

**Identificación de compuestos naturales con posible actividad repelente contra el vector del
Chagas *Rhodnius prolixus***

María Alejandra Ruiz Estupiñán

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

Stelia Carolina Méndez Sánchez Ph. D

Doctora en Ciencias Bioquímicas

Codirector

Luis Carlos Vesga Gamboa Ph. D

Doctor en Química

Asesor

Jonny Edward Duque Luna Ph. D

Doctor en Ciencias Biológicas con énfasis en Entomología Médica

María Carolina Velásquez Martínez, Ph.D

Doctora en Fisiología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2023

La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos tener perseverancia y sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado.

Marie curie

Dedicatoria:

A mis padres, porque este también es su sueño

Agradecimientos

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

A mi madre por sus madrugadas, ayudas y preocupación para siempre estar bien.

A mi pareja, Alex “michifusito” , por acompañarme en este proceso, siempre estar a disposición y regalarme su amor y comprensión.

A Jeimmy, por estar junto a mi durante todo este proceso, ayudarme y apoyarme a salir adelante.

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 la profesora Carolina por su dedicación y su amabilidad al momento de explicar las cosas.

A Gustavo y Edwin, por su paciencia y por regalarme todos los conocimientos durante estos años de estudio.

A mis amigas Alejandra y Saray por escucharme durante las noches de obstáculos de este proceso.

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.

A mí, por no rendirme, por no desfallecer, por cada día superarme cada vez más y darme la fuerza para poder salir adelante, por confiar en mí y siempre saber que soy capaz.

Contenido

	Pág.
Introducción	12
1. Marco de referencia y antecedentes	14
1.1 Rhodnius prolixus	14
1.2 Enfermedad de Chagas	16
1.4 Rhodnius prolixus y su relación con sustancias repelentes e insecticidas	17
1.5 Sistema olfativo en insectos	19
1.6 Proteínas odorantes	21
1.7 Modelo de homología y Alpha fold 2.	23
1.8 Cribado de compuestos asistido por técnicas computacionales.....	26
1.9 Acoplamiento molecular	27
1.10 Electroantenografía	29
2. Objetivos	31
2.1 Objetivo General.....	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. Capítulo 1. Análisis In silico de compuestos con posible actividad repelente usando como marco de referencia las proteínas odorantes 6-11-13-14-22-23 y el receptor Orco	32
3.1 Metodología de la fase In silico e vivo	32
3.2 Fase preliminar.....	33
3.3 Fase In Silico.....	33
3.3.1 Modelo de homología	33
3.3.2 Preparación de los ligandos y las proteínas	34
3.3.3 Docking molecular de los ligandos y Sitio de interacción.....	35
3.3.4 Visualización.....	36
3.4 Resultados	36
3.4.1 Proteína odorante 6	36
3.4.1.1 Resultados modelo de homología y docking molecular.	36
3.4.2 Proteína odorante 11	40

3.4.2.1 Resultados modelo de homología y docking molecular.	40
3.4.3 Resultados proteína odorante 13.....	41
3.4.3.1 Resultados modelo de homología y docking molecular.	41
3.4.4 Proteína odorante 14.....	43
3.4.4.1 Resultados Modelo de homología y docking molecular.....	43
3.4.5 Proteína odorante 22.....	46
3.4.5.1 Resultados modelo de homologia y docking molecular.	46
3.4.6 Resultados Proteína odorante 23.....	49
3.4.6.1 Resultados Modelo de homología y docking molecular.....	49
3.4.7 Receptor Orco.....	52
3.4.7.1 Resultados Modelo de Homología y resultados docking molecular.....	52
4. Análisis In vivo de compuestos con posible actividad repelente por medio de la técnica electroantenografía.....	57
4.1 Metodología.....	57
4.1.1 Material biológico.....	58
4.1.2 Preparación del montaje y registros electroantenográficos.....	59
4.1.3 Análisis estadísticos.....	61
4.2 Resultados solubilidad.....	62
4.3 Resultados Electroantenografía.....	63
5. Discusión de resultados.....	70
6. Conclusiones.....	72
7. Recomendaciones.....	72
Referencias Bibliográficas.....	74
Apéndices.....	88

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Compuestos con mejor energía de afinidad para la proteína 6.	38
Tabla 2. Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para la proteína 11.	41
Tabla 3. Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para la proteína 13	43
Tabla 4. Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para la proteína 14	44
Tabla 5. Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para la proteína 22	47
Tabla 6. Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para la proteína 23	51
Tabla 7. Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para el Co-receptor Orco	53
Tabla 8. Compuestos seleccionados para receptor Orco con los compuestos de referencia DEET e IR3535, valores de Docking score y Energía de afinidad (EA).....	54

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Principales especies de triatominos vectores de Trypanosoma cruzi en América.	15
Figura 2. Ciclo de vida del Rhodnius prolixus	15
Figura 3. Ciclo biológico del T. cruzi en el torrente sanguíneo.....	16
Figura 4. a) estructura química DEET. b) estructura química IR3535.	18
Figura 5. Receptores transmembrana, ORS, IRS, GRS	21
Figura 6. Representación del mecanismo de recepción de odorantes en insectos.	21
Figura 7. Mapa metodológico de la fase computacional del proyecto de investigación	33
Figura 8. A) Modelo de homología para la proteína odorante 6 realizado por AlphaFold22. B) Posible sitio drogable de la proteína.	37
Figura 9. Interacciones predichas en el sitio de alta afinidad por el Docking Molecular para la proteína odorante 6	39
Figura 10. A) Modelo de homología proteína 11 realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio activo de la proteína.	40
Figura 11. A) Modelo de homología de la proteína odorante 13 realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio de Union.	42
Figura 12. A) Modelo de homología de la proteína odorante 14 realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio activo de la proteína	44
Figura 13. Interacciones predichas en el sitio de alta afinidad por el Docking Molecular para la proteína odorante 14	46
Figura 14. A) Modelo de homología de la proteína odorante 22 realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio de Unión.	47
Figura 15. Interacciones Predichas en el sitio de alta afinidad por el Docking Molecular para la proteína odorante 22.	49
Figura 16. A)Modelo de homología de la proteína odorante 23 realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio de unión	50
Figura 17. Interacciones Predichas en el sitio de alta afinidad por el Docking Molecular para la proteína odorante 23.	52
Figura 18. A) Modelo de homología del Co- Receptor Orco realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio de unión	53

Figura 19. Interacciones Predichas en el sitio de alta afinidad por el Docking Molecular para el receptor Orco 56

Figura 20. Metodología Fase In vivo 58

Figura 21. Registro de señales electroantenoográficas expresado en a) milivoltios b) porcentaje.. 64

Figura 22. Señal electroantenoográfica de referencia y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar el compuesto acetona..... 64

Figura 23. Gráfico de datos de media con error estándar para el Acetato de geranilo b) Gráfica de media con error estándar para el cambio porcentual del acetato de geranilo. (*) indica diferencias significativas a un 5% ($P < 0.05$), (***) para designar diferencias significativas al 0,1% ($P < 0.001$) entre las señales EAG de amoniaco antes y después de aplicar la molécula ($P < 0,05$, prueba Mann- Whitney) 65

Figura 24 Señal electroantenoográfica de referencia y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar el compuesto Acetato de geranilo al 50%. 65

Figura 25. Registro de señales electroantenoográficas expresado en a) milivoltios b) porcentaje. (media con error estándar). (***) para designar diferencias significativas al 0,1% ($P < 0.001$) entre las señales EAG de amoniaco antes y después de aplicar la molécula ($P < 0,05$, prueba Mann- Whitney)..... 66

Figura 26. Señal electroantenoográfica de referencia y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar el compuesto farnesol al 50% 67

Figura 27. Registro de señales electroantenoográficas expresado en a) milivoltios b) porcentaje.(Media con error estándar) (***) para designar diferencias significativas al 0,1% ($P < 0.001$) entre las señales EAG de amoniaco antes y después de aplicar la molécula ($P < 0,05$, prueba T student) 68

Figura 28. Señal electroantenoográfica de referencia y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar el compuesto nerolidol al 50%. 68

Figura 29. Registro de señales electroantenoográficas expresado en a) milivoltios b) porcentaje. (Mean with SEM) (***) para designar diferencias significativas al 0,1% ($P < 0.001$) ($P < 0,05$, prueba Mann- Whitney)..... 69

Figura 30. Señal electroantenoográfica de referencia y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar el compuesto IR3535 al 50%..... 69

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Base de datos de 600 compuestos con actividad insecticida, ovicida, larvicida, repelentes, etc.....	88
Apéndice B. Valores obtenidos en microvoltios y en variación porcentual en la técnica de electroantenografía correspondientes a amoniaco pre y post en presencia del control negativo acetona (100%v/v) y el control positivo IR3535 (90% v/v).....	101
Apéndice C. Valores obtenidos en microvoltios y en variación porcentual en la técnica de electroantenografía correspondientes a amoniaco pre y post en presencia de los compuestos farnesol, nerolidol y acetato de geranilo a concentraciones del 50% v/v	102

Resumen

Título: Identificación de compuestos naturales con posible actividad repelente contra el vector del Chagas *Rhodnius prolixus*

Autor: Maria Alejandra Ruiz Estupiñan

Palabras Clave: Proteínas odorantes, modelamiento homología, acoplamiento molecular, electroantenografía, *Rhodnius prolixus*, repelente

Descripción:

El mal de Chagas es transmitido por insectos hematófagos denominados triatomíneos, los cuales una vez infectados transmiten a través de sus heces el *Trypanosoma cruzi*, principal causa de la enfermedad. La prevención a la picadura del insecto se ha manejado por medio del uso de repelentes como el DEET y el IR3535. Debido a la limitada cantidad de compuestos con actividad repelente sobre este vector surge necesidad de buscar estrategias que permitan evitar el acercamiento del insecto y evitar su picadura, por esta razón el objetivo de este proyecto consistió en identificar compuestos naturales con posible actividad repelente contra el vector *Rhodnius prolixus*, usando técnicas de docking molecular y electroantenografía. Mediante técnicas computacionales se modelaron las proteínas odorantes 6,11,13,14,22,23 y el receptor Orco para determinar interacciones con compuestos naturales. Con los compuestos que se evidenció alta afinidad por alguna de las proteínas descritas, se realizaron pruebas de electroantenograma. Para realizar los registros electroantenoográficos, los insectos fueron puestos en ayuno de 30 días, a oscuridad total y finalmente fueron conectados con electrodos para analizar señales eléctricas. Dentro de este proceso se encontró que los compuestos acetato de geranilo, farnesol, nerolidol e IR3535 disminuyeron en un 50% las respuestas electrofisiológicas al amoníaco, es decir, produjeron una disminución de la capacidad olfativa y posible alteración al sistema olfativo. Según los resultados de las pruebas *in silico*, las interacciones presentadas por el acetato de geranilo, farnesol, nerolidol están relacionadas con acoplamientos de tipo puente de hidrógeno, $\pi - \pi$, o $\pi - \text{catión}$ con los mismos aminoácidos que interaccionan con los compuestos de referencia DEET e IR3535. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el screening virtual y en las pruebas de electroantenografía, se proponen como posibles repelentes contra *R. prolixus*, los compuestos acetato de geranilo, farnesol y nerolidol, dicha actividad repelente se evaluará experimentalmente en trabajos futuros en el grupo de investigación CINTROP.

Abstract

Title: Identification of natural compounds with potential repellent activity against the Chagas vector *Rhodnius prolixus*

Author: Maria Alejandra Ruiz Estupiñan

Key words: Odorant binding protein, homology modeling, molecular docking, electroantennography , *Rhodnius prolixus*, repellent.

Description:

Chagas disease is transmitted by hematophagous insects called triatomines, which once infected transmit *Trypanosoma cruzi*, the main cause of the disease, through their feces. Prevention of insect bites has been managed through the use of repellents such as DEET and IR3535. Due to the limited amount of compounds with repellent activity against this vector, there is a need to search for strategies to avoid the insect's approach and prevent its bite. For this reason, the objective of this project was to identify natural compounds with possible repellent activity against the vector *Rhodnius prolixus*, using molecular docking and electroantennography techniques. Using computational techniques, odorant proteins 6,11,13,14,22,23 and the Orco receptor were modeled to determine interactions with natural compounds. Electroantennogram tests were carried out with the compounds that showed a high affinity for any of the proteins described. To carry out the electroantennographic recordings, the insects were fasted for 30 days, placed in total darkness and finally connected to electrodes to analyze electrical signals. Within this process it was found that the compounds geranyl acetate, farnesol, nerolidol and IR3535 decreased the electrophysiological responses to ammonia by 50%, they produced a decrease in the olfactory capacity and possible alteration of the olfactory system. According to the results of the *in silico* tests, the interactions presented by geranyl acetate, farnesol, nerolidol are related to hydrogen bridge, π - π , or π -cation type couplings with the same amino acids that interact with the reference compounds DEET and IR3535. Taking into account the results obtained in the virtual screening and electroantennography tests, the compounds geranyl acetate, farnesol and nerolidol are proposed as possible repellents against *R. prolixus*, such repellent activity will be evaluated experimentally in future works in the CINTROP research group.

Introducción

Se registra que alrededor del mundo hay entre 6 y 7 millones de personas con la enfermedad de Chagas (Organización Mundial de la Salud, 2022), la cual es transmitida por los insectos hematófagos triatominos, entre los cuales el insecto *Rhodnius prolixus* es uno de sus principales vectores, el cual al defecar expone al huésped al contacto con el parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad (Álvarez & Fleiz, 2017). El contagio del insecto con el parásito se puede ocasionar de varias formas. La más común es cuando un insecto triatomino consume sangre de un huésped infectado con *T. cruzi* y lo dispersa en la hematofagia-defecación a los hospederos incluyendo humanos. Otra forma de transmisión es cuando un hospedero contagiado como por ejemplo una zarigüeya defeca sobre alimentos contaminandolos con el parásito y un individuo susceptible los consume. También es posible la transmisión de esta enfermedad por medio del trasplante de órganos y durante la gestación (Ministerio de Salud y Protección Social, 2020).

Debido a que uno de los mecanismos de infección de esta enfermedad es la transmisión vectorial, ha tomado importancia plantear diferentes alternativas de protección contra la picada del insecto vector y contrarrestar el impacto que se genera en la salud pública. En consecuencia, durante años las herramientas utilizadas ya sea para prevenir la picada o ejercer un control poblacional de vectores han consistido en el uso de toldillos, insecticidas, el uso de repelentes sintéticos y naturales (OMS, 2022). Sin embargo, un estudio realizado en 2015 presentó la resistencia que la especie triatominae tiene ante algunos insecticidas, estimulando la búsqueda de

alternativas viables y de bajo costo, que permitan la prevención de la picadura del insecto plaga (Pessoa, 2015).

Considerando la información anterior, surge la necesidad de innovar en la búsqueda de compuestos que impidan el contacto entre el huésped y el vector. Por lo tanto, el objetivo principal de esta investigación fue identificar compuestos con potencial actividad repelente contra *Rhodnius prolixus*. Para alcanzar las metas propuestas, este trabajo se dividió en dos fases, la primera consistió en la aplicación de técnicas computacionales (*in silico*) en donde se creó una base de datos con compuestos reportados con actividad insecticida, acaricida, repelente inclusive la ovicida para diferentes insectos, a su vez, una búsqueda de las diferentes proteínas odorantes y receptores que participan en el sistema olfativo del *R. prolixus*. Seguido de esto se realizó un modelado de homología y el screening virtual en donde por medio de los valores de acoplamiento, visualización de interacciones y propiedades farmacológicas se determinaron 5 compuestos para su posterior estudio *In vivo* mediante validación electroantenografía. Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de la respuesta electroantenográfica de los compuestos seleccionados anteriormente en la fase inicial con el fin de determinar si estos generan alteraciones en el sistema olfativo del insecto y así poderlo relacionar con cambios del receptor odorante. Para llevar a cabo la identificación de compuestos naturales con posible actividad repelente ante el *R.prolixus*, se presenta en este proyecto una visualización general de la problemática y aspectos teóricos que envuelven el estudio y a su vez la metodología implementada a lo largo de esta investigación.

1. Marco de referencia y antecedentes

1.1 *Rhodnius prolixus*

Este insecto pertenece a la familia Reduviidae del orden Hemiptera y subfamilia Triatominae, es uno de los principales vectores de la enfermedad de Chagas. Dentro de la subfamilia Triatominae se encuentran los principales vectores: *Triatoma Infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* (Figura 1) los cuales han sido denominados como responsables de la transmisión vectorial en América latina, siendo el *R. prolixus* el responsable de la enfermedad de Chagas en la parte norte de América del Sur (Venezuela, Colombia) (Dujardin, Schofield, & Panzera, 2002).

Taxonómicamente son insectos con abdomen amplio, coloración castaño claro con iguales y su tamaño es de aproximadamente entre 5 a 22 mm. Además, posee una probóscide dividida en 3 partes, la cual en su estado de reposo se encuentra ubicada en la parte anterior del tórax. El triatomino, tiene 5 estadios ninfales denominados NI-NII-NIII-NIV-NV (Figura 2). Estos estadios forman el ciclo de vida, el cual se compone de un promedio de 117,7 días que comprenden todos los cambios metamórficos desde el cambio de huevo a adulto. Inicialmente el cambio de huevo a N1 tarda entre un promedio de 12-16 días, seguidamente ocurre un cambio de estadio entre NI-NII el cual se torna entre 10-23 días. Luego el cambio entre NII-NV pasando por sus estados intermedios toma un rango entre mínimo 28-117 días en donde su característica principal es su aumento de tamaño (Aldana et. al., 2000). Por último, un cambio morfológico que ocurre entre el estadio NV y adulto toma aproximadamente entre 23-50 días en donde en este último estadio se

produce la aparición de las alas (Arévalo et. al., 2007) . Así mismo, estos insectos son terrestres y ocupan un hábitat en conjunto con los adultos. Su alimentación se limita a sangre de aves, mamíferos, reptiles y tienen actividad nocturna (Molina et. al., 2000).

Figura 1.

Principales especies de triatominos vectores de Trypanosoma cruzi en América.

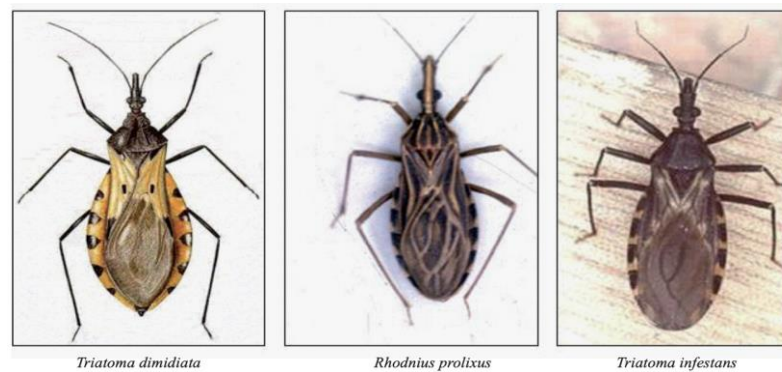


Figura 2.

Ciclo de vida del Rhodnius prolixus



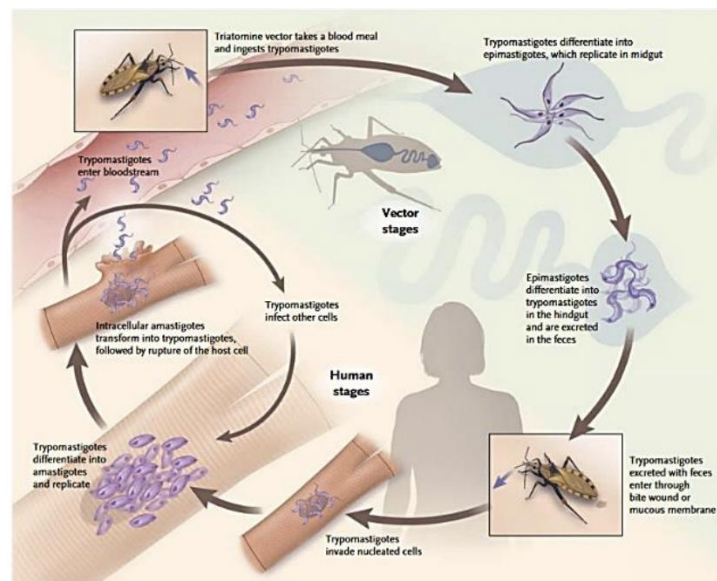
Nota. Tomado de: Escobar, (2022). Identificación de la actividad insecticida y/o repelente de xenobióticos mediante bioensayos y respuestas electroantenoográficas en *Rhodnius prolixus* [Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander]. Repositorio institucional- UIS

1.2 Enfermedad de Chagas

Hace más de 100 años se determinó que esta enfermedad es producida por *Trypanosoma cruzi*, en donde su ciclo de vida de infección se divide en 4 etapas (Figura 3), inicialmente el triatomino se alimenta de sangre infectada, dando acceso al parásito a su sistema, una vez ahí, el tripanosoma se ubica en el intestino en donde parte de su forma tripomastigote y termina el proceso en su forma tripomastigote metacíclico. Dentro del intestino el tripomastigote adquiere su forma epimastigote y amastigote, en donde el tripomastigote cíclico se transporta por medio de las heces al ambiente convirtiéndose en infectiva para hombres y animales (Cevallos & Hernández, s.f.).

Figura 3.

Ciclo biológico del T. cruzi en el torrente sanguíneo.



Nota. Tomado de: (Bermúdez Mejía, 2016)

Una vez *T. cruzi* entra al sistema del hospedero comienza su periodo infeccioso el cual se divide en dos fases: una fase aguda en donde suele presentarse en menos del 50% de los infectados

una lesión cutánea. Además, esas personas pueden presentar sintomatología que se puede confundir con un resfriado, síntomas tales como la fiebre, dolor de cabeza, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar y dolor abdominal o de pecho (Organización Mundial de la Salud, 2023). Por otro lado, esta enfermedad presenta una fase crónica en donde el 10 al 40% de los infectados presentan lesiones en varios órganos, dentro de estos sólo el 30-40% tienen o desarrollan cardiomiopatía, afectaciones a nivel gastrointestinal o ambos (Lescure, et. al., 2010; Coura, et. al. 2002).

Uno de los mecanismo implementado en manejo de los insectos vectores, es el uso de repelentes e insecticidas para disminuir el acercamiento al huésped y disminuir su población. Por tal motivo, a continuación se establecerán las diferentes estrategias implementadas en el uso de repelentes naturales, aceites esenciales, repelentes sintéticos e insecticidas contra *R. prolixus*.

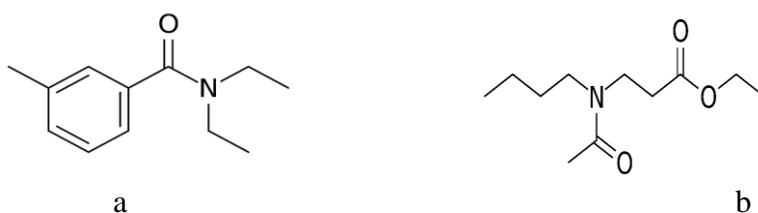
1.4 *Rhodnius prolixus* y su relación con sustancias repelentes e insecticidas

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) como la malaria, el dengue, la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, ejercen una enorme carga de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, afectando principalmente a personas de área rural y de bajos recursos económicos (Wilson et. al., 2020). Para disminuir el contagio con Chagas se han implementado diferentes métodos de protección contra la picadura del insecto, tales como el uso de toldillos, repelentes e insecticidas (OMS, 2022). El uso de repelente ocasiona que un insecto realice movimientos orientados alejándose de su fuente, en donde, el resultado esperado es interrumpir el comportamiento de búsqueda de huéspedes (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, 2010), a diferencia que el uso de insecticidas provoca la mortalidad de las poblaciones

insecto, en este método participan compuestos como organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Badii & Garza Almanza, 2007). Para el caso de repelentes de origen sintético, durante décadas se ha utilizado el NN-dietil-3-metilbenzamida, más conocido como DEET (Figura 4 a). Sin embargo, se ha demostrado que para obtener un efecto repelente en los vectores de Chagas la dosis del ingrediente activo debe ser mayores al 90% (Alzogaray , 2016; Franca et. al., 2018; Zermoglio et. al. 2015). Por otro lado, el IR3535 (Figura 4.b) aunque menos efectivo en el tiempo de protección, resulta menos tóxico. La principal desventaja de IR3535 es que puede llegar a causar irritabilidad ocular (Alzogaray, 2016; Sfara et. al., 2011). Por lo expuesto anteriormente sobre los repelentes comerciales de síntesis industrial, se han explorado otro tipo de repelentes de fuentes naturales a base de aceites esenciales extraídos de plantas, con el objetivo de encontrar alternativas que logren prevenir el acercamiento al huésped y a su vez la picadura del insecto.

Figura 4.

a) estructura química DEET. b) estructura química IR3535.



El uso de Aceites Esenciales (AE) para la prevención de la picadura del insecto triatomino se ha estudiado con el fin de obtener nuevas moléculas y poder trabajar con ellos como ingredientes para formular repelentes. De acuerdo con esto, un estudio evaluó la repelencia de los extractos de *Annona muricata*, *Melia azedarach*, *Ricinus communis* en el individuo *Rhodnius prolixus*, en

donde el extracto de *M. azedarach* a una concentración de 1%p/p alcanzó una repelencia del 54.69% en 2h . En el extracto de *A. muricata* se logró una repelencia de 55,33% de la población de estudio a una concentración de 1,5 % p/p. Por último el *Ricinus communis* superó el 1,5%p/p para obtener valores de repelencia estadísticamente significativos para un tiempo de exposición de 2h (Parra-Henao, Garcia Pajón, & Cotes Torres, 2007).

Para el diseño de repelentes, ha sido de gran importancia el conocer que el insecto se acerca a su huésped por la detección de compuestos volátiles que estos perciben en su sistema olfativo, es por eso que en el siguiente apartado se destacarán los conceptos relevantes del sistema olfativo del insecto.

1.5 Sistema olfativo en insectos

En los insectos, el sistema olfativo se ha convertido en una herramienta crucial para la detección de moléculas odorantes, permitiendo a triatominos y otros insectos orientar su comportamiento, buscar alimento, garantizar su supervivencia, llevar a cabo la oviposición y encontrar refugio (Barrozo et. al., 2017). En los triatominos, se perciben varias señales sensoriales para la ubicación del huésped, incluidos los volátiles del huésped como NH_3 , ácido isobutírico y nonanal, que son detectados por sensilias olfatorias presentes en las antenas del insecto (Reisenman, 2014).

En la antena de *R. prolixus* se encuentran receptores que se pueden clasificar en tres categorías: mecanorreceptores, olfativos y gustativos (Oliveira, 2017) . Específicamente en las sensilias se encuentran las Neuronas Receptoras Olfativas (ORNs, Olfactory receptor neurons, por sus siglas en inglés) (Figura 5) los cuales se dividen en tres grandes familias de proteínas

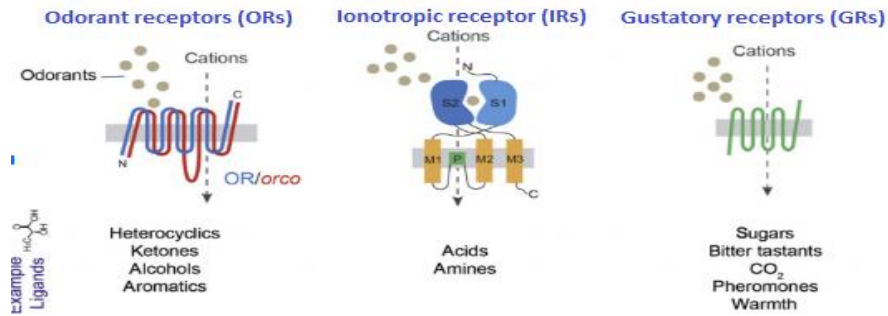
transmembrana: Receptores de Odorantes (ORs, Odorant receptors en sus siglas en inglés) (palpos maxilares y antenas), Receptores Ionotrópicos (IRs, Ionotropic receptors en sus siglas en inglés) (palpos maxilares y antenas) y Receptores Gustativos (GRs, Gustatory receptors en sus siglas en inglés) (palpos maxilares y probóscide) , además se encuentran las proteínas de transporte como las proteínas de unión a odorantes, estas proteínas se encuentran en la linfa sensiliar, encargadas del transporte de moléculas de olor (OBP, Odorant binding protein por sus siglas en inglés) (Chařka, 1980; Wicher, 2021).

La recepción de moléculas de cada proteína odorante está ligada al tipo de receptor, en el caso de los ORs, son aquellos capaces de captar una amplia variedad de compuestos volátiles naturales que segrega el cuerpo humano, animales e insectos, los cuales son detectados por el insecto para la búsqueda de su hospedero (Carey et. al. 2010; Kauup, 2010). En el caso de los IRs, son proteínas específicas a la recepción de moléculas odorantes que contienen aminas, ácidos carboxílicos (Jason Pitts, Derryberry, Zhang, & Zwiebel, 2017 ; Raji, y otros, 2019). Por último tenemos que las GRs son capaces de percibir el dióxido de carbono y componentes sanguíneos (Guo & Smith, 2017; Sparks et. al. 2018; Pask & Ray, 2016).

El sistema olfativo inicia captando la molécula odorante (Figura 6), en donde en las sensilias se encuentran con la proteína odorante, que es la encargada de realizar el transporte por la linfa sensiliar en donde se transporta a las neuronas y permite la interacción con los receptores encargados de activar los canales iónicos para el paso de los iones y generar un cambio de potencial (Portilla-Pulido et. al. 2020).

Figura 5.

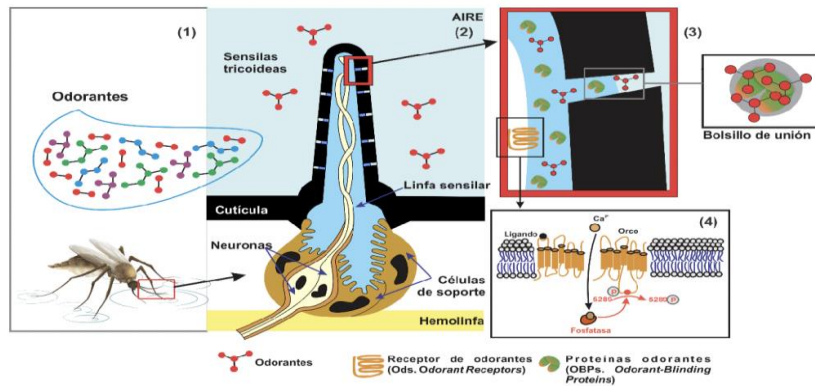
Receptores transmembrana, ORS, IRS, GRS



Nota. Tomado de: (Pask & Ray, 2016)

Figura 6.

Representación del mecanismo de recepción de odorantes en insectos.



Nota. Tomado de: (Portilla-Pulido, Castillo-Morales, Barón-Rodríguez, Duque, & Mendez-Sanchez, 2020)

1.6 Proteínas odorantes

La antena es el órgano olfativo de los triatomíneos, la cual les sirve de guía para la búsqueda de alimento, refugio, reproducción y la oviposición. Para que todo esto ocurra se requieren de proteínas involucradas en la selectividad y sensibilidad del sistema olfativo, como las proteínas de unión a olores (OBP, por sus siglas en inglés) y los receptores de olores (OR, por sus siglas en

inglés). Estas primeras están involucradas en la recepción de olores donde se unen, solubilizan a la molécula odorante y entregan a los OR (Xu, Cornel, & Leal, 2010).

Por otro lado, las OBP son proteínas posee estructuralmente tres puentes disulfuro que están formados entre seis cisteínas, a su vez, estas proteínas presentan dominios de alfa hélice lo cual define la unión hidrofóbica (Portilla-Pulido et. al., 2020). Estas proteínas se encuentran ubicadas en la linfa sensiliar, en donde son las responsables de poder solubilizar moléculas hidrofóbicas que penetran el sistema olfativo, uniéndose y transportando dichas moléculas hacia el receptor (Domínguez 2018). Estas moléculas deben tener un peso molecular entre 200 y 400 Dalton para formar parte del complejo olfatorio OBP y receptor (Fuentes et al., 2011). Una vez que interactúan con el receptor olfatorio (OR), se desencadena una cadena de señalización química que abre los canales iónicos para permitir el transporte de iones y transmitir una señal eléctrica. Esta señal se envía al cerebro y ayuda en la discriminación de olores (Fuentes et al., 2011; Steinbrecht, 2006).

Las funciones de las OBP en la identificación de sustancias olorosas todavía no han sido exploradas. Sin embargo, se hipotetiza que las proteínas odorantes podrían influir en el comportamiento del insecto, dificultando su capacidad para detectar amoníaco. Esto podría ser aprovechado para diseñar formulaciones repelentes y evitar la picadura del insecto vector (Oliveira et. al., 2018).

Una de las principales razones detrás de la falta de conocimiento en relación a las estructuras terciarias de las proteínas radica en la complejidad que conlleva el estudio de la interacción entre las proteínas y las sustancias activas. Este proceso requiere una gran inversión de tiempo y esfuerzo. Por lo tanto, enfoques computacionales son usados para abordar esta deficiencia a gran escala con un altó número de moléculas analizadas, ya que su implementación reduce

significativamente tanto el tiempo como los costos involucrados. Un ejemplo de estos métodos es el modelado por homología, el cual permite predecir la estructura tridimensional de una proteína encargada de la detección de aromas mediante el uso de técnicas de inteligencia artificial. Esto facilita la comprensión de cómo la proteína interactúa con una molécula específica de interés, que podría tener el potencial de ser utilizada como ingrediente activo en repelentes naturales.

En este sentido, a continuación, se describe de manera detallada las principales técnicas computacionales que se emplearán para cumplir los objetivos de esta investigación

1.7 Modelo de homología y Alpha fold 2.

El avance en el estudio de las proteínas ha experimentado una revolución con la introducción de modelos de homología y tecnologías como AlphaFold2 2. Estos enfoques han facilitado la comprensión de la estructura y función de las proteínas a nivel molecular. El modelo de homología, basado en la idea de que proteínas similares comparten una historia evolutiva común, utiliza datos de proteínas previamente caracterizadas para predecir la estructura de proteínas desconocidas. Por otro lado, AlphaFold2 2, respaldado por técnicas de aprendizaje profundo, aborda la predicción de estructuras proteicas de manera innovadora al predecir los pliegues tridimensionales con una precisión asombrosa (Jumper, 2021).

A la hora de estudiar una proteína, es primordial conocer su funcionamiento, sin embargo, debido a que en las bases de datos no se encuentran caracterizadas todas las proteínas presentes en los organismos, se presenta la herramienta útil del modelo de homología, en donde por medio de la relación de su secuencia aminoacídica y una estructura desconocida, produce y diseña un modelo tridimensional de la proteína de estudio (Robinson, Afzal, & Leader, 2014).

Debido a que la función de las proteínas depende de la estructura nativa, la cual a su vez depende de su estructura primaria dada por la composición de aminoácidos (Bino & Sali, 2003). Este principio es el que toma el modelado de proteína donde se parte de una proteína completamente caracterizada, la cual se alinea con la secuencia de la proteína de interés, para predecir su posible estructura terciaria (Kuhlman & Bradley, 2019; Waterhouse et. al., 2018).

De este modo, el proceso de modelado comparativo comienza con la exploración de la base de datos BLAST en busca de un molde adecuado. A continuación, se eligen las secuencias que muestran una mayor semejanza con la secuencia de aminoácidos de la proteína de enfoque. Posteriormente se realiza la alineación de los residuos aminoacídicos de las proteínas, teniendo como meta que estas tengan una similitud mayor al 30% ya que esto determina la ausencia de vacíos dentro del alineamiento (Zheg, 2022). Para el paso siguiente, se efectúa la construcción de la estructura tridimensional, en donde se realiza por medio de las coincidencias de los segmentos y en posiciones aproximada de los átomos conservados de las plantillas seleccionadas (Fiser & Sali, 2003), esto se produce para poder ejecutar posteriores estudios que evalúen las interacciones proteína-ligando en los sitios activos y las interacciones proteína-proteína (Bino & Sali, 2003).

Por último, se hace una evaluación del modelo para calcular la identidad de la secuencia objetivo-témplate. Si esta identidad cae por debajo del 30%, la fiabilidad de la secuencia como medida de la precisión esperada del modelo disminuye significativamente (Fiser & Sali, 2003).

Para abordar la limitación de disponibilidad de estructuras tridimensionales en muchas proteínas, se han introducido enfoques computacionales avanzados capaces de predecir con alta precisión estructuras atómicas, llegando a compararse con las técnicas experimentales convencionales (Tunyasuvunakool, Adler, Wu, & et al, 2021). Un caso ejemplar es el Alpha Fold 2, que emplea redes neuronales de aprendizaje profundo para generar modelos tridimensionales

basados en plantillas cristalinas homólogas. Este software ha sido entrenado utilizando múltiples estructuras 3D de proteínas previamente establecidas experimentalmente y sus respectivas secuencias (Jumper, Evans, & Pritzel, 2021).

Cuando se trata de proteínas cuya estructura tridimensional es desconocida pero cuya secuencia es conocida, Alpha Fold lleva a cabo una exploración en bases de datos en busca de secuencias relacionadas. Luego, modela las posiciones 3D de los aminoácidos calculando las distancias entre residuos. Su método de generación de la estructura tridimensional predicha implica la combinación de plantillas y el alineamiento de secuencias que comparten más del 30% de identidad (David et. al., 2022). Las estructuras producidas por Alpha Fold exhiben alta precisión, con un valor de RMSD alrededor de 0.96, en comparación con otros enfoques que alcanzan 2.80 (Jumper, Evans, & Pritzel, 2021).

Alpha Fold ha sido empleado en investigaciones que abordan la predicción de estructuras tridimensionales de proteínas olfativas en insectos. Por ejemplo, Renthal y Chang (2022) identificaron sitios de unión para ligandos en las proteínas del sistema olfativo de *Drosophila melanogaster*, facilitando el análisis de la interacción molecular entre sustratos y proteínas.

En el campo de la producción de repelentes e insecticidas, el modelamiento tridimensional de estructuras de dianas de insectos no investigadas experimentalmente puede ayudar a comprender mejor la información estructural, identificar posibles sitios de unión y destacar el sitio de unión más probable entre las moléculas repelentes e insecticidas (Luminita, Funar-Timofei., & Borota, 2022).

Una vez construido el modelo de homología, se realiza el acoplamiento molecular para evaluar las interacciones específicas entre la proteína modelada y las sustancias desconocidas, con el objetivo de formar un complejo estable.

1.8 Cribado de compuestos asistido por técnicas computacionales

Los altos costos de prueba, control y producción de productos químicos capaces de controlar el acercamiento de un insecto vector o su eliminación son elevados debido a las etapas investigativas que requieren, además, el tiempo final para producción es de aproximadamente 15 años en el mejor de los casos (Myers & Baker, 2001; Schaduangrat et. al., 2020; Baig et. al., 2018). Debido a esto, se han implementado métodos que facilitan la selección y estudio previo de un compuesto para disminuir el costo y tiempo de este proceso, en donde se busca eliminar la compra o prueba de productos químicos que posteriormente no presenten la actividad deseada. Estos métodos son desarrollados por software los cuales emplean estrategias químico-moleculares y desarrollar alternativas en la elaboración de productos químicos a partir de un trabajo conformado por diversas disciplinas científicas como el acoplamiento molecular, modelado molecular, cribado virtual entre otros (Prieto-Martínez et. al., 2019). Uno de los métodos usados es el CADD (computer aided drug design, por sus siglas en inglés) el cual minimiza los esfuerzos de pruebas sintéticas y biológicas centrándose en los compuestos prometedores debido a los diferentes parámetros como, propiedades fisicoquímicas, interacciones, conformaciones, entre otras. (Anwar, Kumar, & Khan, 2021). El CADD interpreta y guía experimentos para facilitar el proceso de fármacos, basado en estructuras (SBDD) y el diseño basado en ligandos (LBDD). Este último se centran en ligandos conocidos para un objetivo de establecer relación entre sus propiedades fisicoquímicas y actividad antibiótica, esta información puede ser de vital ayuda para poder optimizar o diseñar nuevos medicamentos con actividad mejorada (Yu & MacKerell Jr., 2017).

El método LBDD se emplea cuando el diseño molecular no se enfoca en el objetivo biológico (target), sino en las moléculas que se unen a este (Aparoy, Kumar Reddy, & Reddanna,

2012). Por otro lado el método SBDD se basa en trabajar bajo el conocimiento de una diana farmacológica, en este caso la proteína y su estructura tridimensional, en caso de no obtener la diana 3D, se realiza el modelado de homología, técnica que está dentro del SBDD, con el fin de poder predecir su estructura y poder identificar ligandos que puedan unirse al sitio activo con alta afinidad y selectividad (Shanmugam & Jeon, 2017). El SBDD es un método *in silico* que ayuda a identificar posibles compuestos entre cientos de miles que presenten relación con el objetivo de la estructura conocida mediante estudios de acoplamiento molecular (Tomar et. al., 2019), técnica que se utilizó en la investigación con la intención de realizar un cribado virtual de los diferentes compuestos con actividad biológica en insectos.

1.9 Acoplamiento molecular

El descubrimiento de fármacos en etapa temprana, favorece el diseño y elaboración de estos disminuyendo su costo y tiempo de producción, es aquí donde el acoplamiento molecular juega un rol importante, ya que este permite descubrir fármacos en etapas previas por medio de la detección basada en estructura (VS) y la optimización (Yang, Chen, & Zhang, 2022). Este método permite analizar los modos de unión predominantes de un ligando con una diana farmacología objetivo permitiendo caracterizar el comportamiento de estas (Morris & Lim-Wilby, 2008; Torres et. al., 2019). Este consiste de dos pasos: predicción de la posición y orientación dentro de la interacción con el target y la evaluación de la afinidad de unión por medio de algoritmos de muestreo (Meng et. al. 2011).

El concepto de evaluación de puntuación es un enfoque empleado en el ámbito del acoplamiento molecular con el propósito de analizar la afinidad de enlace y mejorar los resultados

obtenidos (Dias & De Azevedo, 2008). Su función principal reside en discernir entre modos de unión que presentan baja energía, comparándolos con otras conformaciones. Asimismo, esta técnica categoriza los ligandos conforme a su energía de enlace y anticipa constantes de afinidad para la clasificación de compuestos (Bravo, 2020). Existen diversas variantes de funciones de puntuación, como las basadas en campos de fuerza, métodos empíricos y enfoques basados en conocimiento (Meng et. al., 2011). Las funciones de puntuación fundadas en campos de fuerza cuantifican la suma de fuerzas intermoleculares, como interacciones electrostáticas y las fuerzas de Van der Waals (Ballón, Guadalupe, & Grados, 2019). En el dominio del Diseño Asistido por Computadora, herramientas como AutoDock y Glide encuentran aplicación. AutoDock emplea una función de puntuación (Ecuación 1) basada en un campo de fuerza ampliado (Huey et. al., 2007), la cual calcula la energía atómica por pares, considerando contribuciones de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, energía de Coulomb y desolvatación. (Meng et. al., 2011).

Ecuación 1.

Campo de fuerza incorporado por AutoDock

$$V = W_{vdw} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{bond} \sum_{ij} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{ij} \left(\frac{q_i}{E(r_{ij})(r_{ij})} \right) + W_{solv} (S_i V_j + S_j V_i) e^{\left(\frac{-r_{ij}^{12}}{2\sigma^2} \right)}$$

Las funciones empíricas se han desarrollado para proporcionar datos precisos sobre la afinidad de unión. Estas funciones se basan en relacionar la energía libre de enlace con interacciones específicas, como las fuerzas de Van der Waals, los enlaces de hidrógeno y la entropía (Bravo, 2020). Además de predecir la afinidad de unión, estas funciones también pueden predecir la posición del ligando y realizar un cribado virtual con un bajo costo computacional (Ballón et al., 2019). Una función empírica destacada es el GlideScore (Ecuación 2), que se concentra en optimizar la diferencia entre compuestos con alta afinidad de enlace y aquellos con

capacidad de unión limitada o nula. Para lograrlo, se considera la región hidrofóbica y la expulsión de moléculas de agua por parte del ligando desde zonas densamente pobladas de átomos. El propósito es establecer uno o más enlaces de hidrógeno entre la proteína y el ligando (Kadukova & Grudin, 2017; Friesner, et al., 2006).

Ecuación 2.

Función puntuación empírica Glide

$$\Delta G_{bind} = C_o + C_{tipo} \sum f(r_{ir}) + C_{hbond} \sum g(\Delta r)h(\Delta \sigma) + C_{metal} \sum f(r_{im}) + C_{rotb}H_{rotb}$$

Glide, permite calcular una puntuación completa para las distancias de enlace dentro y fuera de los límites, es por eso que esta herramienta demuestra ser fundamental para poder estimar las puntuaciones de acoplamiento proteína-ligando, puesto que tiene en cuenta las interacciones involucradas y propiedades termodinámicas (Eldridge et. al., 1997).

Una vez finalizado el screening virtual, se realizó la selección de los compuestos más favorables encontrados por medio de la interacción proteína-ligando, y posteriormente se realizó el estudio experimental por medio de la técnica de electroantenografía.

1.10 Electroantenografía

La electroantenografía (EAG) es una técnica electrofisiológica utilizada para medir las respuestas eléctricas de los receptores olfativos en insectos cuando son estimulados por compuestos odorantes. Esta técnica permite identificar qué tan detectado es un compuesto odorante por el insecto, mediante la visualización gráfica del voltaje en el sistema. Durante la EAG, se registra el flujo de iones que ocurre debido a la estimulación de los receptores olfativos por moléculas volátiles. Esta información puede ser muy útil para comprender la respuesta olfativa de

los insectos y su relación con los compuestos químicos presentes en su entorno (Jacob, 2018). Sin embargo, hay factores al momento de la medición de las señales que podrían afectar la amplitud de la respuesta, como es el caso de la posición del electrodo de registro, causando que no se permita obtener la respuesta de las ORN a diferentes sustancias químicas (Jacob, 2018). Una pequeña o gran respuesta de EAG no puede interpretarse como una mala o buena capacidad del insecto para detectar una sustancia química, sin embargo, los compuestos que provocan una respuesta significativa para requieren de pruebas in vivo para la determinación del carácter atrayente, repelente u otro, del compuesto de interés (Jacob, 2018; Beck, Light, & Gee, 2012).

La actividad neuronal que proporcionan las ORN son captadas por la señal de electroantenografía, técnica que se basa en registrar potenciales de campo a través de la antena y sensilia, además, también logra detectar las señales de diferentes clases de receptores quimiosensoriales. Esta señal se determina, no sólo teniendo en cuenta la respuestas del ORN individual, sino que también de la densidad que se tengan de las neuronas en las proximidades del electrodo posicionado en la antena (Jacob, 2018). Esta técnica puede ayudar a reducir la cantidad de volátiles analizados para identificar bioactivos comprometedores, sin embargo, como se mencionó anteriormente, esta técnica solo proporciona información sobre la activación de los receptores, más no presenta información del tipo de comportamiento de los insectos al estar expuestos a compuestos, ya que podría tratarse de un repelente, atrayente u otro tipo de respuesta (Beck, Light, & Gee, 2012).

Una vez presentados los aspectos teóricos que permitieron llevar a cabo esta investigación y que proporcionaron base conceptual y guía para el diseño metodológico, se decidió plantear el alcance de este proyecto, lo cual que se verá reflejado en el objetivo general y específico, los cuales

en conjunto, dieron como resultado la identificación de compuestos con posible actividad frente al *Rhodnius prolixus*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Identificar compuestos con posible actividad repelente en *Rhodnius prolixus* mediante la interacción con proteínas odorantes como principal mecanismo de discriminación.

2.2 Objetivos específicos

Identificar compuestos que interactúen con proteínas odorantes por medio de técnicas *in silico*.

Evaluar la respuesta electrofisiológica de aquellos compuestos que presenten interacciones proteína-ligando favorables por medio de la técnica de electroantenografía.

Relacionar la interacción proteína-ligando con la señal de electroantenografía con el posible efecto repelente en la especie *Rhodnius prolixus*.

3. Capítulo 1. Análisis *In silico* de compuestos con posible actividad repelente usando como marco de referencia las proteínas odorantes 6-11-13-14-22-23 y el receptor Orco

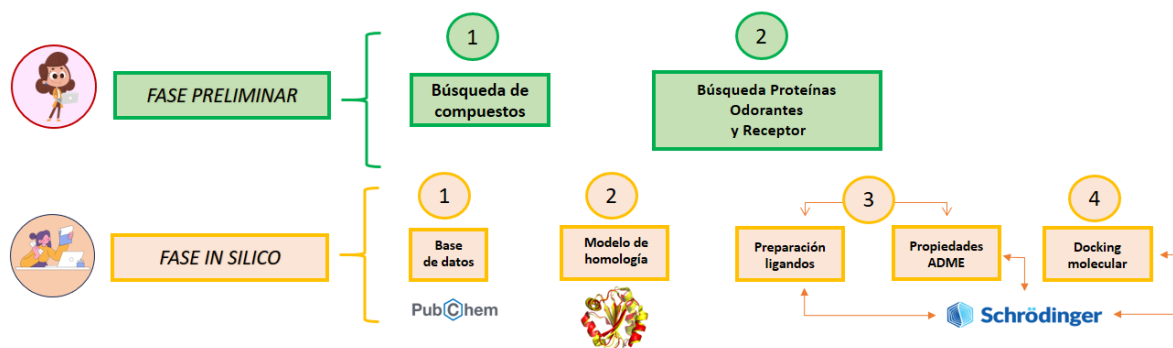
Este capítulo presenta un análisis computacional que aborda una técnica ampliamente empleada en el ámbito de la bioinformática. Esta técnica tiene la capacidad de prever las energías de afinidad y las formas en que los ligandos interactúan con las proteínas, a su vez se trabajó con la técnica de modelado de homología, el cual se hizo por medio del software AlphaFold2. Este enfoque resulta especialmente valioso al investigar nuevos compuestos con potencial terapéutico, ya que provee información anticipada del análisis experimental, ofreciendo una visión de los posibles resultados que se podrían obtener en la fase de investigación a su vez, estas técnicas permiten un avance en la identificación de targets que permitan el diseño de repelentes e insecticidas. Para lograrlo, se estableció un modelo de homología para cada proteína y se procedió con la selección, identificación, y preparación de los compuestos que fueron seleccionados para posterior evaluación.

3.1 Metodología de la fase *In silico* e *vivo*

Como se observa en la figura 7, este trabajo está dividido en tres fases: la fase preliminar, la fase *In silico*. En la fase *In silico* se determinaron los modelos de homología de las proteínas odorantes, sus sitios de interacción y la selección de los compuestos favorables.

Figura 7.

Mapa metodológico de la fase computacional del proyecto de investigación



3.2 Fase preliminar

Se seleccionaron 600 compuestos naturales con reportada actividad repelente, insecticida, ovicida, o acaricida contra diferentes insectos (Anexo 1). Usando estas moléculas se estableció una base de datos haciendo uso de la plataforma Pubchem, en donde se seleccionaron las estructuras químicas en formato SDF, para ejecutar la siguiente fase de la metodología computacional en el programa Maestro (Schrödinger, Inc., 2021).

3.3 Fase *In Silico*

3.3.1 Modelo de homología

Las proteínas odorantes y el receptor Orco de la especie *Rhodnius prolixus*, fueron el foco central de este estudio, ya que son piezas fundamentales para la captación de moléculas odorantes

y por lo tanto principal objetivo de inhibición. Las investigaciones computacionales de este proyecto se realizaron a cabo utilizando Alpha fold 2 (Jumper, J *et al*, 2021, Varadi, M *et al*, 2021).

Debido a que las estructuras funcionales de las proteínas odorantes y el receptor Orco para *Rhodnius prolixus* no se encuentran caracterizadas en la literatura, se realizaron modelos de homología haciendo uso de la estructura primaria de estas proteínas reportadas en Vector base, confirmando su estructura en Uniprot y modelando en AlphaFold22 (Jumper, J *et al*, 2021, Varadi, M *et al*, 2021).

Para la validación del modelo de homología propuesto por el software AlphaFold22, se obtuvieron los porcentajes de precisión para cada sección de la estructura cristalina, lo cual permite determinar su confiabilidad.

3.3.2 Preparación de los ligandos y las proteínas

Los ligandos utilizados en este estudio fueron preparados utilizando la herramienta Ligprep de Schrödinger, Inc. Esto incluyó la configuración de la quiralidad y estereoisomería, así como la generación de todos los posibles estados de protonación en un rango de pH de $7,2 \pm 0,2$, y la búsqueda de estados de menor energía y tautómeros basados en el cálculo teórico del valor de pKa (Pietro, De Vivo, & Ulloa, 2016).

Una vez preparados los ligandos, se evaluaron sus propiedades ADME utilizando la interfaz Qikpro de Maestro, Schrödinger, Inc. Esta interfaz permite determinar las propiedades farmacológicamente relevantes de una molécula para predecir su perfil ADME, incluyendo posibles violaciones de las reglas de Lipinski (Peso molecular < 500 Da; aceptores < 5 ; donadores < 10 ; coeficiente octanol agua < 5 (Natarajan et. al., 2015).

3.3.3 Docking molecular de los ligandos y Sitio de interacción.

Se determinó el posible sitio activo de las proteínas haciendo uso de la herramienta Sitemap del software Schrodinger, el cual proporcionó las coordenadas energéticamente favorables, de la cual se seleccionó aquella con mejor precisión ($Dscore > 1$). SiteMap, además de mostrar un sitio de interacción, presenta un conjunto de datos cuantitativos que permiten seleccionar según sus parámetros el mejor sitio activo de la proteína. Además de esto, la herramienta brinda información sobre las interacciones ligando-receptor, sugiriendo estrategias para la modificación de los compuestos (Halgren, 2009; Sitemap, 2015). Una vez determinado el posible sitio de interacción de las proteínas, se procedió a realizar la predicción de la pose a la cual los compuestos estaban interaccionando con el sitio seleccionado, esto se realiza por medio de la herramienta de docking molecular.

El docking molecular se llevó a cabo en la plataforma Maestro Schrodinger, basada en el algoritmo Glide (Freisner, 2004), en donde se realizó el acoplamiento con precisión estándar (SP) y extra precisión (XP). Los ligandos se acoplaron dentro de una grid de 15 Å y generaron al menos 10 poses por ligando. Posteriormente, se realizó por medio de la herramienta Prime, la cual optimizó los parámetros de energía de afinidad calculada mediante la interacción proteína-ligando, eliminación de iones metálicos, presencia de puentes de hidrógeno y moléculas de solvente. Finalmente, se determinaron los compuestos potenciales según los parámetros del screening virtual. Posteriormente se realizó la discriminación de aquellos compuestos cuyo valor de docking score y energía de afinidad se encontraran en un rango por debajo de 0 (mayor afinidad proteína-metabolito), y a su vez, que no cumpliera con los parámetros fisico-farmacológicos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME), por último, se tuvo en cuenta sus concentraciones

tóxicas a nivel cutáneo, inhalatoria y oral. Estos compuestos fueron seleccionados para realizar la fase *in vivo* con la técnica electroantenografía.

3.3.4 Visualización

Las poses de acoplamiento generadas por el software Maestro Schrödinger se cargaron directamente al programa PyMOL y el software Inkscape para realizar la visualización de las poses e interacciones de cada compuesto con cada proteína.

3.4 Resultados

A continuación se presentan los resultados de los ensayos *in silico* usando 6 proteínas odorantes y receptor Orco relacionados con el proceso odorante en *R prolixus*.

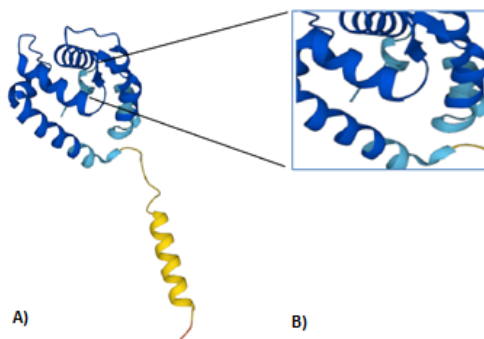
3.4.1 Proteína odorante 6

3.4.1.1 Resultados modelo de homología y docking molecular. El modelo de homología para la proteína 6 (Putative odorant-binding protein 19^a) (Figura 8, a) se diseñó haciendo uso del software AlphaFold2, con la secuencia de aminoácidos descargada de vector base, código RPRC004413 (Oliveira et. al., 2017), verificada con la base de datos uniprot (código R4G3L7). Una vez obtenido el modelo se verificó su confiabilidad, esto se realizó mediante los rangos de confianza los cuales se representan por código de colores, en el caso del color azul presenta una confiabilidad de más del 90%, celeste con una confianza de 90%-70%, el color amarillo es una

confiabilidad de 50%-70% y el color naranja, presenta una confianza por debajo del 50%, por otro lado el software proporciono una confiabilidad del 86.6 % para la estructura en conjunto (Jumper, Evans, & Pritzel, 2021; Varadi & Met y Col, 2021). El posible sitio activo de la proteína (Figura 8, b) se encuentra en una región de confiabilidad entre 90-70 porciento, permitiendo así proseguir con los estudios posteriores.

Figura 8.

A) Modelo de homología para la proteína odorante 6 realizado por AlphaFold2. B) Posible sitio drogable de la proteína.



Los resultados obtenidos una vez realizado el proceso de docking score y energía de afinidad (EA), se muestran en la tabla 1, la cual se encuentra ordenada de manera ascendente en energía de afinidad. El metoxicloro encabeza los resultados con sus puntajes obtenidos en el screening virtual, sin embargo, se discrimina debido a que no cumple factores de selección. Así mismo, los compuestos DDT, ronne, clorfenapir, gingershinina, germacrene D, decarbofurano, fueron seleccionados como posibles inhibidores de amoniaco en la proteína 6, gracias a su alto valor de afinidad, sin embargo, se descartaron los compuestos ya que no cumplían los criterios de

toxicidad, biodisponibilidad, actividad cancerígena y/o comercializadores. Así mismo, una vez realizado el análisis computacional para la proteína en cuestión, los compuestos que se encontraban dentro de los rangos permitidos en los parámetros descritos fueron la xantona y el nerolidol.

Tabla 1.

Compuestos con mejor energía de afinidad para la proteína 6.

Compuesto	DS	EA (kcal/mol)	PM	AH	DH	LogP0	Caco
Metoxicloro	-7.594	-73.72	345.65	1.5	0	5.659	9.906.038
Dilan	-7.223	-64.87	324.20	2	0	5.060	2.192.323
DDT	-7.592	-63.37	354.49	0	0	6.906	9.906.038
Nerolidol	-1.600	-56.47	222.37	750	1.0	4.912	5.263.996
Clorfenopir	-6.918	-53.90	407.61	3.200	0	4.859	2.447.642
Ronnel	-6.179	-46.55	321.54	1.500	0	5.395	9.906.038
Girgenschonina	-6.164	-46.16	216.28	4.250	1.000	1.302	196.4560
Germacrene D	-7.768	-45.33	204.35	0	0	5.414	9.906.038
Xantona	-7.295	-44.47	196.20	2500	0	2.735	3.521.282
Decarbofurano	-6.873	-44.00	207.22	3.750	1.000	1.998	2.503.084

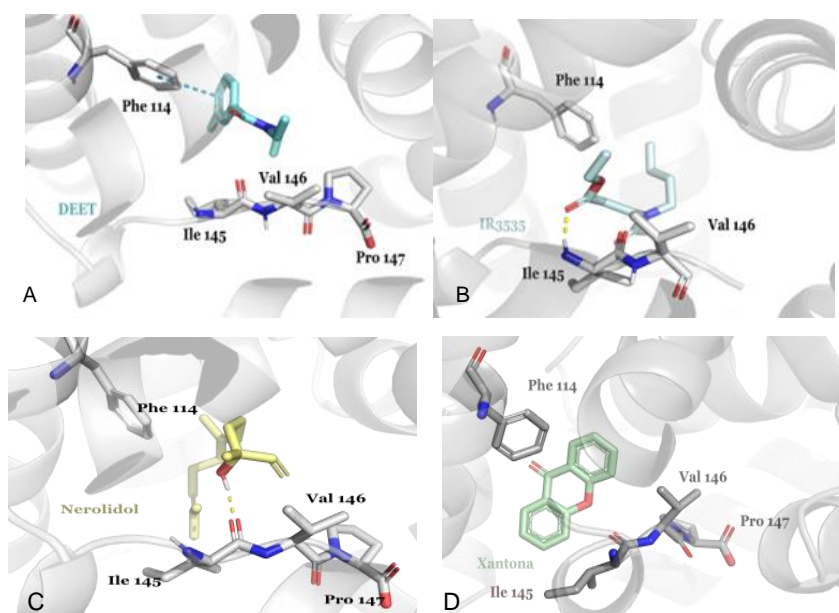
Nota: Se exponen los resultados obtenidos de DS: docking score; EA: energía de afinidad; las reglas de Lipinski, las cuales son: PM: peso molecular, Log Po: coeficiente de octanol-agua, DH: número de donadores de puentes de hidrógeno y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno, sus valores recomendados son : 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2– 20.

Para explorar el modo de unión de los compuestos seleccionados para la proteína 6, se realizó el acoplamiento molecular, en donde sugiere que el nerolidol y la xantona son los compuestos con posible actividad repelente en la proteína en cuestión. Primero, se analizó el DEET (DS: -3,310; EA: -37,70 kcal/mol, Figura 9 A) como compuestos de referencia, el cual interacciona hidrofobicamente con los aminoácidos Ile 145, Val 146 y Pro 147; así mismo, el DEET presentó interacción de carácter π - π entre el fenil de su estructura con la Phe 114. El IR3535 (DS: -2,885; EA: -44,52, Figura 9 B) también fue sugerido como compuesto de referencia con el fin de validar los resultados. El IR3535 interacciona de manera hidrofóbica con los aminoácidos Phe 114 y Val 146, además este compuesto presentó acople de carácter polar por medio de un enlace de hidrógeno con el éster del propionato de etilo y Ile 145. Uno de los compuestos seleccionados fue el nerolidol

(DS: -1,600; EA: -56,47, Figura 9 C) el cual se encontraba rodeado de los aminoácidos Phe 114, Ile 145, Pro 147 con los cuales interacciona hidrofobicamente, por otro lado, este compuesto interacciona por medio de un enlace de hidrógeno con el aminoácido Val 146 y su grupo hidroxilo. Por último, el compuesto xantona (DS: -7,295; EA: -44,47, Figura 9 D) se acopla por medio de interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Phe 114, Ile 145, Val 146 y la Pro 147.

Figura 9.

Interacciones predichas en el sitio de alta afinidad por el Docking Molecular para la proteína odorante 6



*Nota** Cada conjunto de átomos de los residuos y del ligando poseen un código de color. Oxígenos: rojo; Nitrógenos: Azul. Los compuestos están nombrados de A-D: A. DEET, B. IR3535, C. Nerolidol, D. Xantona,. Las interacciones proteína ligando tipo puente de hidrógeno están representados por líneas discontinuas amarillas y las interacciones tipo π - π por líneas discontinuas azules.

La proteína 6 es una proteína que se encuentra presente en el sistema olfativo del insecto triatomino, la cual además se encuentra localizada en la antena y que a su vez es reportada con la función de captar el olor y se responsable del comportamiento del insecto. Por otro lado, esta

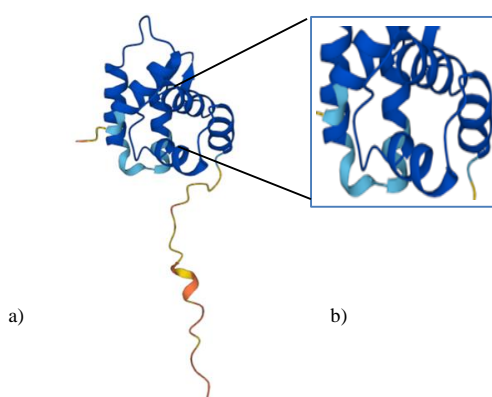
proteína también está presente en la mosca *Drosophila melanogaster* con la función de la captación del olor a alcohol (Oliveira et. al., 2017).

3.4.2 Proteína odorante 11

3.4.2.1 Resultados modelo de homología y docking molecular. Para la realización del modelo de homología de la proteína odorante 11 (Figura 10 A) se realizó la búsqueda de su código en la vector base RPRC004408 (Oliveira et. al., 2017) y se confirmó en la uniprot bajo el código Q8T5U0 para poder modelar la estructura terciaria en AlphaFold2. El modelo presentado por el software presenta una gran proporción con confiabilidad de 84.94 %, lo cual indica que la estructura terciaria es viable para los ensayos *in silicos* posteriores.

Figura 10.

A) Modelo de homología proteína 11 realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio activo de la proteína.



Como se observa en la tabla 2, los resultados de docking molecular sugieren a los compuestos afoxolaner y piresmetrina como los más afines a la proteína 11, los cuales se ordenan

según sus valores de EA. El compuesto afoxolaner fue el compuesto con mejor puntaje de acoplamiento, no obstante este compuesto no cumplía con el criterio de disponibilidad y costo para poder realizar pruebas posteriores. Sin embargo, aunque las moléculas analizadas en esta proteína obtuvieron valores de EA altos ninguna de las moléculas mencionadas cumple con criterios de selección tales como la biodisponibilidad, factor costo, rango de valores toxicológicos, actividad cancerígena y/o comercializadores. Es por eso que, una vez realizado el análisis *In silico* de la proteína 11, no se determinó un compuesto que fuera viable para poder realizar la siguiente fase de estudios experimentales.

Tabla 2.

Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para la proteína 11.

Compuesto	DS	EA (kcal/mol)	PM	AH	DH	LogP0	Caco
Afoxolaner	-10.38	-77.73	625.87	6.250	1.250	7.061	877.987
Piresmetrina	-8.103	-77.49	382.45	4.500	0	5.474	1.288.717
Diafenturion	-8.221	-73.17	384.57	3.000	2.000	6.618	7.393.707
Cihalotrina	-9.065	-72.92	449.85	4.000	0	5.636	836.468
Fluvalinato	-11.44	-72.18	502.92	5.000	1.000	7.021	1.483.968
Fluralaner	-9.460	-71.98	556.29	6.250	1.250	5.983	910.850
Etofenprox	-8.114	-70.84	376.49	2.950	0	6.314	9.906.038
Bifentrina	-9.197	-68.12	422.87	2.000	0	7.27	4.263.791
Acrinatrina	-9.908	-65.71	541.44	6.000	0	6.998	812.032
Pinosolinol	-8.061	-64.57	358.39	6.400	2.000	2.922	34.875

Nota: Se exponen los resultados obtenidos de DS: docking score; EA: energía de afinidad; las reglas de Lipinski, las cuales son: PM: peso molecular, Log Po: coeficiente de octanol-agua, DH: número de donadores de puentes de hidrógeno y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno, sus valores recomendados son : 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2– 20.

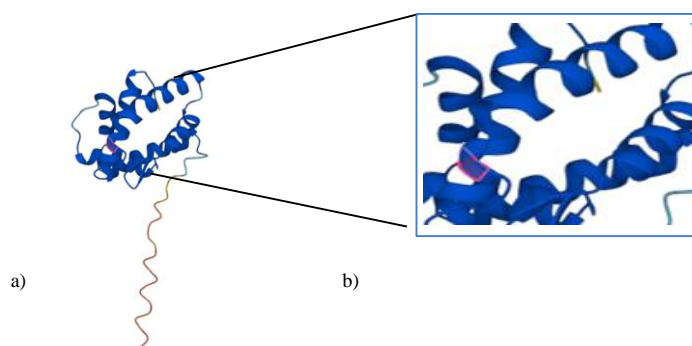
3.4.3 Resultados proteína odorante 13

3.4.3.1 Resultados modelo de homología y docking molecular. El modelo de homología de la proteína odorante 13 (Figura 11 A) se realizó siguiendo el mismo procedimiento previamente mencionado, en donde haciendo uso del software AlphaFold2 se obtuvo la estructura

tridimensional de la proteína bajo el código en vector base RPRC0001777 (Oliveira et. al., 2017) y se confirmó bajo el código uniprot T1H841. El modelo presentado por AlphaFold2 presenta una confiabilidad de 87.85% . Así mismo, el posible sitio activo predicho por el software sitemap (Figura 11,b), se encuentra localizado en zonas de la estructura tridimensional de alta confiabilidad, lo cual brinda oportunidad para realizar los estudios posteriores.

Figura 11.

A) Modelo de homología de la proteína odorante 13 realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio de Union.



En la tabla 3 se obtuvieron los resultados de las 10 moléculas con energía de afinidad favorable, en donde sus valores se encuentran de manera ascendente en un rango de -71.70 kcal/mol y -67.33 kcal/mol. Sin embargo, los compuestos no fueron seleccionados para la fase *in vivo*, debido a que estos no cumplían con los criterios de selección, por esta razón, para la proteína 13, la cual es encargada de la recepción de moléculas del olor y relacionada con el comportamiento (Oliveira et. al., 2017), no se seleccionó un compuesto que pudiera actuar como inhibidor ante la recepción de moléculas atrayentes (Amoniaco) del *Rhodnius prolixus*.

Tabla 3.*Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para la proteína 13*

Compuesto	DS	EA (kcal/mol)	PM	AH	DH	LogP0	Caco
Imiprotina	-8.625	-71.70	318.372	5.500	1.500	3.396	600.849
Aramita	-8.485	-71.63	334.857	4.750	0	4.298	114.698
Tetrametrina	-8.763	-70.90	331.411	5.000	0	3.628	1.303.619
Barthrin	-7.926	-70.76	336.814	3.500	0	4.820	4.549.599
Bifentrina	-7.931	-68.37	422.874	2.000	0	7.627	4.263.791
Benfuracab	-8.414	-68.18	410.527	7.250	0	4.109	1.939.994
Fosalona	-8.601	-67.98	367.802	4.500	0	4.459	2.406.012
Dimetrina	-7.924	-67.72	286.413	2.000	0	5.307	3.540.628
Cicletrina	-8.588	-67.62	328.450	4.000	0	4.806	3.235.976
Piresmetrina	-8.673	-67.33	382.455	4.500	0	5.474	1.288.717

Nota: Se exponen los resultados obtenidos de DS: docking score; EA: energía de afinidad; las reglas de Lipinski, las cuales son: PM: peso molecular, Log Po: coeficiente de octanol-agua, DH: número de donadores de puentes de hidrógeno y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno, sus valores recomendados son : 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2– 20.

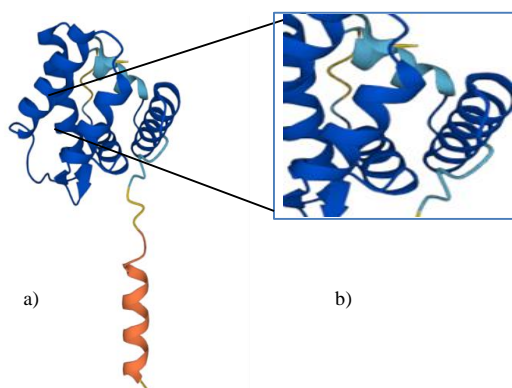
3.4.4 Proteína odorante 14

3.4.4.1 Resultados Modelo de homología y docking molecular. El modelo de homología de la proteína odorante 14 (Figura 12 A) se realizó gracias al software AlphaFold2 donde se obtuvo la estructura tridimensional de la proteína bajo el código vector base RPRC0004407 confirmado por el código uniprot R4G529. El modelo de homología propuesto por AlphaFold2, cuenta con un porcentaje de confianza de 87,31. Debido a lo anterior, se ha establecido que el sitio propuesto por SiteMap (Figura 12b) se encuentra dentro de las secciones de alta confiabilidad de la proteína. Los compuestos presentes en la tabla 4, se encuentran reportados con actividad repelente, insecticida, acaricida, entre otros, sin embargo, se descartaron compuestos que no cumplieran con los criterios de disponibilidad, toxicidad y costo. Es por eso, que se decidió descartar los compuestos desde el DDT hasta el fluralaner compuestos que presentaron actividad cancerígena , valores toxicológicos altos , afectaciones a la salud humana o valor comercial sobre los \$100 (Harada, T. et. al., 2016; Safety data sheet 2018; Mnif, W.; et. al. 2011; Safety Data Sheet 2023). Además, se descartaron

los compuestos fluvalinato, alosamidina y kaempferol, por factor de biodisponibilidad y factor costo.

Figura 12.

A) Modelo de homología de la proteína odorante 14 realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio activo de la proteína .



Lo anterior permitió concluir, que los compuestos que obtuvieron los mejores valores de afinidad, que cumplieron con factores toxicológicos y que además presentaban biodisponibilidad, son la xantona, nerolidol, acetato de geranilo y quercetina, compuestos que a su vez, podrían llegar a presentar actividad inhibitoria a la recepción de amoniaco y que por ende serían posibles compuestos con actividad repelente.

Tabla 4.

Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para la proteína 14

Compuesto	DS	EA (kcal/mol)	PM	AH	DH	LogP0	Caco
DDT	-4.935	-54.91	354.49	0	0	6.906	9.906.038
Afoxolaner	-6.127	-54.45	25.877	6.250	1.250	7.061	877.987
Fluvalinato	-4.954	-50.51	502.920	5.000	1.000	7.021	1.483.968
Fluralaner	-5.516	-48.90	556.291	6.250	1.250	5.983	910.850

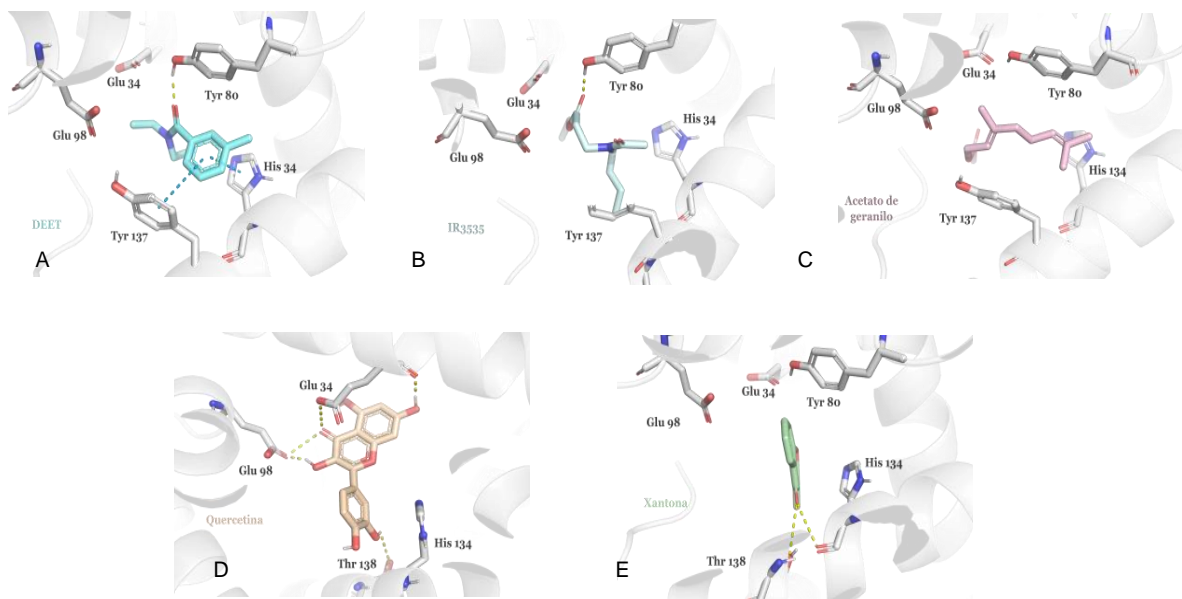
Compuesto	DS	EA (kcal/mol)	PM	AH	DH	LogP0	Caco
Xantona	-4.240	-45.44	196.205	2500	0	2.735	3.521.282
Nerolidol	-2.402	-34.51	222.370	750	1.0	4.912	5.263.996
Acetato de geranilo	-1.782	-27.46	196.289	2.000	0	3.504	2.266.017
Quercetina	-6.031	-23.35	302.240	5.250	4.000	3.670	18.199
Alosamidina	-5.754	-22.90	622.625	26.700	9.000	-4.467	3.058
Kaempferol	-6.218	-22.69	286.240	4.500	3.000	1.041	51.240

Nota: Se exponen los resultados obtenidos de DS: docking score; EA: energía de afinidad; las reglas de Lipinski, las cuales son: PM: peso molecular, Log Po: coeficiente de octanol-agua, DH: número de donadores de puentes de hidrógeno y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno, sus valores recomendados son : 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2– 20.

En cuanto a la proteína 14, el DEET (DS: -3,749; EA: -28,33 kcal/mol, Figura 13 A) presento interacciones hidrofóbicas con aminoácidos Glu 34 y Glu 98, a su vez, este compuesto se acopló de manera π - π con el His 34 y Tyr 137. Por otro lado, el DEET interacciona de manera polar con un enlace de hidrógeno entre el hidroxilo y el Tyr 80. El siguiente compuesto que se analizó fue el IR3535 (DS: -1,910; EA: -29,46 kcal/mol. Figura 13 B) en donde estuvo rodeado de los aminoácidos Glu 34, Glu 98, Tyr 137 e His 134, los cuales interaccionan de manera hidrofóbica. Además, este compuesto interacciona de manera polar con el propionato de etilo y el Tyr 80. El acetato de geranilo (DS: -1,782; EA: -27,45. Figura 13 C) se acopló hidrofobicamente con los aminoácidos Glu 34, Tyr 80, Gln 98, His 134, Tyr 137. La quercetina en conjunto con los aminoácidos Glu 34, Glu 98, Thr 138 estuvieron interaccionando de manera polar por medio de enlaces de hidrógeno, a su vez, este compuesto se relaciona hidrofobicamente con la His 34. Por último, el compuesto que se seleccionó fue la xantona (DS: -4,246; EA:-45,44 kcal/mol. Figura 13 D), este compuesto se encuentra interaccionando de manera hidrofóbica con los aminoácidos Glu 34, Tyr 80, Glu 98, por otro lado, presentó interacción polar con enlaces de hidrógeno y los aminoácidos His 134 y Thr 138.

Figura 13.

Interacciones predichas en el sitio de alta afinidad por el Docking Molecular para la proteína odorante 14



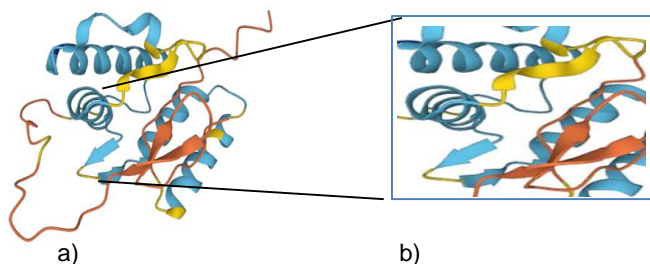
*Nota** Cada conjunto de átomos de los residuos y del ligando poseen un código de color. Oxígenos: rojo; Nitrógenos: Azul. Los compuestos están nombrados de A-E: A. DEET, B. IR3535, C. Acetato de geranilo, D. Quercetna, E. Xantona . Las interacciones proteína ligando tipo puente de hidrógeno están representados por líneas discontinuas amarillas y las interacciones tipo π - π por líneas discontinuas azules

3.4.5 Proteína odorante 22

3.4.5.1 Resultados modelo de homología y docking molecular. El modelo de homología de la proteína odorante 22 (Figura 14) se realizó gracias al software AlphaFold2 bajo el código vector base: RPRC000115 previamente verificado en la uniprot con el código T1H7Y3. Así mismo, esta estructura tridimensional se encuentra con un valor de 62.49% de confianza. Por otro lado, la herramienta sitemap permitió determinar el posible sitio activo de la proteína (Figura 14,b) , el cual se encuentra situado en una región con porcentajes sobre el 50%, permitiendo así avanzar en los ensayos *in silico* posteriores.

Figura 14.

A) Modelo de homología de la proteína odorante 22 realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio de Unión.



En la tabla 5, se evidencian los compuestos ordenados de manera ascendente con respecto a su energía de afinidad, estos compuestos fueron seleccionados debido a que presentaban valores en docking score y energía de afinidad favorables. Sin embargo, se realizó un filtrado en el que aquellos con actividades cancerígenas tales como el Heptacloro y Chlordano (National Center for Biotechnology Information 2023), fueron descartados tras presentar actividad tumoral en el hígado y el pulmón en experimentos realizados en rata. De igual manera, los compuestos restantes a excepción del farnesol se descartaron debido a que no cumplían con los criterios de biodisponibilidad y factor costo.

Tabla 5.

Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para la proteína 22

Compuesto	DS	EA (kcal/mol)	PM	AH	DH	LogP0	Caco
Heptacloro	-6.589	-68.97	373.32	0	0	5.932	9.906.038
Capsaicina	-6.238	-68.29	305.41	4.000	2.00	3.628	1.1015.37
Epofenonano	-6.243	-67.45	304.47	2.750	0	5.302	9.906.038
DDT	-6.148	-67.43	354.49	0	0	6.906	9.906.038
Farnesol	-6.096	-67.33	222.37	1.700	1.000	4.119	5.626.659
Girgensonina	-6.017	-65.95	216.28	4.250	1.00	1.302	196.456
Dieldrin	-7.096	-65.86	380.91	2.000	0	4.965	9.906.038

Compuesto	DS	EA (kcal/mol)	PM	AH	DH	LogP0	Caco
Clordano	-6.093	-65.53	409.78	0	0	6.609	9.906.038
Flufenerim	-6.590	-62.55	363.74	2.500	1.000	5.457	5.248.407
Alfa Guaiene	-6.138	-60.95	204.35	0	0	5.640	9.906.038

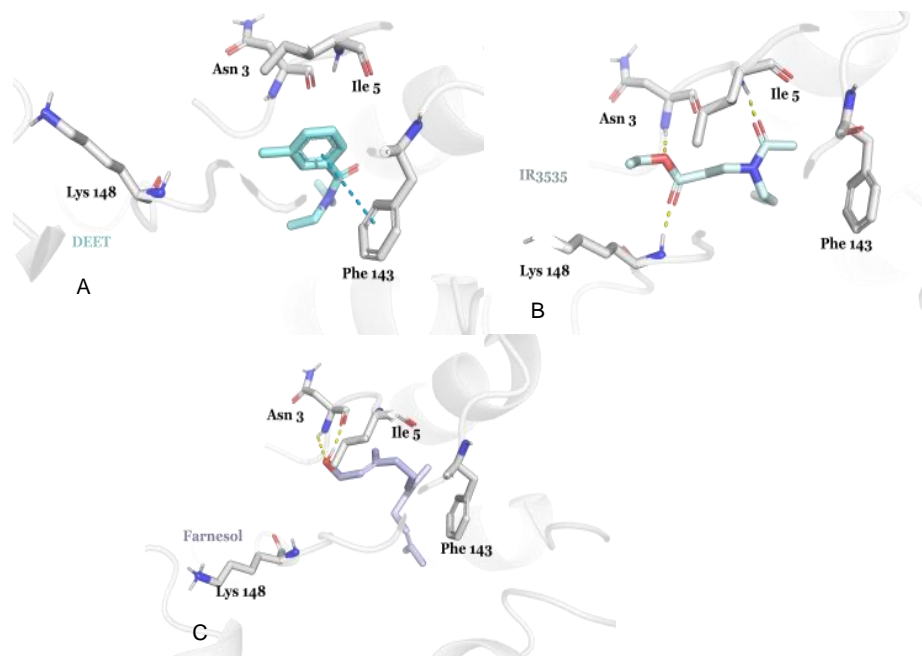
Nota: Se exponen los resultados obtenidos de DS: docking score; EA: energía de afinidad; las reglas de Lipinski, las cuales son: PM: peso molecular, Log Po: coeficiente de octanol-agua, DH: número de donadores de puentes de hidrógeno y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno, sus valores recomendados son : 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2– 20.

En la proteína 22, el farnesol se seleccionó como el mejor clasificado dentro de los 10 compuestos con posible actividad repelente de insectos. Primeramente se analizó el DEET (DS: -4,689; EA: -45,68 kcal/mol. Figura 15 A) el cual se encuentra rodeado hidrofobicamente con los aminoácidos Asn 3, Ile 5 y Lys 148 y presentó una interacción de carácter π - π con el anillo aromático del tolueno y el aminoácido Phe 143. El IR3535 (DS:-4,302; EA: -48,06 kcal/mol. Figura 15, B) el cual se encuentra interaccionando de manera hidrofóbica con el aminoácido Phe 143, a su vez presentó interacciones polares con el oxígeno de la amida y el aminoácido Ile 5 y su estructura química tiene interacciones polares de enlace de hidrógeno con los oxígenos del propionato y los aminoácidos Asn 3 y Lys 148. Por último, el farnesol (DS: -6,096; EA: -6,33 kcal/mol. Figura C) en donde estuvo rodeado hidrofobicamente con los aminoácidos Ile 5, Phe 143 y Lys 148 y que a su vez estuvo interaccionando polarmente con un enlace de hidrógeno entre su grupo hidroxilo y el Asn 3

Los aminoácidos que interaccionan con los compuestos de referencia también interaccionan con el farnesol, por lo cual podría esperarse que este compuesto tuviera una interacción y comportamiento semejante al DEET y el IR3535 en el sistema olfativo del insecto.

Figura 15.

Interacciones Predichas en el sitio de alta afinidad por el Docking Molecular para la proteína odorante 22.



Nota* Cada conjunto de átomos de los residuos y del ligando poseen un código de color. Oxígenos: rojo; Nitrógenos: Azul. Los compuestos están nombrados de A-C: A. DEET, B. IR3535, C. Farnesol. Las interacciones proteína ligando tipo puente de hidrógeno están representados por líneas discontinuas amarillas y las interacciones tipo π - π por líneas discontinuas azules

3.4.6 Resultados Proteína odorante 23

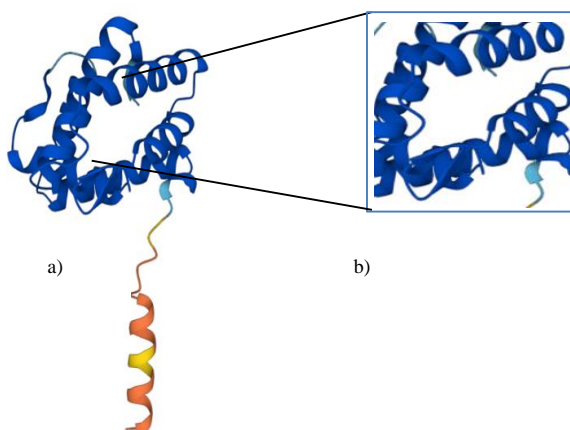
3.4.6.1 Resultados Modelo de homología y docking molecular. El modelo de homología presentado por Alphafold presentó una confiabilidad por debajo del 70% para la hélice terminal, sin embargo, el modelo propuesto tiene una confiabilidad global de 89.32%. El modelo de homología de la proteína odorante 23 (Figura 16) se realizó usando la secuencia registrada en la vector base bajo el código RPRC000174 y verificado con la secuencia registrada en la uniprot bajo el código T1H838. Además, se identificó el posible sitio activo (Figura 16, b) en donde este

se encuentra localizado en una región con valores de confiabilidad altos, dando así apertura a la realización del acoplamiento molecular proteína-ligando.

Dentro de las proteínas estudiadas, la proteína 23 es quien presentó valores de energía de afinidad favorables con valores por encima de los -80 kcal/mol para la Beta-chaconina y valores por debajo de -45 kcal/mol para el tetrahydroantraceno.

Figura 16.

A) Modelo de homología de la proteína odorante 23 realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio de unión de unión



Sin embargo, los compuestos betachaconina y tetrahydroantraceno fueron descartados debido a incumplimiento de criterios de selección. Por otro lado, la tabla 6 presenta 10 compuestos ordenados de forma ascendente de energía de afinidad, de los cuales 9 fueron descartados por presentar actividad cancerígena, ausencia de proveedores, entre otros criterios. Así mismo, el compuesto seleccionado para la proteína 23 que se esperaba tuviera actividad potencializadora o inhibitoria es la Xantona.

Tabla 6.

Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para la proteína 23

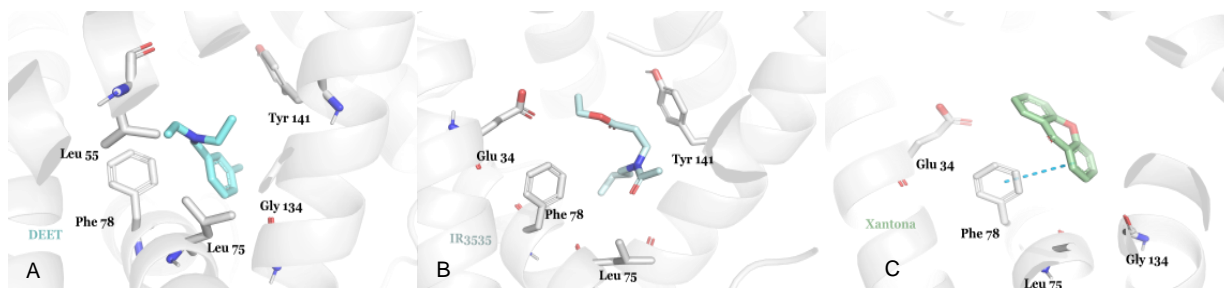
Compuesto	DS	EA (kcal/mol)	PM	AH	DH	LogP0	Caco
Beta-Chaconia	-7.992	-82.70	705.927	19.0	6.0	1.533	11.153
Protrifenbute	-7.556	-71.63	394.915	500	0	8.423	9.906.038
Bifentrina	-7.606	-68.69	422.874	2.000	0	7.627	4.263.791
Tralometrina	-7.517	-62.80	665.013	4.000	0	6.902	1.210.499
Afoxolaner	-8.781	-60.73	625.877	6.250	1.250	7.061	877.987
Fluvalinato	-8.315	-60.63	502.920	5.000	1.000	7.021	1.483.968
DDT	-7.542	-57.10	354.49	0	0	6.906	9.906.038
Metoxicloro	-7.641	-56.84	345.65	1.5	0	5.659	9.906.038
Clorobencilato	-7.503	-55.36	324.191	2.750	1.000	4.627	2.448.260
Xantona	-6.308	-47.34	196.205	2500	0	2.735	3.521.282

Nota: Se exponen los resultados obtenidos de DS: docking score; EA: energía de afinidad; las reglas de Lipinski, las cuales son: PM: peso molecular, Log Po: coeficiente de octanol-agua, DH: número de donadores de puentes de hidrógeno y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno, sus valores recomendados son : 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2– 20.

La proteína odorante 23 forma complejos con los compuestos DEET, IR3535 y xantona, dentro de este acoplamiento el DEET (DS: -5,147; EA: -39,60 kcal/mol. Figura 17, a) interacciona con Leu 55, Leu 75, Phe 78 , Gly 134 y Tyr 141. A su vez, el IR3535 (DS: -48,00 EA: -4, 201 kcal/mol. Figura 17b) se encuentra rodeado de aminoácidos que le permiten una interacción hidrofóbica con ellos como lo son el Gly 34, Leu 75, Phe 78 y el Tyr 141. Por último, la xantona (DS: -6,307; EA: -47,34 kcal/mol. Figura 17, c), en la interacción proteína-ligando se encontró en una región hidrofóbica con los aminoácidos Glu 34, Leu 75 y Gly 134, por otro lado, la xantona presentó una interacción de carácter π - π con el anillo aromático y el Phe 78.

Figura 17.

Interacciones Predichas en el sitio de alta afinidad por el Docking Molecular para la proteína odorante 23.



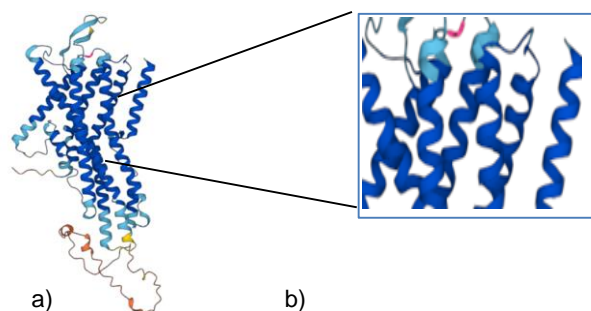
*Nota** Cada conjunto de átomos de los residuos y del ligando poseen un código de color. Oxígenos: rojo; Nitrógenos: Azul. Los compuestos están nombrados de A-C: A. DEET, B. IR3535, C. Xantona. Las interacciones proteína ligando tipo puente de hidrógeno están representados por líneas discontinuas amarillas y las interacciones tipo π - π por líneas discontinuas azules

3.4.7 Receptor Orco

3.4.7.1 Resultados Modelo de Homología y resultados docking molecular. El modelo de homología del receptor orco se realizó bajo el código vector base RPRC000476 verificando su secuencia aminoacídica en la uniprot bajo el código T1H8X7, por medio del software AlphaFold2 2 (Figura 18). La estructura tridimensional suministrada por AlphaFold22 presentó un valor de confianza de 83.30%.

Figura 18.

A) Modelo de homología del Co- Receptor Orco realizado por AlphaFold2 B) Posible sitio de unión



En la tabla 7 se presentan los valores de energía de afinidad de 10 compuestos, sin embargo, estos compuestos no cumplían con los criterios descritos para la selección de moléculas que inhiben o potencialicen la actividad de recepción de amoniac.

Tabla 7.

Compuestos seleccionados por mejor energía de afinidad para el Co-receptor Orco

Compuesto	DS	EA (kcal/mol)	PM	AH	DH	LogP0	Caco
Protrifenbuta	-9.791	-96.21	394.915	500	0	8.423	9.906.03
Fluralaner	-9.711	-93.41	56.291	6.250	1.250	5.983	910.850
Fenoxicarb	-8.249	-89.08	301.341	3.750	1.000	4.300	2.393.194
Bioetanometrino	-8.269	-87.75	364.483	2.500	0	6.613	5.186.766
Annonacina	-8.454	-87.37	596.886	1.500	4.000	6.383	243.847
Lambda Cihalotrino	-8.624	-84.08	449.856	4.000	0	6.690	1.519.768
Cicloprotrino	-8.280	-84.07	482.362	4.750	0	6.730	1.465.818
Cihalotrino	-8.149	-80.25	449.856	4.000	00	5.636	836.468
Piriproxifeno	-8.347	-79.99	321.375	2.250	0	5.899	8.489.972
Flucitrinato	-9.016	-79.44	451.469	4.000	0	6.911	1.607.993

Nota: Se exponen los resultados obtenidos de DS: docking score; EA: energía de afinidad; las reglas de Lipinski, las cuales son: PM: peso molecular, Log Po: coeficiente de octanol-agua, DH: número de donadores de puentes de hidrógeno y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno, sus valores recomendados son : 130 – 725, -2 – 6,5, 0 – 6, 2– 20.

En la tabla 7, se observan los valores obtenidos para docking score y energía de afinidad de los compuestos seleccionados y los controles positivos, la cual se encuentra ordenada de manera ascendente en energía de afinidad.

Tabla 8.

Compuestos seleccionados para receptor Orco con los compuestos de referencia DEET e IR3535, valores de Docking score y Energía de afinidad (EA)

Compuesto	Docking Score	EA (Kcal/mol)
Farnesol	-6.298	-62.09
Quercetina	-8.993	-61.79
Xantona	-5.750	-52.89
Acetato de geranilo	-5.773	-50.14
DEET	-5.970	-4.919
IR3535	-3.441	-48.23
Nerolidol	-5.034	-46.99

En la tabla 7, se observan los valores obtenidos para docking score y energía de afinidad de los compuestos seleccionados y los controles positivos, la cual se encuentra ordenada de manera ascendente en energía de afinidad.

El DEET (DS:-5,970; EA:-49,19 kcal/mol. Figura 19 A) interacciona con la Val 149 y el Trp 150 de manera hidrofóbica y con el Tyr 383 interacciona con su anillo aromático de carácter π - π . Además, el IR3535 (DS:-3,441; EA: -48,23 kcal/mol. Figura 19 B) presentó interacciones hidrofóbicas con el Thr 80, Val 149, Trp 150, Asp 183 y el Tyr 384. En el caso del acetato de geranilo (DS:-5,773; EA: -50,14 kcal/mol. Figura 19 C), farnesol (DS: -6,298; EA:-62,09 cal/mol. Figura 19 D) y nerolidol (DS: -5,034; EA:-46,99 kcal/mol. Figura 19 E), presentaron interacciones con los aminoácidos Val 149, Trp 150, Tyr 383, en donde interaccionan con ellos de manera hidrofóbica mientras que el farnesol, presentó interacción polar entre el Thr 80 y el hidroxilo terminal del farnesol.

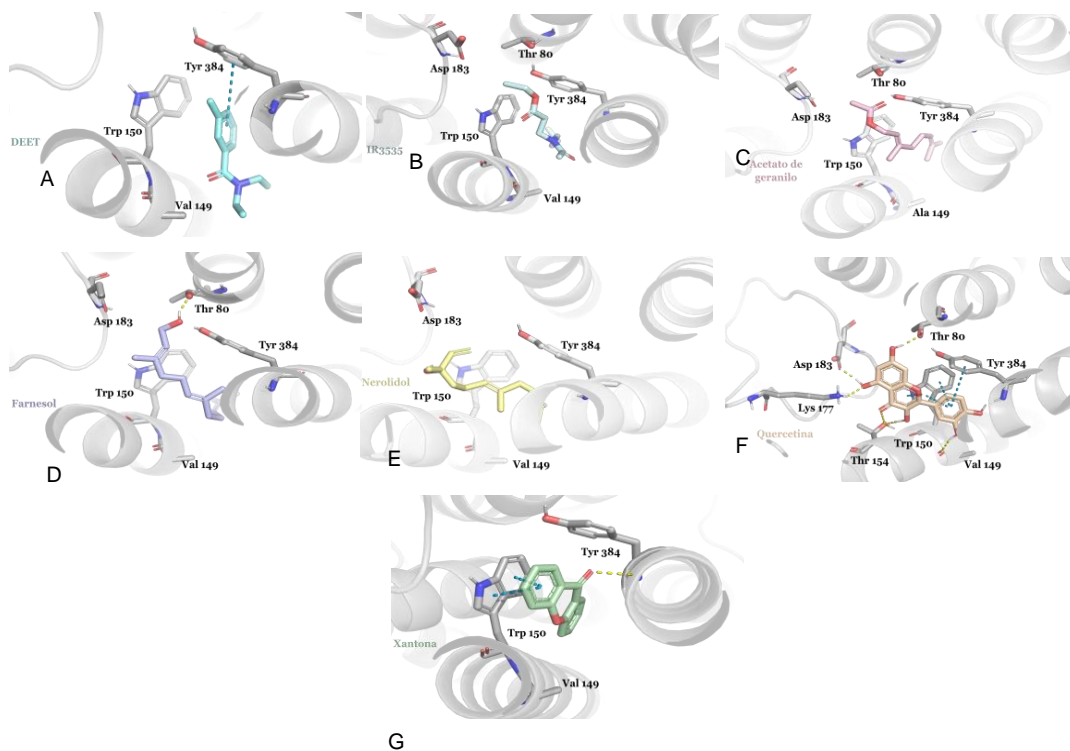
Por otro lado, la quercetina (DS: -8,893; EA: -61,79 kcal/mol Figura 19 F) se encuentra rodeada de múltiples interacciones de carácter polar y de manera π - π . La molécula cuenta con grupos hidroxilos alrededor de su flavona y también presenta en su estructura el 3,4-dihidroxifenil, en donde se presentan la mayoría de las interacciones presentadas. El Thr 80 interacciona de manera polar con el hidroxilo lateral de la flavona al igual que el Asp 83 y el Lys 177 , además, la Val 149, presentó interacciones con el hidroxilo que se encuentra en el anillo aromático central, donde a su vez el Thr 154 interacciona tanto con el grupo oxo y el grupo hidroxilo de la flavona y además se presentaron interacciones de carácter π - π con el anillo aromático del 3,4-dihidroxifenil y los aminoácidos Trp 150 y Tyr 384.

Por último, la xantona (DS: -5,970; EA: -52,89 kcal/mol. Figura 19 G), compuesto destacado por interactuar con la mayoría de las proteínas de este estudio, presentó 2 interacciones de carácter π - π con el Trp 150, y a su vez presentó interacción polar con el grupo oxo- del dibenzo-gama-pirona, para finalizar con una interacción de carácter hidrofóbico con la Val 149. Estos aminoácidos no solo se encuentran interaccionando con las moléculas seleccionadas, sino que también están presentes en el DEET y el IR3535, por ende, estos aminoácidos podrían estar interactuando de manera que generen una inhibición a la recepción del amoniaco en el sistema olfativo del insecto.

Figura 19.

Interacciones Predichas en el sitio de alta afinidad por el Docking Molecular para el receptor

Orco



*Nota** Cada conjunto de átomos de los residuos y del ligando poseen un código de color. Oxígenos: rojo; Nitrógenos: Azul. Los compuestos están nombrados de A-G: A. DEET, B. IR3535, C. Acetato de geranilo, D. Farnesol, E. Nerolidol, F. Quercetina, G. Xantona. Las interacciones proteína ligando tipo puente de hidrógeno están representados por líneas discontinuas amarillas y las interacciones tipo π - π por líneas discontinuas azules

El receptor Orco, es el encargado de liberar la proteína G que activa la apertura de los canales iónicos y permite el paso de los iones. Es por esto que este receptor, es de importancia para el análisis computacional, ya que nos permitió evidenciar cuales compuestos favorecen la interacción y podrían generar la inhibición de la molécula de amoniaco. Por otro lado, al ser el encargado de recibir la molécula de olor una vez la proteína odorante la haya transportado, se realizó el análisis de los resultados con los compuestos seleccionados para cada proteína, los cuales

fueron: acetato de geranilo, farnesol, nerolidol, quercetina y xantona; evidenciar el tipo de interacciones que presentaron los compuestos al estar en presencia del pocket del receptor .

Una vez analizados las diferentes interacciones para cada proteína odorante y el receptor Orco, se procedió a realizar los ensayos experimentales mediante la técnica de electroantenografía para poder determinar si estos compuestos generan alteraciones en el sistema olfativo y a su vez, esto permitiría la validación de la interacción encontrada en la fase *In silico*.

4. Análisis *In vivo* de compuestos con posible actividad repelente por medio de la técnica electroantenografía.

Con los compuestos seleccionados en el capítulo anterior, se realizaron pruebas de electroantenograma como descrito a continuación.

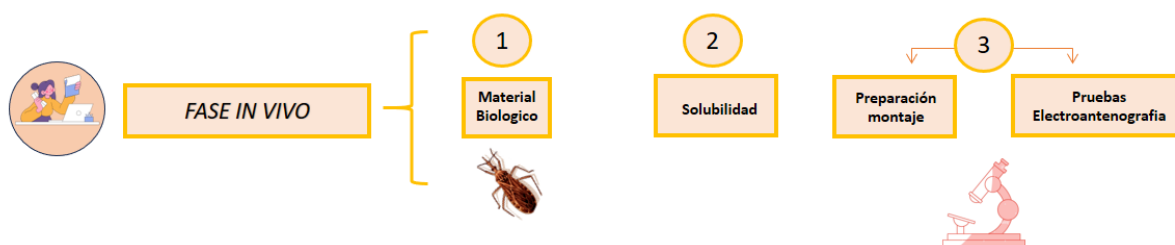
4.1 Metodología

En este capítulo se validó lo recopilado en la fase *In silico*, en donde por medio de la técnica de electroantenografía se pudo establecer si los compuestos inducen alteraciones en la respuesta sensorial eléctrica del insecto. A su vez, en este apartado, se logró identificar si los compuestos seleccionados en la fase *In silico* podrían presentar un mecanismo similar al control positivo (IR3535) como repelente. En la figura 20 se describe la metodología implementada para esta

sección, en donde se tuvo en cuenta las condiciones del material biológico, las solubilidades del compuesto y la preparación adecuada del montaje.

Figura 20.

Metodología Fase In vivo



4.1.1 Material biológico

Los ensayos de bioactividad se llevaron a cabo con una colonia de Triatominos, especie *Rhodnius prolixus*, dispuesta en frascos de seguridad a temperatura de $26 (\pm) 3^{\circ}\text{C}$, humedad de $75 (\pm) 4\%$ y oscuridad total durante 24h. La colonia se alimentó con sangre de gallina de la especie *Gallus Gallus* facilitadas por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, en una frecuencia de cada 15 días para poder mantener la disponibilidad de material biológico. A su vez, se determinó la solubilidad de los compuestos acetato de geranilo, farnesol, nerolidol, quercetina y xantona con la acetona, el cual es el disolvente implementado en la electroantenografía.

4.1.2 Preparación del montaje y registros electroantenográficos

Para poder evaluar la respuesta eléctrica proveniente de la antena del triatomino ante la exposición de los compuestos de interés, repelentes convencionales y atrayentes, se tomaron insectos adultos *Rhodnius Prolixus* con mínimo 30 días de ayuno. Este se posicionó sobre una base de plastilina el cual ase le suministraba una leve presión encima con plastilina para poder inmovilizarlo. En esta base el vector mantenía su cabeza y antena fuera de cualquier contacto con la plastilina, para poder facilitar el manejo del montaje experimental. Para poder detectar las señales, se requería insertar dos electrodos de Tugsteno, un electrodo de referencia en el ojo expuesto y el electrodo de registro que se insertó en la antena contraria al de referencia. Estos electrodos, para poder ser óptimos y facilitar el manejo e inserción en el insecto, previamente fueron afilados mediante inmersión de la punta en una solución de hidróxido de sodio NaOH 1M, (Olsson & Hansson, 2013). Además, la antena del triatomino se posicionó cuidadosamente dentro de un tubo con el propósito de dirigir el flujo de aire proporcionado por una bomba (Stimulus controller unit, tipo CS-55, Syntech, Alemania) hacia la antena y así prevenir la dispersión del olor, garantizando una captación efectiva por parte del insecto. La configuración de la bomba de flujo de aire se estableció mediante una secuencia de tres ráfagas de aire: un flujo de 25 mL/s durante 10 segundos en cada ráfaga, con intervalos de 2 segundos para el flujo de aire conteniendo los compuestos repelentes y 8 segundos con solo aire (background). Las señales antenográficas se amplificaron (1000x) con un preamplificador (Universal Single Probe, type PRS-1, Syntech, Alemania) y digitalizaron (IDAC4, Syntech, Alemania). Las señales se visualizaron, grabaron y analizaron en un computador utilizando el Software Autospike (Syntech, Alemania)

Los estímulos de aire de amoníaco, acetona y los compuestos a evaluar se realizaron a través de un tubo de ensayo con salida lateral, el cual previamente contenía algodón para disminuir el movimiento del aire dentro de este, junto a la salida lateral, se ubica el papel de filtro el cual contenía los compuestos mencionados, esto con el fin de facilitar el movimiento de las partículas directamente hacia la antena del insecto. El tubo de ensayo se acopló a mangueras de plástico que permitían el recorrido de los compuestos hacia la antena.

Los compuestos acetato de geranilo, farnesol y nerolidol se aplicaron en una pieza de papel filtro en concentraciones del 50% v/v , el atrayente amoníaco al 25% v/v y el repelente de referencia IR3535 al 90% v/v. Los compuestos de interés fueron disueltos en acetona para la liberación, cada uno de los compuestos se aplicaron en volúmenes iguales de 10 microlitros.

En esta primera parte, un insecto fue empleado para realizar 3 réplicas, manteniendo las condiciones de concentración y volumen en cada una de las réplicas. Para cada compuesto se empleó un tubo de ensayo diferente, al igual que los tubos de conexión y la preparación del insecto (un triatomino por réplica, con un número mínimo de réplicas de $N=7$ por experimento). Antes de empezar las pruebas, se suministró un flujo de aire en ausencia de compuestos, para verificar que los electrodos estuvieran en posición correcta y que la antena estuviera posicionada de manera adecuada, así se garantiza que las señales obtenidas fueran referentes a los compuestos y no a un fallo en el montaje.

Antes y después de aplicar cada sustancia repelente, se aplicó un pulso de amoníaco al 25%, una sustancia atrayente para el insecto. Esto se realizó con el fin de garantizar que el insecto fuese estimulado de forma eficaz con los compuestos durante todo el experimento y observar el cambio en la señal electroantenográfica. En el caso de los compuestos repelentes, como control positivo se empleó el repelente sintético IR3535. Para el montaje, se realizó la liberación

simultánea de amoniaco y repelente. Para esto, se emplearon los compuestos individuales acetato de geranilo, nerolidol y farnesol, primero se realizó un estímulo de amoniaco al 25% (Pre amoniaco), seguido de la liberación simultánea de compuesto y finalmente nuevamente se le suministro amoniaco (Post amoniaco) en las mismas condiciones.

Cabe resaltar, que las respuestas electroantenográficas se tomaron de a 3 réplicas por insecto, por ende, las respuestas no tendrían un posible comportamiento entre insecto al momento de suministrarles el amoniaco inicial, eso es debido a que cada insecto tiene la capacidad de captar la molécula de manera independiente. Así mismo, para garantizar que los resultados mantuvieran las mismas condiciones de estudio, se visualizaba detalladamente el posicionamiento entre réplica tanto del electrodo como de la antena, ya que al momento de cambio entre réplicas, podrían presentarse fluctuaciones en el montaje que podrían alterar las señales y en dado caso, se reiniciaría el experimento para poder mantener las condiciones en cada una de las réplicas.

4.1.3 Análisis estadísticos

Las respuestas eléctricas obtenidas mediante el equipo de electroantenografía se expresaron en valores de amplitud en microvoltios (μV) en respuesta a cada impulso de aire contenido en las moléculas evaluadas. Se procedió a comparar las señales de electroantenografía, observando los cambios en la escala de mV o μV , en relación al amoníaco antes y después de la aplicación del repelente.

Los resultados fueron sometidos a pruebas de normalidad, incluyendo los tests de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Si los datos seguían una distribución paramétrica, se utilizaron pruebas de comparación de medias, empleando el test t de Student cuando fue necesario.

Cuando los datos no presentaron una distribución normal, se aplicaron pruebas no paramétricas como la prueba de Mann-Whitney. Las comparaciones se consideraron estadísticamente significativas si el valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el software GraphPad Prism 5.

4.2 Resultados solubilidad

Los compuestos quercetina y xantona, aunque fueron seleccionados a lo largo del estudio *in silico* no se probaron en la fase experimental, debido a que son insolubles en acetona. En el caso de la xantona, se realizaron diferentes pruebas de solubilidad con otros solventes como heptano, isopropano y diclorometano. Este último, logró una disolución de la xantona en una concentración máxima del 13%, a pesar de esto, se decidió en este estudio evaluar los compuestos que presentan solubilidad directa con acetona, sin cerrar la posibilidad de realizar posteriores ensayos con la xantona, ya que fue el compuesto con interacciones prometedoras a lo largo de la investigación.

La quercetina presentó una solubilidad máxima de 1.19% en acetona, concentración baja para este bioensayo, aunque se presente una solubilidad en el solvente estándar, se decidió no evaluar su actividad en el sistema olfativo debido a su baja concentración, sin embargo, se considera la posibilidad de estudiar su comportamiento dentro del sistema olfativo del insecto, ya que ésta molécula presenta múltiples interacciones de carácter fuerte con las proteínas odorantes y el receptor activando el interés ante su comportamiento inhibitorio o potenciador en el sistema de recepción de odorantes.

4.3 Resultados Electroantenografía

Como paso inicial se realizó la estandarización del solvente acetona, para poder evidenciar si éste compuesto presentaba o no variaciones (estadísticamente significativas) en el sistema olfativo del insecto, y a su vez, permitir su uso como control negativo ante la ausencia de cambios en el post amoniaco. En los resultados obtenidos (Figura 21,a ; Apendice B) se observó los valores en microvoltios de manera independiente en el pre amoniaco y post amoniaco, en donde las variaciones fueron significativas con respecto al promedio de los datos, sin embargo, en la Figura 21,b, se tomó en cuenta los valores estandarizados en porcentaje con respecto al cambio que ocurre una vez suministrado el compuesto acetona (post amoniaco), esto se realizó tomando el valor inicial de amoniaco registrado (pre amoniaco) como el valor del 100% y se determinó el porcentaje de variación del amoniaco una vez suministrado el flujo de aire de la molécula (post amoniaco) teniendo como base el valor pre.

Las amplitudes tuvieron un comportamiento paramétrico según la prueba de normalidad de shapiro y kolmogorov, posteriormente se les realizó el análisis de varianza con las amplitudes de las señales (Imagen 22) pre y post tratamiento y no tuvieron unas diferencias estadísticamente significativas (T student $p < 0.05$), por lo cual se determinó que el compuesto acetona no genera cambios en el sistema olfativo del insecto indicando su uso como solvente de los compuestos de interés y su carácter referente como control negativo.

Figura 21.

Registro de señales electroantenograficas expresado en a) milivoltios b) porcentaje.

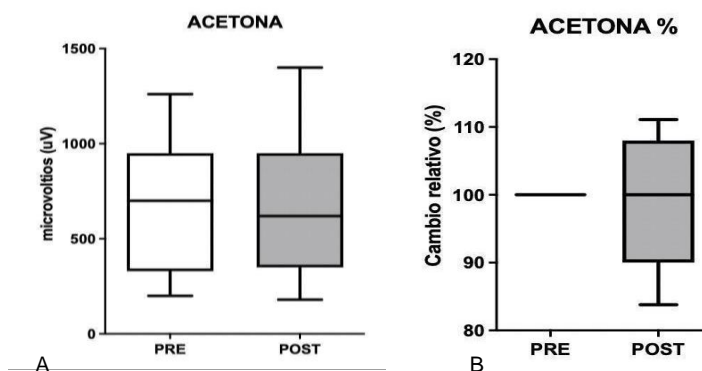
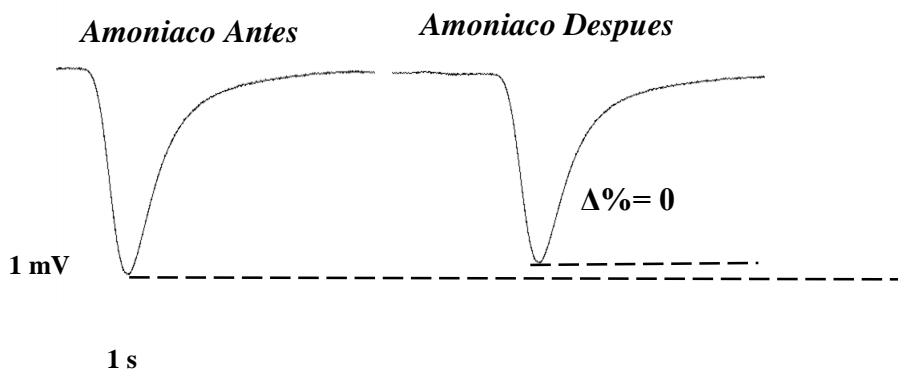


Figura 22.

Señal electroantenografica de referencia y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar el compuesto acetona.



En la figura 23 se observan los valores de las amplitudes de las respuestas electroantenográficas de la media con el error del desvió tanto para los valores crudos para el acetato de geranilo (Figura 23 A; Apéndice C) como con la normalización porcentual (Figura 23,B) en donde se observó una disminución significativa de aproximadamente el 50% en las señales

post tratamiento ($p < 0,05$). En la figura 24, se puede visualizar la señal obtenida al realizar la prueba pre y post tratamiento.

Figura 23.

Gráfico de datos de media con error estándar para el Acetato de geranilo b) Gráfica de media con error estándar para el cambio porcentual del acetato de geranilo. (*) indica diferencias significativas a un 5% ($P < 0.05$), (***) para designar diferencias significativas al 0,1% ($P < 0.001$) entre las señales EAG de amoniacó antes y después de aplicar la molécula ($P < 0,05$, prueba Mann-Whitney)

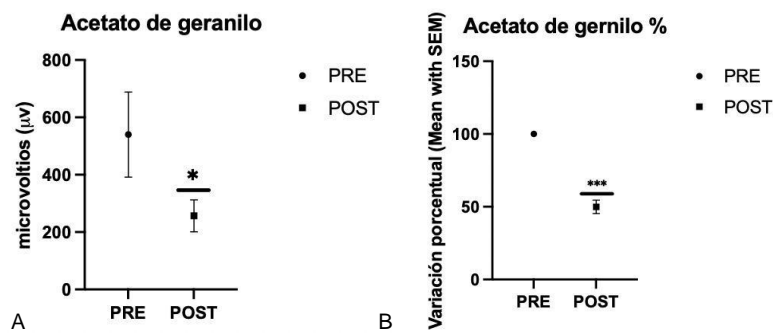
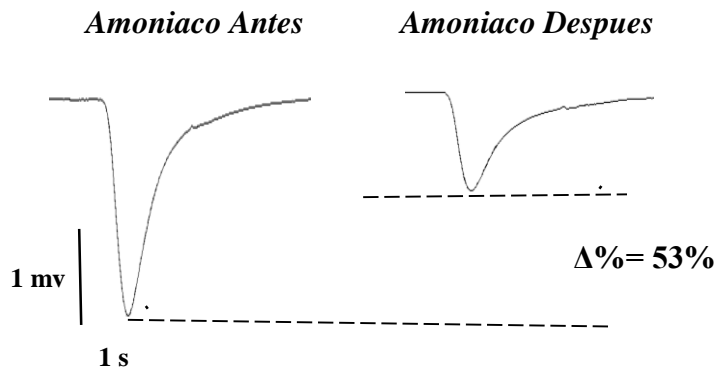


Figura 24

Señal electroantenoográfica de referencia y cambios porcentuales en la señal de amoniacó al aplicar el compuesto Acetato de geranilo al 50%.



El siguiente compuesto al cual se le evaluó la señal electroantenográfica fue el farnesol (Apendice C), la figura 25 A, presenta los valores de las amplitudes registradas por insecto y por cada réplica realizada, a su vez la figura 25 B, presenta valores de variación porcentual con respecto al cambio presentado en el post tratamiento, tomando como el valor de pre tratamiento como el 100% (Valor de referencia). Los datos tuvieron un comportamiento no paramétrico y una vez realizado el análisis de normalización, se realizó el análisis estadístico de varianza lo cual determinó que hay una diferencia significativa entre el pre y post tratamiento (Mann Whitney $P < 0.05$) . La figura 26 presenta la visualización de las señales obtenidas durante el experimento al estar en contacto el insecto con la molécula de amoniaco pre y post tratamiento.

Figura 25.

*Registro de señales electroantenográficas expresado en a) milivoltios b) porcentaje. (media con error estándar). (***) para designar diferencias significativas al 0,1% ($P < 0.001$) entre las señales EAG de amoniaco antes y después de aplicar la molécula ($P < 0,05$, prueba Mann-Whitney)*

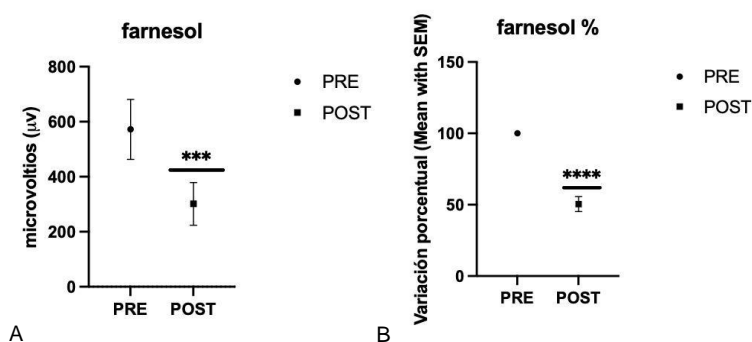
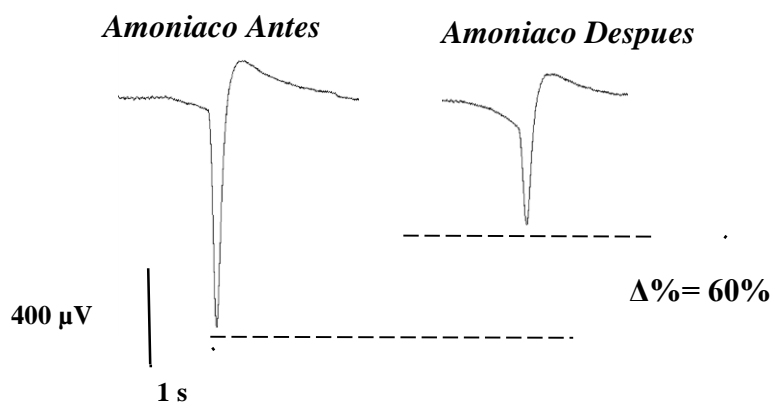


Figura 26.

Señal electroantenográfica de referencia y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar el compuesto farnesol al 50%



Por último, el compuesto nerolidol presentó variaciones en el tratamiento cercanas al 50%, la figura 35 A, presenta los valores de las amplitudes registradas por insecto y por cada réplica realizada (Apendice C), a su vez la figura 35 B, presenta valores de normalización en porcentaje referente al cambio presentado en el post tratamiento, tomando como el valor de pre tratamiento como el 100% (Valor de referencia). Estos valores obtenidos se analizaron independientemente cada réplica e insecto, en donde tanto los valores de las amplitudes en microvoltios como en porcentaje presentaron comportamientos de disminución significativamente con respecto al pre tratamiento ($p < 0,05$) para tanto los valores independientes como para la normalización en porcentaje. Esto último, determinó que el nerolidol, presentó diferencias estadísticamente significativas en la captación de amoniaco una vez suministrado el compuesto.

Figura 27.

Registro de señales electroantenográficas expresado en a) milivoltios b) porcentaje. (Media con error estándar) (***) para designar diferencias significativas al 0,1% ($P < 0.001$) entre las señales EAG de amoniaco antes y después de aplicar la molécula ($P < 0,05$, prueba T student)

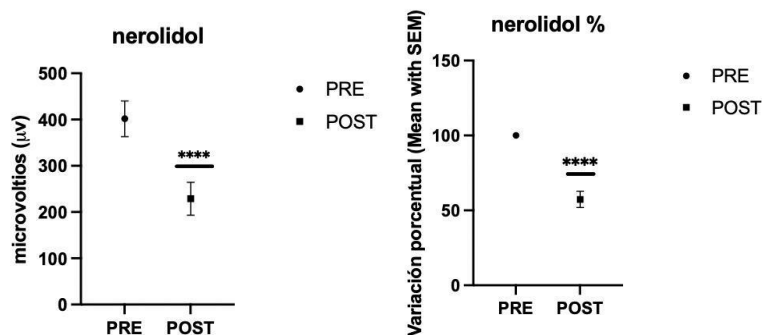
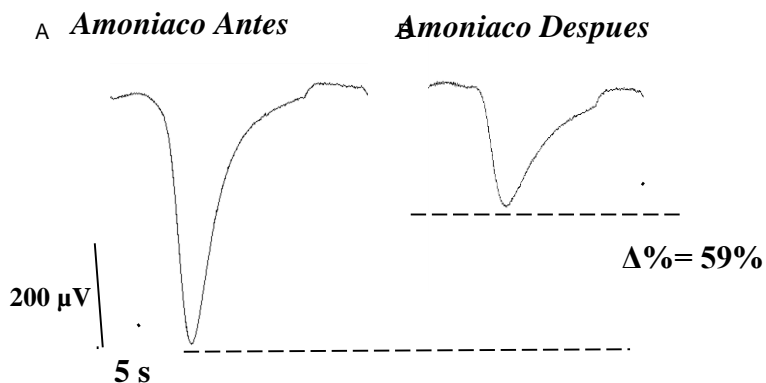


Figura 28.

Señal electroantenográfica de referencia y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar el compuesto nerolidol al 50%.



Para el compuesto de referencia IR3535, la figura 37 A, presenta los valores de las amplitudes registradas por insecto y por cada réplica realizada (Apendica B), a su vez la figura 37 B, presenta valores de normalización en porcentaje referente al cambio presentado en el post

tratamiento , tomando como el valor de pre tratamiento como el 100% (Valor de referencia) . En el IR3535 se realizaron pruebas al 90% donde su comportamiento fue paramétrico y seguidamente se realizó el análisis de varianza la cual presentó diferencias estadísticamente diferentes pre-post tratamiento ($p < 0,05$).

Figura 29.

*Registro de señales electroantenoográficas expresado en a) milivoltios b) porcentaje. (Mean with SEM) (***) para designar diferencias significativas al 0,1% ($P < 0.001$) ($P < 0,05$, prueba Mann-Whitney)*

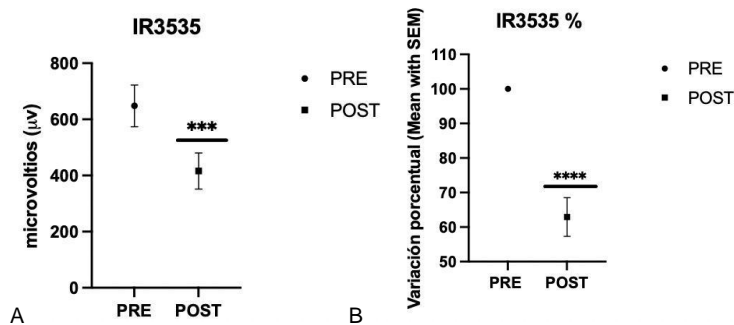
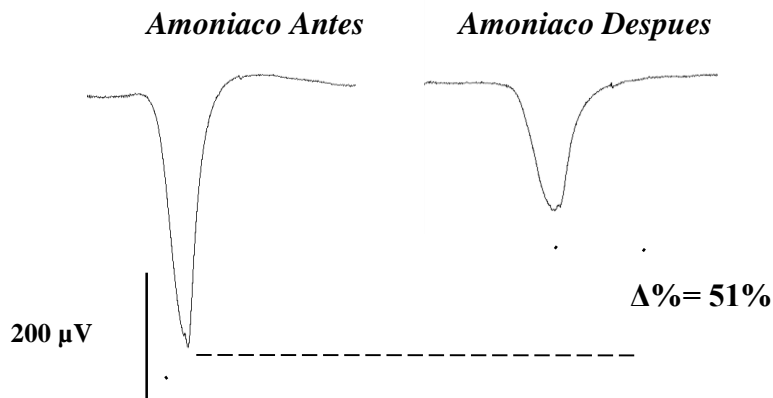


Figura 30.

Señal electroantenoográfica de referencia y cambios porcentuales en la señal de amoniaco al aplicar el compuesto IR3535 al 50%.



5. Discusión de resultados

En esta investigación se estudió la relación entre el uso de la técnicas *in silico* y el electroantenograma, para poder determinar si la implementación de estas técnicas podría facilitar el estudio y selección de moléculas con posible actividad repelente. Ante esto, la técnica de electroantenografía y los resultados del screening permitieron interpretar el posible comportamiento del sistema olfativo del insecto vector ante diferentes compuestos, para de esta manera crear un sistema de discriminación de las moléculas. Los resultados obtenidos durante el screening virtual de las proteínas odorantes 6-14-22-23 y el receptor Orco, indicaron que los compuestos acetato de geranilo, farnesol, nerolidol, quercetina y xantona interaccionan de manera espontánea con las proteínas odorantes y el receptor Orco. Así mismo, estos resultados determinaron que las interacciones presentes de estos compuestos se encontraban semejantes en los compuestos de referencia DEET e IR3535, por lo cual se podría decir que se comportan de manera similar dentro del sistema olfativo del insecto. El mecanismo que tendría a cabo la molécula odorante una vez entra en contacto con la antena es incierto, si bien hay varias hipótesis sobre los mecanismos, los cuales pueden ser: Que el compuesto de interés sea transportado por la OBP dentro de la linfa sensiliar y este interactúe con el receptor Orco activando canales iónicos para para entrada y salida de iones, generando un potencial de la membrana. También está planteada la hipótesis de que los compuestos pueden transportarse por sí solos por la linfa sensiliar e interaccionar directamente con el receptor ya que su afinidad de carácter hidrofílico les permite viajar sin problema dentro de la linfa sensiliar. En este trabajo, los compuestos presentan características hidrofóbicas e hidrofílicas, lo cual podría dificultar su transporte por la linfa

sensiliar y sería necesario la intervención de la proteína odorante para poder llegar al receptor (Dickens & Bohbot, 2013; Shrestha & Lee, 2020).

En la fase experimental se analizaron la respuesta pre y post amoniaco en presencia del compuesto de interés, en donde una disminución en su señal se considera como la inhibición de la recepción del sistema olfativo ante el amoniaco, o podría deberse a una inhibición de detección dentro de la neurona, al estar interaccionando inicialmente el compuesto imposibilitando que el amoniaco interaccione con los receptores disminuyendo su acercamiento al huésped (Dickens & Bohbot, 2013; Pellegrino, et al., 2011; Sanford, et al., 2013). Para corroborar que la disminución de amoniaco era ocasionada por el compuesto a tratar, se realizó inicialmente una prueba electroantenográfica con acetona, en donde se verificó que la acetona no tenía una variación en las señales obtenidas. Lo anterior, confirmó que la disminución de la señal de amoniaco era responsable únicamente por la exposición del triatomino a las sustancias (Reisenman, 2014).

Por otro lado, la señales obtenidas por los compuestos permitieron determinar que aunque bloquean los receptores y proteínas odorantes, no activan en igual proporción los canales iónicos, permitiendo un paso menor de iones a través de la membrana y a su vez, teniendo una disminución en el cambio de voltaje neuronal y por ende su respuesta electroantenográfica no era tal como la mostrada en el amoniaco (Wicher, 2015).

Aunque exista una disminución en la captación de amoniaco una vez suministrado los compuestos acetato de geranilo, farnesol y nerolidol, esto no está del todo comprobado que su actividad *in vivo* sea semejante, para poder aclarar esto, se requieren de pruebas de repelencia posteriores, en donde se exponga al insecto en contacto directo con el compuesto y el cebo para determinar el comportamientos que esté presente (Bohbot & Pitts, 2015; Dickens & Bohbot, 2013)..

6. Conclusiones

A través del cribado virtual, se logró identificar que los compuestos acetato de geranilo, farnesol, nerolidol, quercetina y xantona presentan interacciones de carácter hidrofóbico, polar y π - π con la proteínas odorantes 6,11,13,14,22,23 , así como con el receptor Orco.

Los compuestos acetato de geranilo, farnesol, nerolidol e IR3535 presentaron variaciones estadísticamente significativas en las pruebas de amoníaco post tratamiento a concentraciones de 50% v/v y 90% v/v, respectivamente, con una variación porcentual de mínimo 50 %, significando así que los compuestos lograron alterar el sistema olfativo del insecto y a su vez disminuir la captación de amoniaco.

Las sustancias de origen natural, acetato de geranilo, nerolidol , farnesol y el repelente sintético IR3535 alteran la señal electroantenográfica del insecto *Rhodnius prolixus*, lo que las convierte en candidatos potenciales de compuestos repelentes del insecto.

7. Recomendaciones

Se recomienda realizar las pruebas *In vivo* con los compuestos seleccionados a través de las técnicas *in silico* y de electroantenografía para confirmar su actividad repelente y el tiempo de protección que posiblemente tendrían.

Realizar la prueba de electroantenografía para los compuestos xantona y quercetina, en presencia de diclorometano y acetona, adicionalmente realizar la estandarización del disolvente diclorometano para verificar que este no altere las señales neuronales.

Estudios posteriores podrían mejorar la efectividad realizando mezclas para determinar la presencia de afectaciones a nivel olfativo en el sistema del insecto y si es posible incrementar la disminución de la recepción de atrayentes y disminuir su acercamiento al huésped.

Referencias Bibliográficas

- Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. (2010). *Directrices de prueba de rendimiento del producto OPPTS 810.3700: Repelentes de insectos para aplicar en la piel humana*. Obtenido de <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P100LBO3.txt>
- Aldana, E., Lizano, E., Contreras, F., Valderrama, A., & Viera, D. (2000). Estudio morfológico de estadios ninfales de varias especies del género *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae). *Caldasia* 22 (2), 347-351. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/cal/article/download/17614/18445/56184>
- Álvarez, C., & Fleiz, N. (2017). Las enfermedades transmitidas por vectores y el potencial uso de *Wolbachia*, una bacteria endocelular obligada, para erradicarlas. *Revista UNAM*, 16 (6), 51-55. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=76050>
- Alzogaray, R. (2016). Respuestas conductuales y toxicológicas de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) a los repelentes de insectos DEET e IR3535. *J Med Entomol.* 53, 387–393.
- Anwar, T., Kumar, P., & Khan, A. U. (2021). Modern Tools and Techniques in Computer-Aided Drug Design. *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design*, 1-30. doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822312-3.00011-4>
- Aparoy, P., Kumar Reddy, K., & Reddanna, P. (2012). Structure and Ligand Based Drug Design Strategies in the Development of Novel 5- LOX Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 19(22), 3763–3778. doi:<https://doi.org/10.2174/092986712801661112>
- Arévalo, A., Carranza, J. C., Guhl, F., Clavijo, J. A., & Vallejo, G. A. (2007). Comparación del ciclo de vida de *Rhodnius colombiensis* Moreno, Jurberg & Galvão, 1999 y *Rhodnius prolixus* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomédica*, 27 (Suppl. 1), 119-129. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572007000500013&lng=en&tlng=es

- Badii, M. H., & Garza Almanza, V. (2007). Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos. *CULCyT//Enero–Febrero, Año 4, No 18*. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7116152.pdf>
- Baig, M. H., Ahmad, K., Rabbani, G., Danishuddin, M., & Choi, I. (2018). Computer Aided Drug Design and its Application to the Development of Potential Drugs for Neurodegenerative Disorders. *Current Neuropharmacology, 16(6)*, 740-748. doi:<https://doi.org/10.2174/1570159x15666171016163510>
- Ballón, P., Guadalupe, W., & Grados, R. (2019). Molecular docking: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevas dianas terapéuticas. *Revista CON-CIENCIA, 7 (2)*, 55-72.
- Barrozo, R. B., Reisenman, C. E., uerenstein, P., Lazzari, C. R., & Lorenzo, M. G. (2017). An inside look at the sensory biology of triatomines. *Journal of Insect Physiology 97*, 3-19. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022191016303857?via%3Dihub>
- Beck, J. J., Light, D. M., & Gee, W. S. (2012). Electroantennographic Bioassay as a Screening Tool for Host Plant Volatiles. *J Vis Exp. ; (63)*, 3931. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3466939/>
- Bermúdez Mejía, C. (2016). *Ciclo biológico de T. cruzi*. Obtenido de https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Ciclo-biologico-de-T-cruzi_fig2_336903351
- Bhavsar, K. V., & Yadav, G. D. (2019). Synthesis of geranyl acetate by transesterification of geraniol with ethyl acetate over *Candida antarctica* lipase as catalyst in solvent-free system. *Flavour and Fragrance Journal, 34(4)*, 288–293. doi:<https://doi.org/10.1002/ffj.3502>
- Bino, J., & Sali, A. (2003). Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment. *Nucleic Acids Research, 31*, 3982–92.
- Bohbot, J. D., & Pitts, R. J. (2015). The narrowing olfactory landscape of insect odorant receptors. *Frontiers in Ecology and Evolution, 3*, 1–10. doi:<https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00039>
- Bravo, G. (2020). *Análisis bioinformático del acoplamiento de HYNIC-CXCR4-L con el receptor específico quimiocina-4 y determinación del perfil biocinético dosimétrico del ^{99m}Tc-*.

- Carey, A. F., Wang, G., Chih-Ying, S., Zwiebel, L. J., & Carlson, J. R. (2010). Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature* 464, 66–71. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/nature08834>
- Castillo, D., & Wolff, M. (2000). Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera : Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomedica*, 20(1), 59–64.
- Cazorla-Perfetti, D. (2016). Revisión de los vectores de la enfermedad de chagas en Venezuela (Hemiptera-heteroptera, reduviidae, triatominae). *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 28 (3), 387-470. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/4277/427750771003/html/>
- Cevallos, A. M., & Hernández, R. (s.f.). *Trypanosoma cruzi y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*. Obtenido de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap15/capitulo.html>
- Chaïka, S. (1980). Ul'tratsrukturna antennal'nykh sensill klopa *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) [Ultrastructure of the antennal sensillae of the bug, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae)]. *Parazitologiya. Nov-Dec; 14(6)*, 486-92. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7007992/>
- Chen, F., Sun, H., Wang, J., Zhu, F., Liu, H., Wang, Z., . . . Hou, T. (2018). Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 8. Predicting binding free energies and poses of protein-RNA complexes. *RNA (New York, N.Y.)*, 24(9), 1183–1194. doi:<https://doi.org/10.1261/rna.065896.118>
- Coura, J. R., Dias, J. C., Frasc, A. C., Guhl, F., Lazzari, J. O., Lorca, M., . . . Zingales, B. (2002). Control of Chagas disease. *World Health Organization - Technical Report Series*, 905, 1–99. doi: [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90338-x](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90338-x)
- Coura, J., Junquera, A., Fernandes, O., Valente, A., & Miles, M. (2002). Emerging Chagas Disease in the Amazonian Brazil. *Trends in parasitology*, 18(4), 171-176. doi:[https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)02200-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02200-0)
- Da Costa, K., Galúcio, J., Da Costa, C., Santana, A., Dos Santos, V., Do Nascimento, L., . . . Lameira, J. (2019). Exploración de la potencialidad de los productos naturales de los aceites esenciales como inhibidores de proteínas de unión a olores: un enfoque de detección virtual basado en estructura y ligando para encontrar nuevos repelentes de mosquitos. . *ACS Omega*. 4 (27, 22475-22486.

- David, A., Islam, S., Tankhilevich, E., & Sternberg, M. J. (2022). The AlphaFold2 Database of Protein Structures: A Biologist's Guide. *Journal of Molecular Biology*, *434*(2), 167336. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167336>
- Delmondes, G. D., Santiago Lemos, I. C., Dias, D. D., Cunha, G. L., Araújo, I. M., Barbosa, R., . . . Kerntopf, M. R. (2020). Pharmacological applications of farnesol (C15H26O): a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* *30* (3) , 227–234. doi:<https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1718653>
- Devillers, J., Lagneau, C., Lattes, A., Garrigues, J. C., Clémenté, M. M., & Yébakima, A. (2014). In silico models for predicting vector control chemicals targeting *Aedes aegypti*. *SAR and QSAR in Environmental Research*, *25*(10), 805–835. doi:<https://doi.org/10.1080/1062936X.2014.958291>
- Dias, R., & De Azevedo, W. F. (2008). Molecular docking algorithms. *Current drug targets*, *9*(12), 1040–1047. doi:<https://doi.org/10.2174/138945008786949432>
- Diehl, P. A., Vlimant, M., Guerenstein, P., & Guerin, P. M. (2003). Ultrastructure and receptor cell responses of the antennal grooved peg sensilla of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Arthropod Structure & Development* *31* (4), 271-285. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1467803903000045?via%3Dihub>
- Domínguez Cuadrado, A. (2018). *Estudios dirigidos a la ecología química de insectos plaga mediante semioquímicos*. Universitat de Barcelona. Obtenido de <https://www.tesisenred.net/handle/10803/482166>
- Dujardin, J.-P., Schofield, J., & Panzera, F. (2002). *Los vectores de la enfermedad de Chagas*. Bruxelles: Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, 25, (Mémoire in-8°. Nouvelle Série ; 3). Obtenido de https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers20-12/010055328.pdf
- Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V., & Mee, R. P. (1997). Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *11*(5), 425-445. doi:<https://doi.org/10.1023/a:1007996124545>
- Ento, E., Mojica, M., Alzogaray, R. A., Reynoso, M. M., Mengoni, S., Pinto, C. F., . . . Echeverría, H. M. (2021). Actividad repelente de tres aceites esenciales contra *triatoma infestans* klug

- (hemiptera: reduviidae). *Bio Scientia*, 4(E), 14-15. Obtenido de <https://revistas.usfx.bo/index.php/bs/article/view/634>
- Fazlullah Khan, K. N., Sanches Silva, A., Nabavi, F., Saeedi, M., & Nabavi, S. M. (2020). Chapter 3 - Analysis of polyphenolics. *Recent Advances in Natural Products Analysis, Elsevier*, 39-197.
- Ferreira, L., Dos Santos, R., Oliva, G., & Andricopulo, A. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20, 13384–421.
- Fiser, A., & Sali, A. (2003). Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods in enzymology*, 374, 461–491. doi:[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)74020-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)74020-8)
- Franco, T., Xu, P., Brito, N., Oliveira, D., Wen, X., & Moreira, M. (2018). Enfoque basado en la ecología química inversa que conduce al descubrimiento accidental de repelentes para *Rhodnius prolixus* , un vector de enfermedades de Chagas refractario a DEET. *Insecto Biochem Mol Biol*. 103, 46–52.
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., . . . Mainz, D. T. (2006). *Extra precision glide: docking and scoring*.
- Fuentes, A., Fresno, M., Santander, H., Valenzuela, S., Gutierrez, M., & Miralles, R. (2011). Sensopercepción olfatoria: Una revisión. *Revista médica de Chile* 139 (3), 362.367. Obtenido de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872011000300013
- Gancedo, J. M. (2017). *Efecto de repelentes sintéticos y naturales en el comportamiento de la cucaracha alemana Blattella germanica (Dictyoptera: Blattellidae)*. [Tesis] Universidad de Buenos Aires. Obtenido de https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/seminario/seminario_nBIO001607_Gancedo.pdf
- García-Gutiérrez, C., & Rodríguez-Meza, G. D. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en sinaloa. *Ra Ximhai*, vol. 8, núm. 3b, septiembre-diciembre, 1-10. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/461/46125177005.pdf>
- Gopal, J. V., & Kannabiran, K. (2013). Studies on interaction of insect repellent compounds with odorant binding receptor proteins by in silico molecular docking approach.

- Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 5(4), 280–285.
doi:<https://doi.org/10.1007/s12539-013-0152-2>
- Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Rev Biomed*; 20, 228-234.
Obtenido de <https://www.revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/139/151>
- Guo, H., & Smith, D. P. (2017). Odorant receptor desensitization in insects. *Journal of Experimental Neuroscience*, 11, 1–5. doi: <https://doi.org/10.1177/1179069517748600>
- 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.
- Harada, T.; Takeda, M.; Kojima, S. & Tomiyama, N. (2016) Toxicity and Carcinogenicity of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) *Toxicol Res.* 32(1): 21–33
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4780236/#:~:text=DDT%20and%20its%20metabolites%20have,in%20correlation%20with%20exposure%20levels>.
- Hernández Carvajal, J. E., Florez Orjuela, Y., & Vallejo, G. A. (2010). Evaluación de la actividad insecticida de *Solanum macranthum* (Dunal) sobre ninfas de los estadios IV y V de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius colombiensis*. *Revista Cubana de Farmacia* 44 (1) . Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152010000100009&script=sci_arttext
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28(6), 1145-1152. doi:<https://doi.org/10.1002/jcc.20634>
- Jacob, V. E. (2018). Current Source Density Analysis of Electroantennogram Recordings: A Tool for Mapping the Olfactory Response in an Insect Antenna. *Front Cell Neurosci.* 12, 287.
Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6135050/>
- Jason Pitts, R., Derryberry, S. L., Zhang, Z., & Zwiebel, L. J. (2017). Variant Ionotropic Receptors in the Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae* Tuned to Amines and Carboxylic Acids. *Scientific Reports*, 7(January), 1–11. doi:<https://doi.org/10.1038/srep40297>
- Jumper, J., Evans, R., & Pritzel, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with Alpha Fold. *Nature* 596, 583–589. doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

- Kadukova, M., & Grudin, S. (2017). Convex-PL: a novel knowledge-based potential for protein-ligand interactions deduced from structural databases using convex optimization. *J Comput Aided Mol Des* 31(10), 943–95. doi:10.1007/s10822-017-0068-8
- Kaupp, U. B. (2010). Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat Rev Neurosci* 11, 188–200. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/nrn2789>
- Kuhlman, B., & Bradley, P. (2019). Advances in protein structure prediction and design. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 681–697. doi: <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0163-x>
- Kwok, Y., & Hurley, L. H. (1998). Topoisomerase II site-directed alkylation of DNA by psorospermin and its effect on topoisomerase II-mediated DNA cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 33020–33026. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.33020>
- Leal, G. M., & Leal, W. S. (2015). Binding of a fluorescence reporter and a ligand to an odorant-binding protein of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *F1000Research*, 3(305), 1–14. doi:<https://doi.org/10.12688/f1000research.5879.2>
- Leal, W. S. (2013). Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 373–391. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>
- Leite, N. R., Krogh, R., Xu, W., Ishida, Y., Iulek, J., Leal, W. S., & Oliva, G. (2009). Structure of an Odorant-Binding Protein from the Mosquito *Aedes aegypti* Suggests a Binding Pocket Covered by a pH-Sensitive “Lid.”. *PLoS ONE*, 4(11), 1–7. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008006>
- Lescure, F. X., Le Loup, G., Freilij, H., Develoux, M., Paris, L., Brutus, L., & Pialoux, G. (2010). Chagas disease: changes in knowledge and management. *The Lancet. Infectious diseases*, 10(8), 556–570. doi:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70098-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70098-0)
- Luminita, C., Funar-Timofei, S., & Borota, A. (2022). Homology Modeling and Molecular Docking Approaches for the Proposal of Novel Insecticides against the African Malaria Mosquito (*Anopheles gambiae*). *Molecules* 27 (12), 3846.
- Lutz, A., Sfara, V., & Alzogaray, R. (2014). Repellence produced by monoterpenes on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) decreases after continuous exposure to these

- compounds. *J Insect Sci. Jan 1;14:254.* Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25525113/>
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Design* 7(2), 146–157. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3151162/>
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2020). *Enfermedad de Chagas*. Obtenido de Minsalud: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/chagas.aspx#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20es%20la%20enfermedad%20de,se%20infectan%20desarrollan%20la%20enfermedad>
- Mnif, W.; Hadj Hassine, A. I.; Bouaziz, A.; Bartegi, A.; Thomas, O. & Roig, B. (2011) Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review *Int J Environ Res Public Health*. Jun; 8(6): 2265–2303 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3138025/>
- Molina, J. A., Gualdrón, L. E., Brochero, H. L., Olano, V., Barrios, D., Guhl, F., . . . Boicotá, D. S. (2000). Distribución actual e importancia epidemiológica de las especies de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomedica. Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 344–360.
- Moretti, A. N. (2015). *Efectos letales y subletales de monoterpenos sobre vectores de Chagas y su posible uso como herramientas de control*. Buenos Aires: [Tesis] Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Obtenido de https://bibliotecadigital.exabctas.uba.ar/greenstone3/exa/collection/tesis/document/tesis_n5773_Moretti
- Moretti, A. N., Zerba, E. N., & Alzogaray, R. A. (2013). Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to 10 monoterpene alcohols. *J Med Entomol.* 50(5), 1046-54. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24180109/>
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods Mol Biol*, 365-82. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18446297/>
- Myers, S., & Baker, A. (2001). Drug discovery: an operating model for a new era. *Nature Biotechnology*, 19, 727-30.

- 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.
- National Center for Biotechnology Information (2023). *PubChem Compound Summary for CID 3589*, *Heptachlor*
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3589#section=Carcinogen-Classification>
- Northey, T., Venthur, H., De Biasio, F., Chauviac, F. X., Cole, A., Ribeiro, K. A., . . . Zhou, J. J. (2016). Crystal structures and binding dynamics of odorant-binding protein 3 from two aphid species *Megoura viciae* and *Nasonovia ribisnigri*. *Scientific Reports*, *6*, 1–13. doi:<https://doi.org/10.1038/srep24739>
- Oliveira, D. S., Brito, N. F., Nogueira, F., Moreira, M. F., Leal, W. S., Soares, M. R., & Melo, A. (2017). Proteomic analysis of the kissing bug *Rhodnius prolixus* antenna. *Journal of insect physiology*, *100*, 108–118. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.06.004>
- Oliveira, D., Brito, N., Franco, T., Moreira, M., Leal, W., & Melo A., C. (2018). Functional Characterization of Odorant Binding Protein 27 (RproOBP27) From *Rhodnius prolixus* Antennae. *Front Physiol.* *9*, 1175. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30210359/>
- Organización Mundial de la Salud. (2022). *Día mundial de la enfermedad de Chagas*. Obtenido de <https://www.who.int/es/campaigns/world-chagas-disease-day/world-chagas-disease-day-2022>
- Organización Mundial de la Salud. (2023). *La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)*. Obtenido de [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Organización Panamericana de la Salud. (s.f.). *Enfermedad de Chagas*. Obtenido de <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
- Parra-Henao, G., Garcia Pajón, C. M., & Cotes Torres, J. M. (2007). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae). *Boletín de malariología y salud ambiental XLVII (1)*.
- Pask, G. M., & Ray, A. (2016). Chapter 6 - Insect Olfactory Receptors: An Interface between Chemistry and Biology. *Chemosensory Transduction*, 101-122. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128016947000068>

- Pelosi, P., Iovinella, I., Felicioli, A., & Dani, F. R. (2014). Soluble proteins of chemical communication: An overview across arthropods. *Frontiers in Physiology*, *5*, 1–13. doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00320>
- Pessoa, G. C. (2015). History of insecticide resistance of Triatominae vectors. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* *48* (4). Obtenido de <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/tD6XKjQykyN4MggdTwbKLVR/?lang=en>
- Pietro, G., De Vivo, M., & 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., Sousa, M. E., & Nascimento, M. S. (2005). Xanthone Derivatives: New Insights in Biological Activities. *Current Medicinal Chemistry (Vol. 12)*.
- Portilla-Pulido, J. S., Castillo-Morales, R. M., Barón-Rodríguez, M. A., Duque, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2020). Design of a Repellent Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Using in silico Simulations With AegOBP1 Protein. *Journal of Medical Entomology* *57* (2), 463–476. Obtenido de <https://doi.org/10.1093/jme/tjz171>
- Portilla-Pulido, J., Castillo-Morales, R., Barón-Rodríguez, M., Duque, J., & Mendez-Sanchez, S. (2020). Design of a Repellent Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Using in silico Simulations With AegOBP1 Protein. *J Med Entomol.* *57*(2), 463-476. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31670811/>
- Prieto-Martínez, F. D., López-López, E., Eurídice Juárez-Mercado, K., & Medina-Franc o, J. L. (2019). Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives. *Silico Drug Design: Repurposing Techniques and Methodologies*, 19–44. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816125-8.00002-X>
- Primer Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas - CICB2021. (2021). *Resúmenes de los trabajos*. Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina de la Universidad Industrial de Santander. Obtenido de <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/14534/13098>
- Raji, J. I., Melo, N., Castillo, J. S., Gonzalez, S., Saldana, V., Stensmyr, M. C., & DeGennaro, M. (2019). *Aedes aegypti* Mosquitoes Detect Acidic Volatiles Found in Human Odor Using the IR8a Pathway. *Current Biology*, *29*(8), 1253-1262.e7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.045>

- Rassi, A. J., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet (London, England)*, 375(9723), 1388–1402. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Reisenman, C. E. (2014). Hunger is the best spice: Effects of starvation in the antennal responses of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*, 71, 8–13. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.09.009>
- Renthal, R. C. (2022). Tunnel connects lipid bilayer to occluded odorant-binding site of insect olfactory receptor. *Biophysical Chemistry*, 289. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2022.106862>
- Rivera, G., & Molina, J. A. (1992). *Uso del aceite esencial de Citronela (Cymbopogon nardus) como repelente natural en refugios de Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)*. Obtenido de Universidad de los Andes: <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/16649/u372087.pdf?sequence=1>
- Robinson, S., Afzal, A., & Leader, D. (2014). Chapter 13 - Bioinformatics: Concepts, Methods, and Data, Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. *Academic Press*, 259-287.
- Safety data sheet (2018) *According to 1907/2006/EC, Article 31* https://assets.lgcstandards.com/sys-master%2Fpdfs%2Fh79%2Fhe8%2F10152589819934%2FSDS_DRE-C10047600_ST-WB-MSDS-2589271-1-1-1.PDF
- Safety Data Sheet (2023) *Fluralaner Solid Formulation* https://www.merck.com/docs/product/safety-data-sheets/ah-sds/Fluralaner%20Solid%20Formulation_AH_US_EN.pdf
- Sagar, A. (2019). *Homology Modeling- Definition, Steps, Diagram, Uses*. Obtenido de Microbe Notes: (). Homology Modeling- Working, Steps, And Uses. The Biology
- Sánchez, A. (2006). *Evolución molecular de los genes del sistema olfatorio " OS-E" y " OS-F" en diferentes especies de Drosophila*. Universidad de Barcelona.
- Schaduangrat, N., Lampa, S., Simeon, S., Gleeson, M. P., Spjuth, O., & Nantasenamat, C. (2020). Towards reproducible computational drug discovery. *Journal of Cheminformatics* 12(1), 1–30. doi:<https://doi.org/10.1186/S13321-020-0408-X>

- Schrödinger, Inc. (2021). *The Advantages of Accurate Receptor Models*. Obtenido de <https://www.schrodinger.com/products/prime>
- Sfara, V., Mougabure-cueto, G., Zerba, E. N., & Alzogaray, R. A. (2011). Adaptation of the repellency response to DEET in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*, *57*(10), 1431–1436. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.009>
- Sfara, V., Zerba, E., & Alzogaray, R. (2009). Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *J Med Entomol.* *46*(3), 511-5. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19496421/>
- Shanmugam, G., & Jeon, J. (2017). Computer-Aided Drug Discovery in Plant Pathology. *The Plant Pathology Journal*, *33*, 529-542.
- Sims, C., Withall, D., Oldham, N., Stockman, R., & Birkett, M. (2022). Computational investigation of aphid odorant receptor structure and binding function. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. doi:<https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2053743>
- Sparks, J. T., Botsko, G., Swale, D. R., Boland, L. M., Patel, S. S., & Dickens, J. C. (2018). Membrane Proteins Mediating Reception and Transduction in Chemosensory Neurons in Mosquitoes. *Front. Physiol.*, *20*. doi:<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01309>
- Steinbrecht, R. A. (2006). Odorant-Binding Proteins: Expression and Function. *ANNALS. https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10591.x. Annals of the New York Academy of Sciences 855 (1), 323-332*. Obtenido de <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10591.x>
- Sulimov, V., Kutov, D., & Sulimov, A. (2020). Advances in Docking. . *Current Medicinal Chemistry*, *42*, 7555-7580.
- Tomar, V., Mazumder, M., Chandra, R., Yang, J., & Sakharkar, M. K. (2019). Small Molecule Drug Design. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 741-760. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20157-x>
- Torres, P. H., Sodero, A. C., Jofily, P., & Silva-Jr., F. P. (2019). Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci.* *20*(18), 4574. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6769580/>

- Toso M, A., Vial U, F., & Galanti, N. (2011). Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile*, *139*(2), 258-266. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000200017>
- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., & et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* *596*, 590–596. doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>
- Varadi, & Met y Col. (2021). Base de datos de estructura de proteínas AlphaFold2: ampliar masivamente la cobertura estructural del espacio de secuencia de proteínas con modelos de alta precisión. *Investigación de ácidos nucleicos*.
- Venthur, H., & Jing-Jiang, Z. (2018). Odorant Receptors and Odorant-Binding Proteins as Insect Pest Control Targets: A Comparative Analysis Herbert Venthur1. *Front. Physiol.*, *24* . Obtenido de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01163/full>
- Wang, T., & Gu, X. (2007). In vitro percutaneous permeation of the repellent DEET and the sunscreen oxybenzone across human skin. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *10*(1), 17–25. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.039>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., . . . Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, *46*(W1), W296-W303.
- WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease & World Health Organization. (2002). *Control de la enfermedad de Chagas : segundo informe del comité de expertos de la OMS*. Obtenido de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42443>
- Wicher, D. (2015). Chapter Two - Olfactory Signaling in Insects. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* *130*, 37-54. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877117314000179?via%3Dihub>
- Wicher, D. y Miazzi, F. (2021) Functional properties of insect olfactory receptors: ionotropic receptors and odorant receptors. *Cell Tissue Res* *383*(1) p. 7-19 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33502604/>
- Wigglesworth, V. B., & Gillett, J. D. (1934). The Function of the Antennae in *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera) and the Mechanism of Orientation to the Host. *J Exp Biol* *11* (2): 1, 20–139. Obtenido de <https://journals.biologists.com/jeb/article/11/2/120/3895/The-Function-of-the-Antennae-in-Rhodnius-Prolixus>

- Wilson, A. L., Courtenay, O., Kelly-Hope, L. A., Scott, T. W., Takken, W., Torr, S. J., & Lindsay, S. W. (2020). The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLoS neglected tropical diseases*, *14*(1), e0007831. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007831>
- Xu, W., Cornel, A. J., & Leal, W. S. (2010). Odorant-Binding Proteins of the Malaria Mosquito *Anopheles funestus sensu stricto*. *PLoS ONE* *5*(10), e15403. Obtenido de <https://www.proquest.com/docview/1292211014?parentSessionId=fCHAZHYQqm%2B%2BuEgg3KUiwKtcPeY2RiwjInxJbnQ6hM%3D&pq-origsite=primo&accountid=29068>
- Yang, C., Chen, E. A., & Zhang, Y. (2022). Protein–Ligand Docking in the Machine-Learning Era. *Molecules*. *27*(14), 4568. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9323102/>
- Yin, J., Choo, Y. M., Duan, H., & Leal, W. S. (2015). Selectivity of odorant-binding proteins from the southern house mosquito tested against physiologically relevant ligands. *Frontiers in Physiology*, *6*(FEB), 1–8. doi:<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00056>
- Yu, W., & MacKerell Jr., A. D. (2017). Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods Mol Biol*. *1520*, 85–106. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5248982/>
- Zermoglio, P., Martin-Herrou, H., Bignon, Y., & Lazzari, C. (2015). Repelentes de olores de *Rhodnius prolixus* : evidencia de comportamiento y prueba de compuestos presentes y potenciales que inducen repelencia en vectores de la enfermedad de Chagas. *Fisiol de insectos J.*; *81*, 137–144.
- Zhang, Q., Grice, J., Wang, G., & Roberts, M. (2009). Cutaneous Metabolism in Transdermal Drug Delivery. *Current Drug Metabolism*, *10*(3), 227–235. doi:<https://doi.org/10.2174/138920009787846350>
- Zhao, J., Li, Z., Zhao, Z., Yang, Y., & Yan, S. (2020). Electroantennogram reveals a strong correlation between the passion of honeybee and the properties of the volatile. *Brain Behav*. *10*(6), e01603. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7303395/>

Apéndices

Apéndice A: Base de datos de 600 compuestos con actividad insecticida, ovicida, larvicida, repelentes, etc.

Metabolito Secundario	Link
Annona muricara azadirach A Mmammea americana R. communis Deltametrina Nicotina Extractos acuosos de los fruos podofilotoxina precoceno y la azadiractina	http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482007000100011
precoceno II	https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00105-7 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3334403/ https://uids-primo.hosted.exlibrisgroup.com/primo-explore/fulldisplay?docid=TN_cdi_doaj_primary_oai_doaj_org_article_88845172f4324f6ba7836dd58eb0f54e&context=PC&vid=UIDS&lang=es_CO&search_scope=uids_completo&adaptor=primo_central_multiple_fe&tab=uids_tab&query=any,contains,Effects%20of%20roallatotoxins%20(precocenes)%20on%20the%20development%20and%20reproduction%20of%20Rhodnius%20prolixus:%20some%20data&mode=Basic
1,8 Cineol Linalool Nerolidol α -terpineol α -selinene β -selinene β -Eudesmol Farnesol β -curcumene 1,8-cineol	https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2019.1631894
Mentona limoneno	https://academic.oup.com/jme/article/46/3/511/859504?login=true
β - solamargina cuscohigrina	http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152010000100009
isofraxidina escoparona azadirachtina	https://tspace.library.utoronto.ca/html/1807/20078/oc95152.html y http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1690-46482007000100011&script=sci_arttext&tlng=pt
pinoresinol	http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1690-46482007000100011&script=sci_arttext&tlng=pt
Cis-epoxiyocimina chrysanthenol 2,6-dimethyl-5,7-octadien-2,3-diol Acetato de crisantenil B-tujona	https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11101-012-9261-5 & https://www.scielo.br/j/mioc/a/b6yn3L55jdwh9pfcMJyk69N/?lang=en&format=pdf

Metabolito Secundario	Link	
Acetato de sabinil		
sabineno		
Carvona		
mentol		
Carveol		
iso-mentona		
piperitona		
pulegona		
terpinen-4-ol		
Óxido de piperitona		
Carvacrol		
p-cimeno		
Timol		
y-terpinona		
Piretrina I		https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27113321/
α-chaconina		http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152010000100009
α-solanina	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022191016300816 & https://www.redalyc.org/pdf/856/85615232007.pdf	
α-pineno		
β-Pineno	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022191016300816 & https://www.redalyc.org/pdf/856/85615232007.pdf	
elemol(alcohol sesquiterpénico)		
Eugenol	https://academic.oup.com/jme/article-abstract/50/5/1046/904409	
Geranodiol		
Citronelol		
trans-cinamaldehido	http://convite.cenditel.gob.ve/revistaclac/index.php/revistaclac/articulo/view/880	
cinamil acetato	http://convite.cenditel.gob.ve/revistaclac/index.php/revistaclac/articulo/view/880	
1- Dodecanol		
Canatoxina	https://scholar.google.com.co/scholar?q=doi:10.1016/j.jinsphys.2008.12.002&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar	
Giraniol	https://scholar.google.com.co/scholar?q=insecticide+rhodnius+prolixus&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar#d=gs_qabs&u=%23p%3DqC6xqQlcgoUJ	
Kaempferol	https://www.scielo.br/j/ne/a/dJSz8HR74BKdjD5J46DxYpN/?lang=en&format=html#	
Cumarina		
Acetato de Mentilo	https://academic.oup.com/jme/article-abstract/46/3/511/859504	
α-cadinol	https://www.scielo.br/j/aabc/a/MYz9XK3rnp6SswGH7nGPYKw/?lang=en&format=html#ModalTablet01	
β-cariofileno		
isodauceno		
β-elemeno		
acetato de farnesilo		
silvestreno		
Meliartenina	https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/509/425	
meliantrol		
melianol		
meliacin		
Annonacina	http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482007000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es y https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/509/425	
2-feniletanol	http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572017000600224	
2-mercaptoetanol		
jasmonato de metilo		
alfa-pineno,3-careno		

Metabolito Secundario	Link
1,8 cineol	
carvona, limoneno	
carvacrol	
carvacrol,p-cineno	
alfa-tujona	
timol	
alfa-tujona	
oxido de piperitenona	
oxido de piperitenona	
oxido de piperitenona	
rotundifolona	
sabineno	
timol, alfa-felandreno	
linalo, metil eugenol	
eugenol	
piperitona, fenchona	
trans-anetol	
alfa-pineno, beta-pineno	
beta-cariofileno	
beta-pinen, germacreno D, alfa - pineno	
croweacina, beta-cariofileno	
alfa-pachuleno, alfa-gualeno	
confertifolin	
2-undecanona, 2-undecanona, 2-nonanona,2-nonanona,2-undecanona	
gualol, eudesmol	
oxido de cariofileno	
viridiflorol	
carvacrol, gamma-terpineno	
beta-mirceno, 2-undecanona	
beta-pineno, piperitenona	
eugenol	
piperitona	
trans-anetol	
metil-chavicol	
trans-ocimenona	
alfa-pineno,acetarto de bornilo	
2-tridecanona, 2. undecanona	
timol, borneol	
timol, p-cimeno, timol,timo,o-cimeno	
umbelulona	
silvestreno	
1,8-cineol	
metil-heptil-cetona	
1,8-cineol	
zingibereno	
crisantenona,borneol	
trisulfuro de dimetilo	
trisulfuro de dimetilo	
trisulfuro de dimetilo	
alfa-pineno	
alfa-pineno. p-cimeno	
beta-cariofileno, beta-pineno	

Metabolito Secundario	Link	
limoneno		
ND		
Alcanfor, eucaliptol		
metil eugenol, safrol		
metil eugenol		
alfa-asarona, sabineno		
borneol, germacreno o D		
linalo, gamma-elemeneno		
acetato de bencilo, linalol		
alfa-humuleno		
carvona		
cinamaldehido, propanol benceno		
limoneno, beta-pireno		
limoneno, beta-pireno, limoneno		
limoneno, beta-pireno		
limoneno		
limoneno, beta-pireno, limoneno, mirceno, limoneno		
beta-pineno, sabineno, germacreno D, estragol		
TIMOL, TERPINEN-4-OL		
turmerona aromatica		
limoneno, 3-careno		
sabineno, beta-pineno		
alfa-pineno, 3-careno		
acetato de farnesilo		
alfa-pineno, p-cimeno, alfa-felandreno		
citronelal, citronelol		
alfa-pineno, beta-pineno		
1,8-cineol, p-cimeno		
beta-filandreno, 1,8-cineol		
1,8-cineol, alfa-pineno, oocimeno cis		
trans-anetol, aldehido anisico, trans-anetol, limoneno		
oxido de cariofileno		
beta-eudesmol		
beta-pineno, alfa-pineno		
cis-p-menth-2-en-1-ol		
safrol-miristicina		
Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT)		Salud, O. P. de la. (1964). Insecticidas para el control de insectos de importancia en salud pública. Publicación Científica;108. https://iris.paho.org/handle/10665.2/1150
Dicloro-difenil-dicloroetano (DDD)		
Metoxicloro		
Clorobencilato		
Dilán		
di(p-cloro-fenil) metilcarbonil		
Hexacloruro de benceno		
Lindano		
Clordano		
Heptacloro		
Aldrín		
Deldrín		
Isodrín		
Endrín		

Metabolito Secundario	Link	
Toxafeno		
Képone		
Bayer 29493 (Entex)		
DDPV		
Diazinón		
Dibrom		
Dimetoato		
Dipterex		
Malatión		
Paratión		
Ronel		
Tiocianato de laurilo		
Letano		
Tanita		
Dinitrofenol		
DNOC		
DNOCHP		
DNOSBP		
Difenfilamina		
Azobenceno		
Karatano		
Prolán		
Bulán		
Dinitronaftol		
Dinitroanisol		
Dinitrocresilato		
Isolán		
Dimetilán		
Lausetto neu		
Fenotiazina		
Sevin		
Aramita		
Genitol		
Ovex		
Sulfenona		
Naftalina		
Paradiclorobenceno		
Abamectina		Mondragón Aguilar, J. (2002). Insecticidas. Retrieved 20 August 2021, from http://www.csr servicios.es/LABORATORIO/DESCARGAS/LOS_I NSECTICIDAS_LECTURA_AVANZADA.pdf
Alosamidina		
Doramectina		
Emamectina		
Eprinomectina		
Ivermectina		
Milbemectina		
Selamectina		
Thuringiensina		
Clorfenapir		
Bendiocarb		
Carbarilo		
Benfuracarb		
Carbofurano		
Carbosulfano		

Metabolito Secundario	Link
Decarbofurano	
Furatiocarb	
Dimetan	
Hiquincarb	
Pirimicarb	
Alanicarb	
Aldicarb	
Aldoxicarb	
Butocarboxim	
Butoxicarboxim	
Metomilo	
Nitrilacarb	
Oxamilo	
Tazimcarb	
Tiocarboxima	
Tiodicarb	
Tiofanox	
Alixicarb	
Aminocarb	
Bufencarb	
Butacarb	
Icarbanolato	
Cloetocarb	
Dicresilo	
Dioxacarb	
EMPC	
Etiofencarb	
Fenetacarb	
Fenobucarb	
Isoprocarb	
Metiocarb	
Metolcarb	
Mexacarbato	
Promacilo	
Promecarb	
Propoxur	
Trimetacarb	
Xilicarb	
Acrilonitrilo	
Disulfuro de Carbono	
Tetracloruro de Carbono	
Cloroformo	
Cloropicrina	
p-diclorobenceno	
1,2-dicloropropano	
Formiato de etilo	
Dibromoetileno	
Dicloroetileno	
Óxido de etileno	
HCN	
Bromuro de metilo	
Metilcloroformo	

Metabolito Secundario	Link
Cloruro de metileno	
Fosfina	
Sulfurilo	
Tetracloroetano	
Bistriflurona	
Buprofezina	
Clorofuazurona	
Ciromazina	
Diflubenzurona	
Flucicloخورona	
Flufenoxurona	
Hexaflumurona	
Lufenurona	
Novalurona	
Noviflumurona	
Penflurona	
Teflubenzurona	
Triflumurona	
Epofenonano	
Fenoxicarb	
Hidropreno	
Kinopreno	
Metopreno	
Piriproxifeno	
Tripreno	
Cromafenozida	
Halofenozida	
Metoxifenozida	
Tebufenozida	
Diciclanilo	
Diofenolano	
Clorbicicleno	
Clordecona	
Dilor	
Dieldrín	
HEOD	
HHDN	
Isobenzano	
Kelevan	
Mirex	
Flonicamida	
Clotianidina	
Dinotefurano	
Tiametoxam	
Cloretoxifos	
Metil-O-demeton	
IPSP	
Disulfoton	
Oxidisulfoton	
Forato	
Sulfotep	
Tiometon	

Metabolito Secundario	Link
Quinotion	
Fosalona	
Dioxation	
Coumitoato	
Coumafos	
Azametifos	
Pirazofos	
Clorprazofos	
Metilclorpirifos	
Tebupirimfos	
Primitato	
Primidofos	
Metilpirimfos	
Etilpirimfos	
Lirimfos	
Etrimfos	
Butatiofos	
Metilquinalfos	
Quinalfos	
Protidation	
Metidation	
Litidation	
Atidation	
Triazofos	
Isazofos	
Trienofos	
Temefos triclorometafos-3	
Sulprofos	
Protiofos	
Fosniclor	
Fenkapton	
Metilparati3n	
Mesulfenfos	
Jodfenfos	
Heterofos	
Etilfentio	
Fensulfoti3n	
Fenclorfos	
Famfur	
Etafos	
Diclofention	
Dicaption	
Citioato	
Cianofos	
Clortiofos	
Carbofenotion	
Etilbromofos	
Bromofos	
Azotoato	
Triclorfon	
butonato	
Triclorant	

Metabolito Secundario	Link	
Fonofos		
Leptofos		
EPN		
Cianofenfos		
Indoxcarb		<p data-bbox="704 512 1390 600">Grupos de insecticidas, modo de acción y fecha de introducción. (2008). Retrieved 20 August 2021, from http://www.scielo.org.pe/img/revistas/rins/v25n1/a11tab01a.pdf</p>
Rotenona		
Derris		
Emamectin benzoato		
Piretrina		
Lambda-Cialotrina		
Endosulfan		
Temefos		
Profenofos		
Pirimifos		
Monocrotofos		
Fenti3n		
Clorpirifos		
Pirimetafos	<p data-bbox="683 1262 1409 1381">Mondrag3n Aguilar, J. (2002). Insecticidas. Retrieved 20 August 2021, from http://www.csr.servicios.es/LABORATORIO/DESCARGAS/LOS_I_NSECTICIDAS_LECTURA_AVANZADA.pdf</p>	
Mefosfolan		
Fostietan		
Fenamifos		
Crufomato		
Mipafox		
Mazidox		
Dimefox		
Propetamfos		
Metamidofos		
Isofenfos		
Acefato		
Vaniliprol		
Tolfenipard		
Tebufenpirad		
Fipronil		
Etiprol		
Acetoprol		
Protrifenbute		
Spiromesifen		
Pirimidifen		
Flufenerim		
Transflutrina		
Tralometrina		
Tetrametrina		
Tetraletrina		
Teflutrina		
Resmetrina		
Piresmetrina		
Praletrina		
Fenotrina		
Permetrina		
Imiprotrina		
Furetrina		
Fluvalinato		

Metabolito Secundario	Link
Flucitrinato	
Fenvalerato	
Fenpropatrina	
Fenpiritrina	
Fenflutrina	
Empetrina	
Dimetrina	
Cifenotrina	
Cihalotrina	
Ciflutrina	
Cicloprotina	
Cicletrina	
Bioetanometrina	
Bifentrina	
Bartrina	
Aletrina	
Acrinatrina	
Fenazaflor	
EXD	
Diafentiuron	
Crotamiton	
Closantel	
Neral	
Geranial	
Piperitenona	
Bourboneno	
Biciclosesquifelandreno	
α-Tujeno	http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v40n2/v40n2a12.pdf
β-mirceno	
α-terpineno	
Benzoato de metilo	
Acetato de bencilo	
p-cresol metil éter	
α-Pineno	http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-84472017000300139#B176
4 terpineol	
Mirceno	
Verbenona	
Eugenol	
Rotundifolona	
xantona	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2855149/
Squamocin	
2-Methoxy-1,4- naphthoquinone	
Bruceine A	https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19862893
Mahanimbine	
Girinimbine	
Murrayanine	
Seselin	
Sesamin	
Sarniensine	
3-Epimacronine	
Desoxypodophyllotoxin	
Capparilside B	

Metabolito Secundario	Link
Cappariioside A	
Chrysoeriol	
Glochidone	
β -Sitosterol	
Resveratrol	
Oleic acid	
(2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl) chroman-3, 5, 7-triol	
(+)-Obtusol	
Elatol	
(-)-Elatol	
Usarotenoid-A	
Mohanimbine	
Karanjin	
Karanjachromene	
Pongarotene	
Koenimbine	
Arachidic acid	
Behenic acid	
Koenidine	
(+)-Medicarpin	
Formononetin	
Lanceolatin B	
Violanone	
Carvotanacetone	
Affinin, Spilanthol	
Nona-(2Z)-en-6,8-dienoic acid 2-phenylethylamide and deca-(2Z)-en-6,8-dienoic acid 2-phenylethylamide	
Dodecyl acetate	
Calarene	
δ -4-Carene	
Burchellin	
Pipyaquibine	
Zerumbone	
Podophyllotoxone	
Pacharin	
Betulinic acid	
Diallyldisulfide	
Diallyltrisulfide	
Sulcatyl acetate	
(4E,6Z)-alloocimene	
Santolina triene	
Methyl chavicol-- ESTRAGOL	
Patchouli alcohol	
n-Tetracosane	
n-Eicosane	
epi-Zonarene	
β -trans-Guaiene	
Sesquicineole	
Drima-7,9(11)-diene	
Pinocarvone	
cis-Pinocamphone	

1) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32956639/> 2) <https://scihub.wikicn.top/10.1016/j.actatropica.2020.105705>

Metabolito Secundario	Link
α -Eudesmo	
Guaiol	
Sylvestrene	
Bomeol Acetate	https://scihub.wikicn.top/10.1002/ps.1675
Acetate	
(+)- β -eudesmol	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25531412/
Abate	
Methyl cinnamate	https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880200500220771
DDT	
Lactona de dehidrocostus	https://www.redalyc.org/jatsRepo/843/84356911024/html/index.html
Fenthion	
Globulol	
Viridiflorol	https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/490765/
α -Cadinol	
b-chamigrene	https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000100105
(E)-isocroweacin	
e 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene	http://back.nimr.org.in/assets/541061.pdf
AR-tumerone	
Alpha-tumerone	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17096143/
Quercetina	https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0254629915326028?
Acetato de geranilo	https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0254629915326028?
lambdacyalotrina	http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/14758
Dunal	http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152010000100009
pirimifós metil	http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/14870
Hexaclorociclohexano	https://www.scielo.br/j/rimts/a/NmhR7YtsXLYjksnXmVxymP/?format=pdf&lang=en
H. hispanicum	https://www.um.edu.ar/ojs2019/index.php/RADU2/article/view/527
Forsythia suspensa	https://www.um.edu.ar/ojs2019/index.php/RADU2/article/view/528
Phellodendron amúrense	https://www.um.edu.ar/ojs2019/index.php/RADU2/article/view/529
A. membranaceus	https://www.um.edu.ar/ojs2019/index.php/RADU2/article/view/530
A. dahurica	https://www.um.edu.ar/ojs2019/index.php/RADU2/article/view/531
A. pubescens	https://www.um.edu.ar/ojs2019/index.php/RADU2/article/view/532
Fipronil	http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/75165/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
Imidacloprid	http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/75165/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
<i>Trichilia havanensis</i>	http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200012
<i>Psidium guajava</i>	http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200013
<i>Mentha rotundifolia</i>	http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200015
<i>Ipomoea stans</i>	http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200016
<i>Tagetes lucida</i>	http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200017
<i>Parthenium hysterophorus</i>	http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200018
<i>Schinus molle</i>	http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200019
PINTURA INESFLY 5A IGR NG	https://elpais.com/sociedad/2018/12/28/actualidad/1545990452_454695.html

Metabolito Secundario	Link
b-ciflutrina	https://www.researchgate.net/profile/Maria-Picollo/publication/26539808_Monitoreo_de_resistencia_a_insecticidas_en_poblaciones_de_campo_de_Triatoma_infestans_y_Rhodnius_prolixus_insectos_vectores_de_la_Enfermedad_de_Chagas/links/54e497ec0cf2dbf6069708b4/Monitoreo-de-resistencia-a-insecticidas-en-poblaciones-de-campo-de-Triatoma-infestans-y-Rhodnius-prolixus-insectos-vectores-de-la-Enfermedad-de-Chagas.pdf
etofenprox	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4674240/
y alfa-cipermetrina	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4674240/
Azadirachta	https://repositorio.unicach.mx/handle/20.500.12753/2100
tierra de diatomeas (TD)	http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342007000200012
lambdacihalotrina	http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072013000300002
Formononetin	https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19862917
Lanceolatin B	https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19862918
Violanone	https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19862919
Carvotanacetone	https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19862920
Spilanthol	https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19862921
Dodecyl acetate	https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19862922
Calarene	https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19862923
careno	https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19862924
Burchellin	https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X19862925

Apéndice B. Valores obtenidos en microvoltios y en variación porcentual en la técnica de electroantenografía correspondientes a amoniaco pre y post en presencia del control negativo acetona (100%v/v) y el control positivo IR3535 (90% v/v)

Pre amoniaco(μv)	Acetona Post amoniaco(μv)	Variación porcentual	Pre amoniaco(μv)	IR3535 Post amoniaco(μv)	Variación porcentual
240	260	108,3	900	440	48,9
200	180	90	440	180	40,9
520	520	100	280	200	71,4
400	420	105	600	300	50,0
260	280	107,7	520	260	50,0
880	800	90,9	240	60	25,0
700	660	94,3	1040	360	34,6
680	580	85,3	900	600	66,7
740	620	83,8	680	460	67,6
440	180	40,9	580	300	51,7
1080	1140	105,6	660	620	93,9
1000	900	90	420	360	85,7

Apéndice C. Valores obtenidos en microvoltios y en variación porcentual en la técnica de electroantenografía correspondientes a amoniaco pre y post en presencia de los compuestos farnesol, nerolidol y acetato de geranilo a concentraciones del 50% v/v

Farnesol			Nerolidol			Acetato de geranilo		
Pre amoniaco (μv)	Post Amoniaco (μv)	Variación porcentual	Pre amoniaco (μv)	Post Amoniaco(μv)	Variación porcentual	Pre amoniaco(μv)	Post amoniaco(μv)	Variación porcentual
240	100	41,7	600	380	63,3	360	220	61
220	40	18,2	660	320	48,5	220	100	45
580	460	79,3	340	120	35,3	700	400	57
80	40	50	260	200	76,9	460	280	60
1580	1220	77,2	340	120	40	300	120	40
900	520	57,8	300	120	70	1200	420	35
520	200	38,5	200	140	50			
1080	380	35,2	660	620	93,9			
1000	320	32	500	420	84			
300	200	66,7	420	300	71,4			
640	480	75	620	400	64,5			
520	200	38,5	480	160	6,3			
180	140	77,8	320	20	73,3			
640	180	28,1	190	140	61,1			
100	40	40	360	220	83,3			
360	220	61,1	460	240	52,2			
			400	100	25			