | 137.693 |
| Carvacrol | 150.22 | 0.000 | 1.000 | 0.750 | 3.298 | -3.609 | 3687.620 | -1.815 | 100 | 21.465 |
| DDT | 354.49 | 288.546 | 0.000 | 0.000 | 6.906 | -4.516 | 9906.038 | -0.553 | 100 | 0.000 |
| Formononetina | 268.268 | 0.000 | 1.000 | 4.000 | 2.629 | -5.224 | 1242.040 | -1.883 | 100 | 66.327 |
| Sarniensina | 315.411 | 0.000 | 0.000 | 5.200 | 2.753 | -4.284 | 2082.379 | -3.194 | 100 | 33.519 |

NOTA: Valores e intervalos de valores de las propiedades ADME basados en el manual de

QikProp del software Schrodinger Inc.: Mol MW: 130,0-725,0; WPSA: 0,0-174,0;

DonorHB: 0,0-6,0; AcctpHB: 2,0-20,0; PlogPo/w: -2,0-6,5; QPlogHERG: > -5; QPPCaco

(nm/sec): >25-<500; QP log Kp for skin permeability: -8,0 - -1,0; MDCK Permeability

(nm/sec): >25 -<500; % human oral absorption: >25% - <80%; PSA: 7,0 - 200,0.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Anexo 3. Alineamiento realizado en el programa gratuito Clustal Omega entre las especies *Mus musculus*, *Bos Taurus* y *Aedes aegypti*. Un asterisco indica posiciones que tienen un único residuo completamente conservado; dos puntos indica conservación entre grupos de propiedades muy similares. Un punto indica conservación entre grupos de propiedades débilmente similares.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

tr|Q16KF6|Q16KF6_AEDAE      MANVNLASVVLARNALRQKMGVRFSDMIAQKIGKREVVGHWGLPVYADRVDYPMPAIR      60
sp|P19783|COX41_MOUSE      -----MLASRALSLIGKRAISTVC-LRAHGSVVKSEDYAFPTYADRRDYLPDVA      50
1V54_4|Chains              -----AHGSVVKSEDYALPSYVDRRDYLPDVA      28
                               .: .**      .:* ** * ** * :
                               .: .**      .:* ** * ** * :

tr|Q16KF6|Q16KF6_AEDAE      FK-EVTPDIQALREKEKGDWKKLSIQEKKALYRASFCQTFSEIKYPTGEWKMSLGFGLIA      119
sp|P19783|COX41_MOUSE      HVTMLSASQKALKEKEKADWSSLSRDEKVQLYRIQFNESFAEMNRGTNEWKTVVGMAMFF      110
1V54_4|Chains              HVKNLSASQKALKEKEKASWSSLSIDEKVELYRLKFESFAEMNRSTNEWKTVVGAAMFF      88
                               . : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
                               . : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

tr|Q16KF6|Q16KF6_AEDAE      VSMSLATMLLMKAFVYDDIPVTFDDEHQKAQLKRMLDLGVGNITGLSSKWYDNNKWK- 177
sp|P19783|COX41_MOUSE      IGFTALVLIWEKSYVYGPVPHFTFDRDWMAMQTKRMLDMKANPIQGFSAKWYDKNWKK 169
1V54_4|Chains              IGFTALLLIWEKHYYVYGPVPHFTFEEEWVAKQTKRMLDMKVAPIQGFSAKWYDKNWKK 147
                               : : : : : * : * : * : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Anexo 4. Certificado I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas 2021.



LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Certifica que:

DANIELA ZULAY ANGARITA VERGARA

Participó como ponente del trabajo titulado:

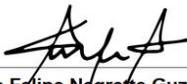
Actividad insecticida de metabolitos de plantas medicinales que influyen en la bioenergética mitocondrial y la acetilcolinesterasa en mosquitos *Aedes aegypti*.

Por: Daniela Zulay Angarita Vergara, Luis Carlos Vesga, Jonny E. Duque & Stelia Carolina Méndez Sánchez.

En la modalidad **PÓSTER VIRTUAL**, en el **I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas: Epidemias, Endemias y Pandemias Persistentes y Emergentes**, organizado por el Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, que se realizó del 11 al 13 de noviembre de 2021, en Bucaramanga, Colombia.



Maria Carolina Velásquez Martínez
Directora Departamento de Ciencias Básicas – Escuela de Medicina



Mario Felipe Negrette Guzmán
Coordinador de Posgrado - Departamento de Ciencias Básicas – Escuela de Medicina

Anexo 5. Primera página del artículo científico sometidos en la revista Medical and Veterinary Entomology.

High-throughput screening of natural compounds with an insecticidal activity using specific protein targets of *Aedes aegypti*

Daniela Z. Angarita-Vergara^{1a}, Maria F. Perez^{1a}, Luis C. Vesga¹, Jonny E. Duque² & Stelia C. Mendez-Sanchez^{1*}

^a These authors contributed equally to this work.

¹ Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

² Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales – Cintrop, Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, Universidad Industrial de Santander, Parque Tecnológico y de Investigaciones Guatiguará Km 2 El Refugio, Piedecuesta, Colombia

*Corresponding author: scmendez@uis.edu.co

Abstract

Identifying and discovering new bioactive compounds for insecticide design is a challenging process. This pesticide should be highly effective in control against *A. aegypti* and secure for humans at the same time. Compounds from natural sources are a safe alternative to offer the ingredients selective to disrupt pharmacological targets enhancing the selectivity and avoiding the resistance problems of commercial insecticides. We identified secondary plant metabolites with insecticidal potential using computational approaches to identify natural compound candidates for *A. aegypti* control. The virtual screening was focused on mitochondria and acetylcholinesterase (AChE) disruption. *In vitro* and *In vivo* analyses validated the insecticidal activity of molecules selected from the computational approach. As a result of this guided methodology to affect specific protein targets, we have gotten compounds with high larvicidal activity, such as farnesol with a lethal concentration of $LC_{50} = 9.78$ ppm and xanthone of $LC_{50} = 3.5$ ppm against *A. aegypti*. This lethal activity of the best compounds was explicitly related to their disruptive effect on the mitochondrial electron transport chain and synaptic alteration of the nerve impulse due to the AChE inhibition.

BIBLIOGRAFÍA

Adasme, Melissa., Linnemann, Katja., Bolz, Sara., Florian, Kaiser., Salentin, Sebastisn., Haupt, Joachim., Schroeder, Michael. (2021). PLIP: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA, *Nucleic Acids Research*, 49, 530–534.

Ahumedo Monterosa, MJ. (2018). Modelado molecular de análogos estructurales de las acil homoserina lactonas en el sitio activo del receptor LasR. Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Grupo de Química cuántica y Teórica.

Anquez, L., Nouvellon A., Simón D. (2016). Control del vector *Aedes aegypti* y medidas preventivas en el contexto del Zika.

Arregui MC., Puricelli E. (2008). Mecanismo de acción de plaguicidas. *Dow AgroSciences Argentina, Buenos Aires*.

Aydın, E., Türkez, H., Keleş, M. S. (2013). The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology*, **66**,149157.

Bahare Salehi, Laura Machin, Lianet Monzote, Javad Sharifi-Rad, Shahira M. Ezzat, Mohamed A. Salem, Rana M. Merghany, Nihal M. El Mahdy, Ceyda Sibel Kılıç, Oksana Sytar, Mehdi Sharifi-Rad, Farukh Sharopov, Natália Martins, Miquel Martorell, and William C. Cho. (2020). Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega*, **5**, 11849-11872.

Bano, I., Skalickova, S., Arbab, S., Urbankova, L., Horký, P. (2022). Toxicological effects of nanoselenium in animals. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **13**.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Batista, J., Tan, L., Bajorath, J. (2010). Atom-centered interacting fragments and similarity search Applications. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **50**, 79–86.

Bazán-Calderón J., Ventura-Flores R., Kato J., Rojas-Idrogo C., Delgado-Paredes G. (2011). Actividad insecticida de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Anopheles pseudopunctipennis* Tehobal (Diptera: Culicidae). *Universidad de Murcia*, **33**.

Bino, J., Sali, A. (2003). Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3982–92.

Bogdan, S T., Deya, M C., Romagnoli, R. (2015). Evaluación de timol para el control antifúngico sobre películas de pintura. *Universidade Federal do Rio de Janeiro, Revista Matéria*, **20**, 699-704.

Bora, A., Suzuki, T., Funar-Timofei, S. (2019). Neonicotinoid insecticide design: molecular docking, multiple chemometric approaches, and toxicity relationship with Cowpea aphids. *Environmental Science and Pollution Research*, **26**, 14547–14561.

Bordás, B., Kömíves, T., Lopata, A. (2003). Ligand-based computer-aided pesticide design. A review of applications of the CoMFA and CoMSIA methodologies. *Pest Management Science*, **59**, 393–400.

Borrero-Landazabal MA., Duque JE., Mendez-Sanchez SC. (2020). Model to design insecticides against *Aedes aegypti* using in silico and in vivo analysis of different pharmacological targets. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **229**.

Borrero-Landazabal, M. (2018). Actividad insecticida de metabolitos secundarios de plantas medicinales contra *Aedes aegypti* y estudio del mecanismo de acción basado en la

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

bioenergética mitocondrial, inhibición de la acetilcolinesterasa y daño en ADN. Universidad Industrial de Santander.

Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254.

Braun, S., Gaza, N., Werdehausen, Robert., Hermanns, Henning., Bauer, Inge., Durieux, M., Hollmann, Markus., Stevens, Markus. (2010). Ketamine induces apoptosis via mitochondrial pathway in human lymphocytes and neuronal cells. *British journal of anaesthesia*, **105**, 347-54.

Bueno-Duarte y., & Méndez-Sánchez SC (2015). Efecto del linalol sobre el hígado de rata bioenergético mitocondrial. *Vitae*, **22**, 33-41.

Campbell, K. J., Tait, S. W. G. (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biology*, **8**.

Campbell-Lendrum, D., Manga L., Bagayoko M., Sommerfeld J. (2015). Climate change and vector-borne diseases: what are the implications for public health research and policy? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **370**, 1665.

Carretero, M. (2003). Los inhibidores de la acetilcolinesterasa en el tratamiento del Alzheimer. *Elsevier*, **22**, 114-115.

Castillo-Morales RM., Carreño Otero AL., Mendez-Sanchez SC., Da Silva MAN., Stashenko EE., Duque JE. (2019). Mitochondrial affectation, DNA damage and AChE

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

inhibition induced by *Salvia officinalis* essential oil on *Aedes aegypti* larvae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **221**, 29-37.

Chemi, G., Gemma, S., Campiani, G., Brogi, S., Butini, S., Brindisi, M. (2017). Computational Tool for Fast in silico Evaluation of hERG K⁺ Channel Affinity. *Frontiers in Chemistry*, **5**.

Conti B., Canale A., Bertoli A., Gozzini F., Pistelli L. (2010). Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*, **107**, 1455-61.

Contreras-Moreira, B. (2018) Algoritmos en bioinformática estructural. doi:10.20350/digitalcsic/8544

Crisan, Luminita., Simona Funar-Timofei., Ana Borota. (2022). Homology Modeling and Molecular Docking Approaches for the Proposal of Novel Insecticides against the African Malaria Mosquito (*Anopheles gambiae*). *Molecules* 27, **12**, 3846.

Cruz, I., Puthongking, P., Cravo, S., Palmeira, A., Cidade, H., Pinto, M., Sousa, E. (2017). Xanthone and Flavone Derivatives as Dual Agents with Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity as Potential Anti-Alzheimer Agents. *Journal of Chemistry*.

Cruz, I., Puthongking, P., Cravo, S., Palmeira, A., Cidade, H., Pinto, M., & Sousa, E. (2017). Xanthone and Flavone Derivatives as Dual Agents with Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity as Potential Anti-Alzheimer Agents. *In Journal of Chemistry*, 1–16.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Csaba K. Zoltani. (2015). Chapter 37 - Cardiovascular System as a Target of Chemical Warfare Agents, Editor(s): Ramesh C. Gupta. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition). *Academic Press*, 519-533.

De Salazar, P., Jané M., Maresma M., Plasencia A. (2018). Evaluación del riesgo de transmisión autóctona del virus Zika y otras enfermedades virales emergentes transmitidas por mosquitos en Cataluña. *Gaceta Sanitaria*, **32**, 101-105.

Debnath, U & Sanyal, S. (2020). Structure-based drug design (SBDD): how proteins are the cornucopia of medicinal chemistry. *Adamas University*.

Detmer, S., Chan, D. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**, 870–879.

Detmer, S., Chan, D. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**, 870–879.

Devine, G., Dominique E., Oigusuku E., Furlong M. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, **25**, 74-100.

Dey, F & Caflisch, A. (2008). Fragment-based de novo ligand design by multiobjective evolutionary optimization. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **48**, 679–690.

Dhanasekaran, S., Venugopal, D., Al-Dayyan, N., Ravinayagam, V., Mohammed, AA. (2020). Emerging insights into mitochondria-specific targeting and drug delivering

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

strategies: Recent milestones and therapeutic implications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **27**, 3581-3592.

Dharmagadda V., Naik S., Mittal P., Vasudevan P. (2005). Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology*, **96**, 1235-1240.

Dias, C. N., & Moraes, D. F. C. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitology Research*, **113**, 565–592.

Durrant, DJ & McCammon, JA. (2010). Computer-aided drug-discovery techniques that account for receptor flexibility. *Current Opinion in Pharmacology*, **10**, 770–774.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88–95.

Extrapolations powered by Schrödinger. Structure-based Drug Design vs. Ligand-based Drug Design. En línea en: <https://extrapolations.com/structure-based-drug-design-vs-ligand-based-drug-design/>

Fernandes, M. J. G., Pereira, R. B., Pereira, D. M., Fortes, A. G., Castanheira, E. M. S., & Gonçalves, M. S. T. (2020). New Eugenol Derivatives with Enhanced Insecticidal Activity. *International journal of molecular sciences*, **21**, 9257.

Ferreira L., Dos Santos R., Oliva G., Andricopulo A. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, **20**, 13384–421.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Fishel, F. (2018). Pesticidas y Colinesterasa. *UF, IFAS extensión, University of Florida*.

Friesner R., Banks J., Murphy R., Halgren T., Klicic J., Mainz, D., Repasky, Matthew P., Knoll E., Shelley M., Perry J., David E., Francis P., Shenkin P. (2004). A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, **47**, 1739–1749.

Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, **87**, 245–254.

Geppert, H., Vogt, M., Bajorath, J. (2010). Current trends in ligand-based virtual screening: molecular representations, data mining methods, new application areas, and performance evaluation. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **50**, 205–216.

Ghosh, A., Chowdhury, N., Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The Indian Journal of Medical Research*, **135**, 581-598.

González-Calvar, S., & Corini, H. (2004). CONTROL RESPIRATORIO. Buenos Aires: Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina-Universidad de Buenos Aires.

Goodford, PJ. (1985). A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry*, **28**, 849–857.

Goodman, CD., Buchanan, HD., McFadden, GI. (2017). Is the Mitochondrion a Good Malaria Drug Target? *Trends in Parasitology*, **33**,185-193.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Guerra Martinez, JJ. (2014). Libro electrónico de bioquímica. Centro de ciencias básicas. Departamento de Química. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Capítulo 9.

Gunter, NV., The, SS., Lim, YM., Mah, SH. (2020). Natural Xanthones and Skin Inflammatory Diseases: Multitargeting Mechanisms of Action and Potential Application. *Frontiers in Pharmacology*, **11**.

Halgren T., Murphy B., Friesner R., Beard H., Frye L., Pollard W., Banks J. (2004). A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. enrichment factors in database screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, **47**, 1750–9.

Hambright, H. G., Meng, P., Kumar, A. P., and Ghosh, R. (2015). Inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis disrupts oxidative stress-mediated survival of melanoma cells. *Oncotarget*, **6**, 7195–7208.

Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T. L., Mallender, W. D., Lewis, T., Fletcher, R. J., Guss, J. M., Silman, I., Sussman, J. L. (2000). Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science*, **9**, 1063-1072.

Hernández, P. (2016). To reduce the population of *Aedes aegypti* mosquitoes, strategy to prevent three viral diseases increasing their incidence. *Revista Médica Electrónica*, **38**, 120-122.

HOY

Inaoka DK, Shiba T., Sato D, Balogun EO, Sasaki T., Nagahama M., Oda M., Matsuoka S., Ohmori J., Honma T., Inoue M., Kita K., Harada S. (2015). Structural Insights

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

into the Molecular Design of Flutolanil Derivatives Targeted for Fumarate Respiration of Parasite Mitochondria. *International Journal of Molecular Science*, **287-308**.

Instituto Nacional de Salud. (2020). Boletín semanal por las entidades territoriales al Instituto Nacional de Salud a través del Sistema de vigilancia en salud pública, del gobierno nacional de Colombia, boletín epidemiológico semana 41. https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_41.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2022). Boletín epidemiológico semanal: Semana epidemiológica 12, 20 al 26 de marzo de 2022. Tomado de: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2022_Bolet%C3%ADn_epidemiologico_semana_12.pdf

Jeon, J. H., Lee, S. G., Lee H. S. (2015). Isolation of insecticidal constituent from *Ruta graveolens* and structure-activity relationship studies against stored-food pests (Coleoptera). *Journal of Food Protection*, **78**, 1536–1540.

Jianing, L., Abel R., Zhu K., Cao Y., ZAhao S., Friesner R. (2011). The VSGB 2.0 Model: A Next Generation Energy Model for High Resolution Protein Structure Modeling. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, **79**, 2794-812.

Juergens U. R. (2014). Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug research*, **64**, 638–646.

Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., Milos, M. (2007). *In Vitro* Acetylcholinesterase Inhibitory Properties of Thymol, Carvacrol and their Derivatives Thymoquinone and Thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, **21**, 259-261.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Kalyaanamoorthy, S & Chen, YPP. (2011). Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discovery Today*, **16**, 831–839.

Kamal Niaz, Fazlullah Khan. Editor(s): Ana Sanches Silva, Seyed Fazel Nabavi, Mina Saeedi, Seyed Mohammad Nabavi. (2020). Chapter 3 - Analysis of polyphenolics. *Recent Advances in Natural Products Analysis, Elsevier*, 39-197.

Karimi, I., Yousofvand, N., & Hussein, B. A. (2021). In vitro cholinesterase inhibitory action of *Cannabis sativa* L. Cannabaceae and *In silico* study of its selected phytocompounds. *In Silico Pharmacology*, **9**.

Karine Megy, Scott J., Emrich, Daniel Lawson., David Campbell., Emmanuel Dialynas., Daniel S.T. Hughes., Gautier Koscielny., Christos Louis., Robert M. MacCallum., Seth N. Redmond., Andrew Sheehan., Pantelis Topalis., Derek Wilson. (2012). The VectorBase Consortium, VectorBase: improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics, *Nucleic Acids Research*, 729–734.

Kazunobu Matsushita., Asuka Otofujii., Midori Iwahashi., Hirohide Toyama., Osao Adachi. (2001). NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. Purification of an NADH dehydrogenase II homolog able to oxidize NADPH. *FEMS Microbiology Letters*, **204**, 271–276.

Kim, Min-Sik & Lan, Q. (2010). Sterol carrier protein-x gene and effects of sterol carrier protein-2 inhibitors on lipid uptake in *Manduca sexta*. *BMC physiology*, **10**, 9.

King MS., Sharpley MS., Hirst J. (2009). Reduction of hydrophilic ubiquinones by the flavin in mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) and production of reactive oxygen species. *Biochemistry*, **48**, 2053–62.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Kong, J., Zhang, Y., Ju, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Quek, S., Yao, W. (2019). Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes. *Food Chemistry*, **285**, 380- 388.

Larson, Ryan., Lorch, Jeffrey., Pridgeon, Julia., Becnel, James., Lan, Q. (2010). The Biological Activity of β -Mangostin, a Larvicidal Botanic Mosquito Sterol Carrier Protein-2 Inhibitor. *Journal of medical entomology*. **47**, 249-57.

Larson, Ryan., Maklakova, Vilena., Jiang, Zhisheng., Lan, Q. (2008). Larvicidal Activity of Sterol Carrier Protein-2 Inhibitor in Four Species of Mosquitoes. *Journal of medical entomology*. **45**, 439-44.

Leiva-Mora, M., Alvarado-Capó, Y., Acosta-Suárez, M., Cruz-Martín, M., Sánchez-García, C., Roque, B. (2010). Protocolo para el aislamiento de cloroplastos intactos de hojas de plantas de *Musa spp.* obtenidas por cultivo in vitro y evaluación de la actividad fotosintética. *Bioteología Vegetal*, **10**, 49 – 52.

Lenaz, G., Bovina, C., D'Aurelio, M., Fato, R., Formiggini, G., Genova, ML, Giuliano, G., Merlo, PM, Paolucci, U., Parenti, CG., Ventura, B. (2002). Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Aging. *The New York Academy of Science*, **959**, 199-213

Lengauer, T., & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current opinion in structural biology*, **6**, 402–406.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Leyva, M., Marquetti MC., Tacoronte J., Scull R., Tiomno O., Mesa A., Montada D. (2009). Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Revista Biomédica*. **20**, 5-13.

Li, Y., Park, J. S., Deng, J. H., & Bai, Y. (2006). Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **38**, 283–291.

Lima, E.P., Paiva, M.H.S., de Araújo, A.P. et al. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites Vectors* **4**, **5**.

López, M. D., & Pascual-Villalobos, M. J. (2010). Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*, **31**, 284–288.

Madhumathi Sanjeevi., Prajna N. Hebbar., Natarajan Aiswarya, S. Rashmi., Chandrashekar Narayanan Rahul., Ajitha Mohan., Jeyaraman Jeyakanthan., Kanagaraj Sekar, (2022). Methods and applications of machine learning in structure-based drug discovery. *Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods, Academic Press*, **Capítulo 25**, 405-437.

Marsik, Petr., Kokoska, Ladislav., Landa, Premysl., Nepovim, Ales., Soudek, Petr., Vanek, Tomas. (2005). *In vitro* Inhibitory Effects of Thymol and Quinones of *Nigella sativa* Seeds on Cyclooxygenase-1- and -2-Catalyzed Prostaglandin E2 Biosyntheses. *Planta medica*, **71**. 739-42.

Martin, Y. (2009). Let's not forget tautomers. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **23**, 693–704.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Martínez, Nubilde. (2010). Manejo integrado de plagas: Una solución a la contaminación ambiental. *Comunidad y Salud*, **8**, 073-082.

Mason, T., Poyton, R., Wharton, C., Schatz, G. (1973). Cytochrome c oxidase from bakers yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, **248**, 1346–1354.

Mc Namara CE., Larsen L., Perry NB et al. (2005). Anti-inflammatory sesquiterpene-quinones from the New Zealand sponge *Dysidea cf. cristagalli*. *Journal of Natural Products (Lloydia)*, **68**, 1431-1433.

McInnes, C. (2007). Virtual screening strategies in drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, **11**, 494–502.

Medeiros, MGF., Silva, AC., Graças Lopes Citó, AM., Borges AR., Lima, SG., Dantas Lopes, JA., Queiroz Figueiredo, RCB. (2011). In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitology International*, **60**, 237-241.

Megy, K., Emrich, S. J., Lawson, D., Campbell, D., Dialynas, E., Hughes, D. S., Koscielny, G., Louis, C., Maccallum, R. M., Redmond, S. N., Sheehan, A., Topalis, P., Wilson, D., VectorBase Consortium. (2012). Improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics, *Nucleic Acids Research. The VectorBase Consortium, VectorBase*, **40**, 729–734.

Meng XY., Zhang HX, Mezei M., Cui M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, **7**, 146-57.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Mesquita, Rafael D., Gaviraghi, Alessandro., Gonçalves, Renata L.S., Vannier-Santos, Marcos A., Mignaco, Julio A., Fontes, Carlos F.L., Machado, Luciana E.S.F., Oliveira, Marcus F. (2021). Cytochrome c Oxidase at Full Thrust: Regulation and Biological Consequences to Flying Insects. *Cells*, **10**, 470.

Mironova, Galina Yu., Mazumdar, Neil., Hashad, Ahmed M., El-Lakany, Mohammed A., Welsh, Donald G. (2022). Defining a role of NADPH oxidase in myogenic tone development. *Microcirculation*, **29**, e12756.

Miscione, P., Ulloa S. (2016). Application of Molecular Mechanics for the Discovery of Novel Microbial IIA Topoisomerases Inhibitors Chemistry Department Faculty of Sciences University of Los Andes Colombia.

Mitjana, L. (2019). Prueba de chi-cuadrado (χ^2): qué es y cómo se usa en estadística. En línea en: <https://psicologiaymente.com/miscelanea/prueba-chi-cuadrado>

Mondragón J. (2002). Insecticidas. http://www.csr.servicios.es/LABORATORIO/DESCARGAS/LOS_INSECTICIDAS_LECTURA_AVANZADA.pdf

Muñoz, J. A., V., Staschenko, E., Ocampo, C. B. D. (2014). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *aedes aegypti* (diptera: Culicidae)/Insecticidal activity of essential oils from native plants against *aedes aegypti* (diptera: Culicidae). *Revista Colombiana De Entomología*, **40**, 198-202.

Myers S., Baker A. (2001). Drug discovery: an operating model for a new era. *Nature Biotechnology*, **19**, 727-30.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Natarajan, A., Sugumar, S., Bitragunta, S., Balasubramanyan, N. (2015). Molecular docking studies of (4Z, 12Z)-cyclopentadeca-4, 12-dienone from *Grewia hirsuta* with some targets related to type 2 diabetes. *BMC complementary and alternative medicine*, **15**, 73.

Nave, R. (2005). Cytochrome C Oxidase (Complex IV). HyperPhysics. Recuperado 14 de septiembre de 2022, de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Biology/Complex4.html#c1>

Nisius B., Sha F., Gohlke H. (2012). Structure-based computational analysis of protein binding sites for function and druggability prediction. *Journal of Biotechnology*, **159**, 123–34.

Ohnishi, ST, Ohnishi, T., Muranaka, S., Fujita, H., Kimura, H., Uemura, K., Yoshida, K. y Utsumi, K. (2005). A Possible Site of Superoxide Generation in the Complex I Segment of Rat Heart Mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **37**, 1-15.

Oprea, TI & Matter, H. (2004). Integrating virtual screening in lead discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, **8**, 349–358.

Organización Panamericana de la Salud (OPS) OPS/OMS Plataforma de Información de Salud para las Américas (PLISA) (2020). Disponible <https://bit.ly/2Pes0li>

Organización Panamericana de la Salud Plataforma de Información de Salud para las Américas. (2020). <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html>

Organización Panamericana de la Salud. (2021). Actualización Epidemiológica Dengue, chikunguña y Zika en el contexto de COVID-19.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55639/EpiUpdate23Dec2021_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Organización Panamericana de la Salud. (2021). Actualización Epidemiológica Dengue, chikunguña y Zika en el contexto de COVID-19 23 de diciembre de 2021. Tomado de:

https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55639/EpiUpdate23Dec2021_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Ozkan A., Erdogan A. (2012). A comparative study of the antioxidant/prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant H1299 cells. *Natural Product Communications*, **7**, 1557-60.

Paddenberg, R., Ishaq, B., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Rose, F., Weissmann, N., Braun-Dullaeus, R. C., & Kummer, W. (2003). Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *American journal of physiology, Lung cellular and molecular physiology*, **284**, 710–719.

Palomares-Marín J., Rodríguez-Preciado S.Y., Hernández-Andrade L., Hernández Cañaverl I.I. (2018). Vacunas contra el Virus del Dengue, Chikungunya, Zika y Mayaro. *Revista Médico-Científica de la Secretaría de Salud Jalisco*, **5**, 109-115.

Parada Puig, Raquel. (2019). Interacciones hidrofóbicas: qué es, importancia y ejemplos. *Lifeder*. Recuperado de <https://www.lifeder.com/interacciones-hidrofobicas/>.

Park, JH., Jeon, YJ., Lee, CH. et al. (2017). Insecticidal toxicities of carvacrol and thymol derived from *Thymus vulgaris* Lin. against *Pochazia shantungensis* Chou & Lu., newly recorded pest. *Scientific Reports*, **7**, 40902.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Parra Henao, G. J., García Pajón, C. M., Cotes Torres, J. M. (2008). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *CES Medicina*, **21**.

Pérez Rojas. (2022). Actividad larvicida de metabolitos de plantas que afectan la bioenergética mitocondrial de mosquitos *Aedes aegypti*. Universidad Industrial de Santander.

Periago, M., Guzman M. (2007). Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *21*, 187-191.

Pérot S., Sperandio O., Miteva MA., Camproux AC., Villoutreix BO. (2010). Druggable pockets and binding site centric chemical space: A paradigm shift in drug discovery. *Drug Discovery Today*, **15**, 656–67.

Pietro G., Marco De Vivo., Ulloa S. (2016). Application of Molecular Mechanics for the Discovery of Novel Microbial IIA Topoisomerases Inhibitors Chemistry. *Department Faculty of Sciences University of Los Andes Colombia*.

Pinto, M. M. M., Palmeira, A., Fernandes, C., Resende, D. I. S. P., Sousa, E., Cidade, H., Tiritan, M. E., Correia-da-Silva, M., & Cravo, S. (2021). From Natural Products to New Synthetic Small Molecules: A Journey through the World of Xanthonenes. *Molecules*, **26**, 431.

Pissurlenkar, Raghuvir., Shaikh, Mushtaque., Iyer, Radhakrishnan., Coutinho, Evans. (2009). Molecular Mechanics Force Fields and their Applications in Drug Design. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents)*, **8**, 128-150.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Ponce, G., Cantú, P. C., Flores, A., Badii, M., Zapata, R., López, B., Fernández, I. (2006). Modo de acción de los insecticidas. *Revista Salud Pública Y Nutrición*, **7**.

Pryde KR., Hirst J. (2011). Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 18056–65.

Pullman, M., Penefsky, H., Datta, A., Racker, E. (1960). Partial resolution oxidative of the enzyme's phosphorylation catalyzing. *The Journal of Biological Chemistry*, **235**, 3322 – 3329.

Qudsia Yousafi., Hafsa Anwar., Hamid Rashid., Qurban Ali., Muhammad Saad Khan., Asim Mehmood., Shahzad Saleem., Muhammad Wasim Sajid., Rida Irfan1., Ashir Masroor. (2019). Insecticide resistance management strategy for *Aedes aegypti* L. and *Anopheles gambiae* G. through prediction of potential chorion peroxidase inhibitors using computer aided drug designing approach (CAAD). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, **56**, 675-686.

Quispe E., Cravajal A., Gozzer J., Moreno B. (2015). Ciclo biológico y Tabla de Vida de *Aedes aegypti*, en laboratorio. *Rebiolest*, **3**.

Ralph, S.J., Moreno-Sánchez, R., Neuzil, J. (2011). Inhibitors of Succinate: Quinone Reductase/Complex II Regulate Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Protect Normal Cells from Ischemic Damage but Induce Specific Cancer Cell Death. *Pharmaceutical Research*, **28**, 2695.

Ramos R.S., Williams J. C., Macêdo, Josivan S. Costa., Carlos H. T. de P. da Silva., Joaquín M. C. Rosa., Jorddy Neves da Cruz., Mozaniel S. de Oliveira., Eloisa H. de Aguiar

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Andrade., Raullyan B. L. e Silva., Raimundo N. P. Souto., Cleydson B. R. Santos. (2020). Potential inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase and juvenile hormone with insecticidal activity: study of the binding mode via docking and molecular dynamics simulations, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **16**, 4687-4709.

Ramos, R S., Williams J. C. Macêdo, Josivan S. Costa., Carlos H. T. de P. da Silva., Joaquín M. C. Rosa., Jorddy Neves da Cruz, Mozaniel S. de Oliveira., Eloisa H. de Aguiar Andrade., Raullyan B. L. e Silva, Raimundo N. P. Souto., Cleydson B. R. Santos. (2020). Potential inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase and juvenile hormone with insecticidal activity: study of the binding mode via docking and molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **38**, 4687-4709.

Riscoe, M., Kelly, J. X., & Winter, R. (2005). Xanthones as antimalarial agents: Discovery, mode of action, and optimization. *Current Medicinal Chemistry*, **12**, 2539-49.

Robinson, SW., Afzal, AM., Leader DP. (2014). Chapter 13 - Bioinformatics: Concepts, Methods, and Data, Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. *Academic Press*, 259-287.

Rogers, K. (2019). *Aedes*. *Enciclopedia Británica*.
<https://www.britannica.com/animal/Aedes>

Rojas, María Laura. (2022). Rol de la proteína transportadora de lípidos StarD7 en la morfología, dinámica y función mitocondrial. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Químicas; Argentina.

Romero, P., Wainer, G. (2019). Un Modelo Computacional de la Transmisión del Dengue por Autómatas Celulares. *Selecciones Matemáticas*, **6**, 217-224.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Roos, K., Wu, C., Damm, W., Reboul, M., Stevenson, J. M., Lu, C., Dahlgren, M. K., Mondal, S., Chen, W., Wang, L., Abel, R., Friesner, R. A., Harder, E. D. (2019). OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules. *Journal of chemical theory and computation*, **1863–1874**.

Rustin, P., Munnich, A., Rötig, A. (2002). Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *European Journal of Human Genetics*, **10**, 289–291.

Ryan, M. F., Byrne, O. (1988). Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*, **14**, 1965–1975.

Sagar, A. (2019). Homology Modeling- Working, Steps, And Uses. *The Biology Notes*. En línea en: <https://thebiologynotes.com/homology-modeling-working-steps-and-uses/>

Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., Schroeder, M. (2015). PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research*, **43**, 443–447.

Sanabria, L., Segovia, E., González, N., Alcaraz, P., & Vera de Bilbao, N. (2009). Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos). *Memorias Del Instituto De Investigaciones En Ciencias De La Salud*, **7**, 26–31.

Sasikumar, Kandasamy & Ghosh, Asit Ranjan. (2017). Larvicidal activity of prenyl xanthenes from *Garcinia mangostana* against dengue vector. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, **12**, 282.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Sastry M., Adzhigirey M., Day T., Annabhimoju R., Sherman W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **27**, 221–234.

Schaller, C. (2022). Complejo II. LibreTexts Chemistry. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_Structure_and_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_\(Schaller\)/V%3A_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_3/07%3A_Oxidative_Phosphorylation/7.03%3A_Complex_II#:~:text=Complex%20II%20is%20another%20group,ATP%20to%20power%20cellular%20processes](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_Structure_and_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_(Schaller)/V%3A_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_3/07%3A_Oxidative_Phosphorylation/7.03%3A_Complex_II#:~:text=Complex%20II%20is%20another%20group,ATP%20to%20power%20cellular%20processes).

Schenone, M., Dančík, V., Wagner, B. K., & Clemons, P. A. (2013). Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nature chemical biology*, **9**, 232–240.

Schrödinger Release 2021-2: Maestro, Schrödinger Manual Protein Structure Alignment, LLC, New York, NY. (2021).

Schrödinger Release 2021-4: Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY. (2021). The Advantages of Accurate Receptor Models. <https://www.schrodinger.com/products/prime>

Selivanov, V. A., Zeak, J. A., Roca, J., Cascante, M., Trucco, M., & Votyakova, T. V. (2008). The role of external and matrix pH in mitochondrial reactive oxygen species generation. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 29292–29300.

Sene, N. M., Mavridis, K., Ndiaye, E. H., Diagne, C. T., Gaye, A., Ngom, E., Ba, Y., Diallo, D., Vontas, J., Dia, I., & Diallo, M. (2021). Insecticide resistance status and

mechanisms in *Aedes aegypti* populations from Senegal. *PLoS neglected tropical diseases*, **15**.

Sethi, A., Joshi, K., Sasikala, K., Alvala, M. (2019). Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications. *Drug Discovery and Development - New Advances*.

Shanmugam, G & Jeon, J. (2017). Computer-Aided Drug Discovery in Plant Pathology. *The Plant Pathology Journal*, **33**, 529-542.

Signer, T. (1974). Determination of the activity of succinate, NADH, choline α-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods of Biochemical analysis*, **22**, 123-175.

Singh, K., Muthusamy, K. (2013). Molecular modeling, quantum polarized ligand docking and structure-based 3D-QSAR analysis of the imidazole series as dual AT1 and ETA receptor antagonists. *Acta Pharmacol*, **34**, 1592–1606.

Smith, William. 1983. Cholinesterase. Chemicals Pesticide Program. Cornell Cooperative Extension Information. New York State College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University, Ithaca, NY.

Somlo, M. (1965) Induction des lactico-cytochrome c reductase de la levure aerobie par es actates. *Biochimica et Biophysica*, **4**, 183-201.

Sousa, J. S., D'Imprima, E., & Vonck, J. (2018). Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Sub-cellular biochemistry*, **87**, 167–227.

Souza-Neto, J., Powell, J., Bonizzoni, M. (2019). *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection, Genetics and Evolution*, **67**, 191-209.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Sulimov, V., Kutov D., Sulimov A. (2020). Advances in Docking. *Current Medicinal Chemistry*, **42**, (7555-7580).

Sun F., Huo X., Zhai Y., Wang A., Xu J, Su D., Bartlam M., Rao Z. (2005). Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *CellPress*, **121**, 1043-1041.

The UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. (2019). *Nucleic Acids Research*, 506–515.

Tiwari, SC., Siddiqui, JS., Tuteja, N., Lal, N., Trivedi, JK., Bahuguna, LM. (1982). Serum acetylcholinesterase activity in psychiatric patients. *Indian Journal of Psychiatry*, **24**, 291–4.

Tomitake, T., Shimotaka K., Katayama Y., Yoshikawa S. (2003). The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**,15304-15309.

Trang, A., & Khandhar, P. B. (2022). Physiology, Acetylcholinesterase. In StatPearls. *StatPearls Publishing*.

Ullas Kamath, S., Chaturvedi, A., Bhaskar Yerrapragada, D., Kundapura, N., Amin, N., & Devaramane, V. (2019). Increased Levels of Acetylcholinesterase, Paraoxonase 1, and Copper in Patients with Moderate Depression- a Preliminary Study. *Reports of biochemistry & molecular biology*, **7**, 174–180.

Universidad Estatal de Oregón. Inhibición de colinesterasa. En línea en: <http://extoxnet.orst.edu/tibs/cholines.htm>

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Ureta E. (2020). Detección de posibles sitios de unión a plaguicidas en las proteínas TBP y TRF1 de mosquitos transmisores de enfermedades. *Universidad Autónoma del Estado de Morelos Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas*, 14-16.

Vanessa, V. V., & Mah, S. H. (2021). Xanthone: Potential Acetylcholinesterase Inhibitor for Alzheimer's Disease Treatment. *Mini reviews in medicinal chemistry*, **21**, 2507–2529.

Vera SS., Zambrano DF., Méndez-Sánchez SC., Rodríguez-Sanabria F., Stashenko EE., Duque Luna JE. (2014). Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, **113**, 2647-2654.

Vesga, L., Duarte Y., Stashenko EE., Méndez-Sánchez SC. (2014). Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre el metabolismo energético mitocondrial. *Revista Colombiana de Química*, **43**, 10-17.

Wan, Hong. (2013). What ADME Tests Should Be Conducted for Preclinical Studies? *Admet & Dmpk*, **1**, 3.

Wang, W. M., and Jin, H. Z. (2020). Role of neutrophils in psoriasis. *Journal of Immunology Research*.

Watson, S. A., & McStay, G. P. (2020). Functions of Cytochrome c oxidase Assembly Factors. *International journal of molecular sciences*, **21**, 7254.

Weaver, S., C, Vasilakis N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution*, **9**, 523-40.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Wood, B. (2021). Acetylcholinesterase - Function & Location. Study.com. <https://study.com/learn/lesson/acetylcholinesterase-function-location.html#:~:text=The%20function%20of%20acetylcholinesterase%20is,the%20muscle%20cell%20is%20complete.>

World Mosquito Program. (2019). Mosquito *Aedes aegypti*. <http://www.eliminatedengue.com/colombia/Mosquito-aedes-aegypti>

Xia, Z.; Zhang, G.; Zhang, S.; Wang, Q.; Fu, Y.; Lu, H. (2021). Efficacy of Root Zone Temperature Increase in Root and Shoot Development and Hormone Changes in Different Maize Genotypes. *Agriculture*, **11**, 477.

Yan, M., Yin, W., Fang, X., Guo, J., & Shi, H. (2016). Characteristics of a water-forming NADH oxidase from *Methanobrevibacter smithii*, an archaeon in the human gut. *Bioscience reports*, **36**, e00410.

Yang SY. (2010). Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discovery Today*, **15**, 444–450.

Yelena Y. Glinka., Moussa B.H. Youdim. (1995). Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*, **292**, 329-332.

Youssefi, M. R., Tabari, M. A., Esfandiari, A., Kazemi, S., Moghadamnia, A. A., Sut, S., Dall'Acqua, S., Benelli, G., & Maggi, F. (2019). Efficacy of Two Monoterpenoids, Carvacrol and Thymol, and Their Combinations against Eggs and Larvae of the West Nile Vector *Culex pipiens*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **24**, 1867.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Aedes aegypti*

Yu, W., & MacKerell, A. D., Jr. (2017). Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **1520**, 85–106.

Zhang Li., Yu Linda, Chang-An Yu. (1998). Generation of Superoxide Anion by Succinate-Cytochrome c Reductase from Bovine Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 33972-33976.

Zoubiri, S., Baaliouamer, A. (2014). Potentiality of plants as source of insecticide principles. *Journal of Saudi Chemical Society*, **18**, 925-938.