

Identificación de compuestos con posible actividad antimiasis empleando *Drosophila melanogaster* como modelo biológico y la mitocondria como diana farmacológica

Anjy Tatiana Ojeda Cárdenas

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Doctora en Ciencias con especialización en Bioquímica

Codirector

Luis Carlos Vesga Gamboa

Doctor en Química

Asesor

Jonny Edward Duque Luna

Doctor en Ciencias Básicas, Entomología médica

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

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.

Agradecimientos

A mi familia, amigos y la vida quien ha sido mi mayor maestra.

A mis padres y mi hermana, que con su amor y comprensión me ayudaron a perseguir este sueño. Gracias por acompañarme y ayudarme a afrontar un nuevo gran desafío llamado epilepsia, por enseñarme a comprender la importancia de ir más despacio y por aceptar mi terquedad, aun sin entender mi empeño por estudiar y hacer ciencia.

A Brandon, por apoyarme, ver mi tenacidad y pasión por querer algo más grande.

A Valeria, por tenerme más confianza de la que me tengo a mí misma, por ser ejemplo de disciplina, pasión por la ciencia, perseverancia, determinación, y por brindarme su gran amistad, llenándome siempre de buena energía.

A Jefferson, que, con sus ocurrencias, su inteligencia y su alegría hizo amenos muchos de los momentos donde se tenía un desafío por enfrentar.

A Laura, quien con su disciplina y dedicación me enseñó a continuar sin importar qué

A Rossy, quien me ha apoyado y entendido hasta en mi silencio, una mujer cuya amistad y confianza surgieron de la nada, pero, cuyo salto al abismo fue correspondido con lealtad y apoyo constante.

A la profesora Stelia, por trascender lo académico e inspirarme con su pasión por la ciencia y por ser una mujer ejemplar en un mundo que aún demanda equidad, pilar en la investigación y apoyo invaluable que fortaleció mi bienestar y determinación.

Al profesor Jonny por las enseñanzas y conocimiento brindado.

A los grupos de investigación GIBIM-laboratorio 402 y CINTROP-laboratorio 110 quienes creyeron en mí e hicieron posible este proyecto.

A mí misma por la disposición de siempre continuar a pesar de tener caída tras caída, la resiliencia y el sueño hoy por fin se convierte en meta, la primavera siempre llega y es tiempo de recoger los frutos...

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	16
Objetivos.....	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos.....	19
1. Análisis <i>in silico</i> de compuestos con posible actividad antimiasis con afectación en los complejos mitocondriales encargados del transporte de electrones en <i>Drosophila melanogaster</i>	20
1.1. Metodología fase <i>in silico</i>	20
1.1.1. Fase preliminar.....	23
1.1.2. Obtención modelos de homología	24
1.1.3. Preparación y screening virtual de los ligandos y proteínas	25
1.1.4. Docking molecular.....	26
1.1.5. Visualización	27
1.2. Resultados y discusión	28
1.2.1. Alineamiento estructuras primarias proteínas de estudio	28
1.2.2. Obtención modelos de homología	32
1.2.3. Superposición estructuras terciarias.....	35
1.2.4. Docking molecular.....	37
1.2.5. Complejo I. subunidad ND5	41

1.2.6. Complejo II. subunidad A.....	43
1.2.7. Complejo III. subunidad Cyt b	46
1.2.8. Complejo IV. subunidad 4	48
1.3. Conclusiones.....	50
2. Análisis in vivo e in vitro de compuestos con posible actividad antimiasis con afectación en los complejos mitocondriales encargados del transporte de electrones en <i>Drosophila melanogaster</i>	53
Fases <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	53
2.1. Metodología fase <i>in vivo</i> : Actividad insecticida.....	57
2.2. Metodología fase <i>in vitro</i> : Determinación de la actividad enzimática mitocondrial.	59
2.2.1. Homogeneizado y cuantificación de proteínas <i>D. melanogaster</i>	60
2.2.2. Medición enzimas oxidasas (NADH oxidasa y succinato oxidasa).....	60
2.3. Análisis estadístico	61
2.4. Resultados y discusión de la actividad insecticida	62
2.5. Resultados actividad enzimática mitocondrial	65
2.5.1. NADH oxidasa.....	66
2.5.2. Succinato oxidasa	68
2.6. Discusión de la actividad enzimática mitocondrial	71
2.6.1. Inhibición de la NADH oxidasa.....	71
2.6.2. Inhibición de la succinato oxidasa	71
2.6.3. Comparación entre metabolitos	72
2.6.4. Relación con la actividad insecticida.....	73
2.7. Conclusiones.....	73

3: Discusión y conclusiones globales	75
3.1. Discusión global	75
3.2. Conclusiones globales	76
3.3. Recomendaciones	77
3.4. Divulgación de resultados	78
Referencias bibliográficas	79
Apéndices	96

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Compuestos mejor clasificados de los complejos I, II, III y IV.</i>	39

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Ciclo de vida Drosophila melanogaster</i>	18
Figura 2. <i>Descripción metodología fase in silico.</i>	23
Figura 3. <i>Alineamiento de las secuencias primarias de las proteínas Complejo I Subunidad ND5 con sus correspondientes valores del porcentaje de identidad.</i>	29
Figura 4. <i>Alineamiento de las secuencias primarias de las proteínas Complejo II Subunidad A con sus correspondientes valores del porcentaje de identidad.</i>	29
Figura 5. <i>Alineamiento de las secuencias primarias de las proteínas Complejo III Subunidad cyt b con sus correspondientes valores del porcentaje de identidad.</i>	30
Figura 6. <i>Alineamiento de las secuencias primarias de las proteínas Complejo IV Subunidad 4 con sus correspondientes valores de porcentajes de identidad.</i>	31
Figura 7. <i>Modelos de homología de las proteínas de estudio de la especie D. melanogaster (A) Subunidad ND5 de la NADH deshidrogenasa (complejo I). Código Uniprot B6E0R2. https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/B6E0R2. (B) Posible sitio drogable de la proteína. (C) Subunidad flavoproteína SdhA del succinato deshidrogenasa (Complejo II). Código Uniprot Q94523. https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q94523. (D) Posible sitio drogable de la proteína. (E) Subunidad citocromo b ubiquinol-citocromo c reductasa (complejo III o complejo citocromo b-c1). Código Uniprot P18935. https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P18935. (F) Posible sitio drogable de la proteína. (G) Subunidad 4 del Citocromo c oxidasa (Complejo</i>	

IV). Código Uniprot Q9VIQ8. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9VIQ8>. (H) Posible sitio drogable de la proteína. 33

Figura 8. Superposición de las proteínas analizadas en el presente estudio. (A) Complejo I subunidad ND5, (B) Complejo II subunidad A, (C) Complejo III subunidad cyt b y (D) Complejo IV subunidad 4. Pymol. 35

Figura 9. Posiciones de acoplamiento de los compuestos mejor clasificados del complejo mitocondrial I en *D. melanogaster*, (A) rotenona y piericidina A, (B) bendiocarp, (C) xantona, (D) timol y (E) carvacrol. 42

Figura 10. Posiciones de acoplamiento de los compuestos mejor clasificados del complejo mitocondrial II en *Drosophila melanogaster*, (A) carboxin y tenoiltrifluoroacetona (B) propoxur (C) xantona (D) carvacrol (E) Timol. 45

Figura 11. Posiciones de acoplamiento de los compuestos mejor clasificados del complejo mitocondrial III en *Drosophila melanogaster*, (A) mixotiazol (B) 3-butilideneftalida (C) xantona (D) carvacrol (D) verbenol. 47

Figura 12. Posiciones de acoplamiento de los compuestos mejor clasificados del complejo mitocondrial IV en *Drosophila melanogaster*, (A) piperina, (B) tetrametrina, (C) xantona, (D) carvacrol y (E) p-cimeno. 50

Figura 13. Esquema fase in vivo (A) Descripción de la metodología de la fase in vivo. (B) Descripción de los ensayos de toxicidad en *D. melanogaster*. 55

Figura 14. Descripción de la metodología de la fase in vitro. 56

Figura 15. Porcentaje de supervivencia post-embrionaria en individuos *Drosophila melanogaster* alimentados con los compuestos timol, carvacrol, xantona y propoxur. 63

Figura 16. Actividad de la NADH oxidasa, en presencia de xantona, carvacrol y timol. 66

Figura 17. *Actividad de la succinato oxidasa, en presencia de xantona, carvacrol y timol.*

.....69

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Base de datos de compuestos reportados con actividad insecticida	96
Apéndice B. Certificado de participación en el V Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular (C2B2) 2023.	104
Apéndice C. Certificado de asistencia y participación en el VI Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular (C2B2) 2025.....	105

Lista de Ecuaciones

	Pág.
Ecuación 1. Esquema de reacción NADH oxidasa.....	61
Ecuación 2. Esquema de reacción del succinato oxidasa.	61

Resumen

Título: Identificación de compuestos con posible actividad antimiasis empleando *Drosophila melanogaster* como modelo biológico y la mitocondria como diana farmacológica*

Autora: Anjy Tatiana Ojeda Cárdenas**

Palabras clave: Miasis, metabolitos secundarios, *Drosophila melanogaster*, acoplamiento molecular, ensayos de toxicidad, cadena transportadora de electrones, mitocondria, xantona.

Descripción:

La miasis es una enfermedad parasitaria que afecta los tejidos de vertebrados, tanto humanos como animales, y es causada por larvas de dípteros de las familias *Muscidae*, *Fannidae*, *Oestridae*, *Sarcophagidae* y *Calliphoridae* (Zumpt, 1965; Francesconi & Lupi 2012). Esta problemática conlleva infecciones secundarias, pérdidas económicas en la población humana y efectos ambientales y toxicológicos asociados al uso de insecticidas sintéticos, tales como los organofosforados (Tandonnet et al., 2020, 2023). El objetivo de este estudio fue identificar metabolitos secundarios con potencial actividad antimiasis mediante un enfoque integral que incluyó análisis *in silico*, ensayos *in vivo*, e investigaciones *in vitro* empleando *Drosophila melanogaster* como modelo experimental. En la fase *in silico*, se modelaron proteínas mitocondriales de los complejos I al IV (subunidades ND5, A, Cyt b y 4) empleando AlphaFold2 y se realizó acoplamiento molecular con 210 metabolitos, destacándose la xantona, el carvacrol y el timol. Estos metabolitos se evaluaron *in vivo*, por medio de ensayos de toxicidad por ingesta, y se determinaron los valores de CI₅₀, donde se obtuvieron valores de 3,5 ppm (xantona), 50,0 ppm (carvacrol) y 150,0 ppm (timol), en moscas *Drosophila melanogaster*. Finalmente, en la fase *in vitro* se evaluó la inhibición de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, confirmando que la xantona presentó la mayor actividad inhibitoria en las enzimas NADH y succinato oxidasas. Estos resultados sugieren que la xantona es un candidato prometedor como agente antimiasis de origen natural.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez. Doctora en Ciencias con especialización en Bioquímica. Codirector: Luis Carlos Vesga Gamboa. Doctor en Química. Asesor: Jonny Edward Duque Luna. Doctor en Ciencias Básicas, área de Entomología médica.

Abstract

Title: Identification of compounds with potential antimyiasis using *Drosophila melanogaster* as a biological model and mitochondria as a pharmacological target *

Author: Anjy Tatiana Ojeda Cárdenas **

Keywords: Myiasis, secondary metabolites, *Drosophila melanogaster*, molecular docking, toxicity assays, electron transport chain, mitochondria, xanthone.

Description:

Myiasis is a parasitic disease that affects the tissues of vertebrates, both humans and animals, and is caused by larvae of dipterans from the families *Muscidae*, *Fanniidae*, *Oestridae*, *Sarcophagidae* y *Calliphoridae*. (Zumpt, 1965; Francesconi & Lupi 2012). This problem leads to secondary infections, economic losses in the human population, and environmental and toxicological effects associated with the use of synthetic insecticides, such as organophosphates (Tandonnet et al., 2020, 2023). The objective of this study was to identify secondary metabolites with potential antimyiasis activity through an integrative approach that included *in silico* analysis, *in vivo* assays, and *in vitro* investigations using *Drosophila melanogaster* as an experimental model. In the *in silico* phase, mitochondrial proteins from complex I to IV (ND5, A, Cyt b, and 4 subunits) were modeled using AlphaFold2 and molecular docking was performed with 210 metabolites, highlighting xanthone, carvacrol, and thymol. These metabolites were evaluated *in vivo* through ingestion toxicity assays, and IC₅₀ values were determined: 3.5 ppm (xanthone), 50.0 ppm (carvacrol), and 150.0 ppm (thymol) were obtained in *Drosophila melanogaster*. Finally, in the *in vitro* phase, inhibition of the mitochondrial electron transport chain was evaluated, confirming that xanthone present the highest inhibitory activity in NADH and succinate oxidase enzymes. These results suggest that xanthone is a promising candidate as a natural antimyiasis agent.

**Degree Work

**Science Faculty, Chemistry Department. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez. PhD in Science, specializing in Biochemistry. Co-Director: Luis Carlos Vesga Gamboa. PhD in Chemistry. Advisor: Jonny Edward Duque Luna. PhD in Basic Sciences, Medical Entomology area.

Introducción

La miasis es una infestación parasitaria causada por larvas de dípteros que afectan tanto a humanos como a animales. Entre las especies más relevantes se encuentran *Cochliomyia hominivorax*, *Dermatobia hominis*, *Oestrus ovis*, *Lucilia sericata*, *Sarcophaga*, *Musca domestica* y *Chrysomya*; cuyos estadios larvarios se desarrollan en heridas o tejidos vivos, ocasionando necrosis, infecciones secundarias, disminución en la productividad animal e incluso la muerte si no se instaura un tratamiento oportuno (Francesconia & Lupi, 2012a; Scholl et al., 2019).

Tradicionalmente, el control de la miasis se ha basado en el uso de insecticidas sintéticos de tipo organofosforado, carbamato y piretroide; sin embargo, su uso extensivo se asocia a toxicidad en organismos no blanco, desarrollo de resistencia y acumulación ambiental (Shalaby et al., 2016; Sidhu et al., 2019). Estas limitaciones han impulsado la búsqueda de alternativas naturales, entre ellas los metabolitos secundarios de plantas con potencial insecticida, larvicida y repelente (Rattan, 2010; Duque et al., 2023a)

En este contexto, *Drosophila melanogaster* se ha consolidado como un modelo biológico versátil para estudios de toxicología, genética y metabolismo energético. Su genoma fue uno de los primeros (en insectos) en ser secuenciado completamente, lo que permite establecer correlaciones moleculares con otras especies de interés médico y veterinario (Matthews et., 2015). Además, presenta similitudes bioquímicas y fisiológicas con los mamíferos, un ciclo de vida corto (Figura 1) y bajo costo de mantenimiento, lo que facilita su uso en investigaciones de laboratorio (Rocha, 2013; Moraes & Montagne, 2021). Estas características la posicionan como organismo

idóneo para la evaluación de metabolitos secundarios en modelos de toxicidad *in vivo*, ensayos celulares *in vitro* y aproximaciones computacionales *in silico*.

Los estudios *in vivo* en *D. melanogaster* han demostrado que aceites esenciales como el de *Rosmarinus officinalis* generan alteraciones en biomarcadores oxidativos, disminución en el desarrollo larval y aumento en la mortalidad adulta, evidenciando un efecto insecticida/larvicida atribuible a la inducción de estrés oxidativo (Pedroso et., 2023). De manera complementaria, ensayos *in vitro* han permitido analizar el impacto de metabolitos como terpenos y fenilpropanoides sobre la actividad enzimática mitocondrial, reforzando la hipótesis de que la mitocondria constituye una diana farmacológica clave en el diseño de nuevos insecticidas (Lümmen, 2007; Duque et al., 2023b).

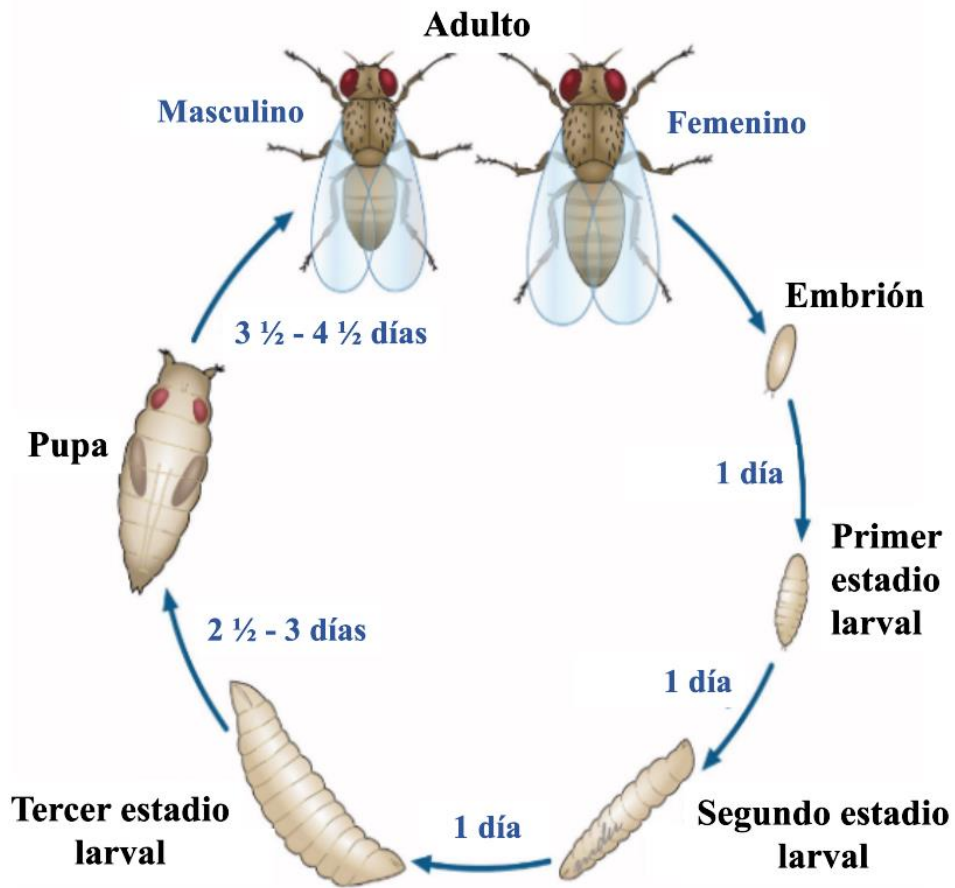
Paralelamente, los enfoques *in silico* mediante modelado molecular y acoplamiento por *Docking* han facilitado la predicción de interacciones entre metabolitos secundarios y enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial. Estas simulaciones permiten identificar compuestos con alta afinidad a complejos enzimáticos críticos, como NADH deshidrogenasa (Complejo I) y citocromo bc₁ (Complejo III), lo que abre la posibilidad de seleccionar moléculas candidatas previo a la realización de ensayos biológicos, reduciendo tiempo y costos de experimentación (Alonso et al., 2006; Chaaban et al., 2017).

De esta manera, la integración de estudios *in silico*, *in vivo*, e *in vitro* en *D. melanogaster* constituye una estrategia sólida para la evaluación de metabolitos secundarios con potencial insecticida. Este enfoque multidimensional no solo permite validar mecanismos de acción sobre la mitocondria, sino también proyectar la aplicabilidad de dichos compuestos al control de especies

productoras de miasis, aportando a la búsqueda de alternativas sostenibles, seguras y efectivas en salud pública y veterinaria.

Figura 1.

Ciclo de vida Drosophila melanogaster



Nota: Tomado de *Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity*. (p. 398), por Ong et al., 2015, Nanotoxicology.

Objetivos

Objetivo general

Determinar compuestos con potencial actividad antimiasis, teniendo la mitocondria como diana farmacológica y la especie *Drosophila melanogaster* como modelo biológico de evaluación.

Objetivos específicos

- Identificar mediante técnicas *in silico* compuestos con posible actividad insecticida teniendo como diana farmacológica la mitocondria.
- Determinar el efecto de los compuestos previamente seleccionados en los ensayos *in silico* en el desarrollo de la especie *Drosophila melanogaster*.
- Evaluar *in vitro* el efecto de los metabolitos con mejor actividad insecticida sobre la bioenergética mitocondrial en el estadio adulto *Drosophila melanogaster*.

El presente documento se estructura en tres capítulos interconectados que abarcan desde la predicción computacional hasta la validación biológica. El Capítulo 1 detalla la fase *in silico*, centrada en el modelado estructural y el acoplamiento molecular de los metabolitos. El Capítulo 2 integra las fases experimentales *in vivo* e *in vitro*, describiendo la metodología y los resultados obtenidos sobre el desarrollo y la bioenergética de *Drosophila melanogaster*. Finalmente, el Capítulo 3 presenta una discusión y conclusiones globales, donde se contrastan los hallazgos de todas las etapas; asimismo, se incluyen las recomendaciones derivadas del estudio y las estrategias de divulgación de los resultados alcanzados.

1. Análisis *in silico* de compuestos con posible actividad antimiasis con afectación en los complejos mitocondriales encargados del transporte de electrones en *Drosophila melanogaster*.

En este capítulo, se presenta un método ampliamente empleado en el análisis computacional que permite la predicción de posibles interacciones proteína-ligando, con sus respectivas energías. Esta técnica proporciona información relevante para el estudio de nuevos compuestos con potencial terapéutico en el campo de la miasis, denotando un enfoque previo a la fase experimental, facilitando el *screening* o determinación de compuestos con potencial actividad biológica.

Con este propósito, se obtuvieron los modelos de homología de las proteínas de interés en el estudio y se realizó una búsqueda en la literatura de los compuestos a evaluar, dando cumplimiento al primer objetivo específico estipulado en la investigación:

Identificar mediante técnicas *in silico* compuestos con posible actividad insecticida teniendo como diana farmacológica la mitocondria.

1.1. Metodología fase *in silico*

En la Figura 2 se aprecia la metodología empleada en la fase *in silico* con sus respectivas etapas computacionales. Inicialmente, se realizó la búsqueda de las secuencias primarias de las proteínas blanco de las principales especies causantes de miasis utilizando la plataforma UniProt, una base de datos ampliamente utilizada para la búsqueda de proteínas con caracterización estructural (The UniProt Consortium, 2023). Posteriormente,

se llevó a cabo un alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas, de cada proteína mitocondrial de diferentes especies de moscas, mediante la herramienta Clustal Omega (Madeira et al., 2022), con el objetivo de identificar regiones conservadas entre las secuencias seleccionadas (Sievers & Higgins, 2018).

Con base en estos alineamientos, se construyeron modelos de homología utilizando AlphaFold2, una herramienta de predicción estructural basada en inteligencia artificial que ha demostrado alta precisión en la modelación de proteínas (Jumper et al., 2021). Seguidamente, las estructuras generadas fueron analizadas y superpuestas utilizando el software PyMOL, con el propósito de evaluar el grado de conservación espacial entre las proteínas homólogas (Schrödinger, LLC, 2015).

Una vez validadas las estructuras, se procedió a la búsqueda de compuestos con potencial actividad insecticida reportados en la literatura, incluyendo metabolitos secundarios y compuestos sintéticos utilizados como referencia, identificándose un total de 210 compuestos. Para la evaluación de las interacciones proteína-ligando, los compuestos (ligandos) fueron preparados mediante la herramienta LigPrep de Schrödinger (Schrödinger, 2025), mientras que las proteínas de estudio se prepararon utilizando la interfaz Protein Preparation Wizard (PrepWiz) de Schrödinger, Inc (Schrödinger, 2025).

Posteriormente, los ligandos preparados fueron evaluados en función de sus propiedades farmacocinéticas ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) mediante la interfaz Qik Prop de Maestro, Schrödinger, Inc (Schrödinger, 2025), con el fin de prever posibles violaciones de las reglas de Lipinski. Como resultado de este análisis, se seleccionaron 62 compuestos que cumplían con los criterios establecidos.

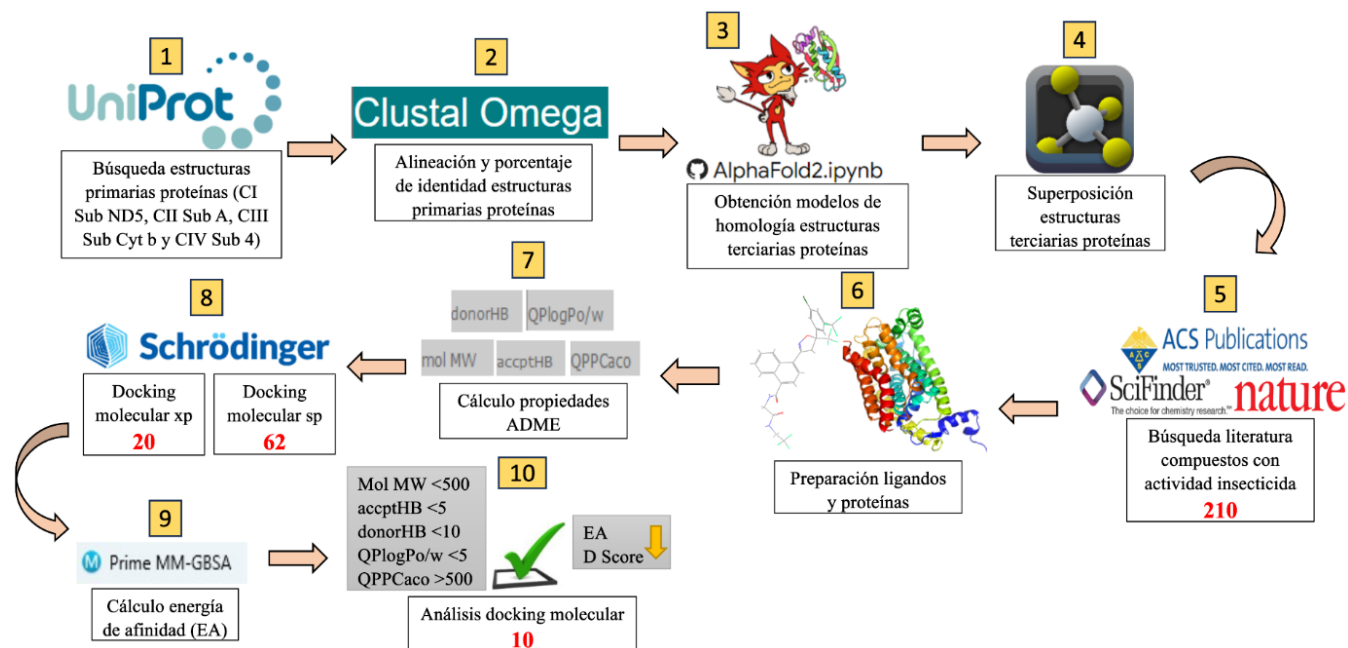
A continuación, los compuestos seleccionados fueron sometidos a estudios de acoplamiento molecular utilizando el software Schrödinger, el cual incluye herramientas especializadas para el análisis estructural y predicción de interacciones proteína-ligando, como Glide y Maestro (Schrödinger, LLC, 2021).

El acoplamiento molecular (*docking*) se llevó a cabo utilizando la herramienta Glide, considerando los ligandos como flexibles y definiendo una caja de acoplamiento para cada subunidad proteica, en la cual el sitio de unión fue identificado mediante la herramienta SiteMap (Schrödinger, LLC, 2025). El procedimiento de *docking* se desarrolló a diferentes niveles de precisión, de menor a mayor. En la primera etapa, se empleó el modo de precisión estándar (*Standard Precision, SP*), a partir del cual se seleccionaron los 20 compuestos con las mejores puntuaciones. Posteriormente, estos compuestos fueron evaluados utilizando el modo de precisión extra (*Extra Precision, XP*), lo que permitió la selección final de 10 compuestos con el mayor potencial para estudios posteriores.

Finalmente, los 10 compuestos seleccionados fueron analizados adicionalmente en función del cumplimiento de la regla de Lipinski o “regla de los cinco”, la cual predice la biodisponibilidad oral de los fármacos a partir de propiedades fisicoquímicas como el peso molecular y el número de donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, entre otros parámetros (Lipinski et al., 2001). Asimismo, se consideraron la energía de afinidad (MMGBSA), utilizando la interfaz Prime (Schrödinger, LLC, 2025), y el *docking score* como indicadores clave del potencial de interacción entre los ligandos y los sitios drogables de las proteínas blanco, criterios ampliamente empleados en el diseño racional de fármacos (Owino et al., 2022; Aina et al., 2020; Ajiboye et al., 2023).

Figura 2.

Descripción metodología fase *in silico*.



1.1.1. Fase preliminar

Con el fin de validar el modelo biológico *Drosophila melanogaster*, se realizó una comparación de las proteínas de estudio de las principales especies productoras de miasis junto con *D. melanogaster* y *Aedes aegypti*. Dado que las proteínas de estas especies no se encuentran caracterizadas experimentalmente, las secuencias primarias fueron obtenidas a partir de la base de datos Uniprot (Berman et al., 2000). Posteriormente, dichas secuencias fueron alineadas para determinar los porcentajes de identidad utilizando Clustal Omega (Madeira et al., 2022). A continuación, se generaron las estructuras terciarias mediante Alphafold2, con el

propósito de visualizar y evaluar la superposición estructural empleando el software Pymol (Jumper et al., 2021; DeLano, 2002).

Una vez evaluado el modelo biológico, se estableció una base de datos conformada por 210 compuestos. Entre estos se identificaron metabolitos secundarios de aceites esenciales de origen vegetal, así como posibles controles positivos reportados en la literatura con actividad insecticida frente a las principales especies productoras de miasis. La base de datos de compuestos se presenta en el Apéndice A. Las estructuras químicas de los compuestos fueron obtenidas a partir de la plataforma PubChem, en formato SDF, para su posterior análisis mediante acoplamiento molecular (*docking*) utilizando el programa Maestro (Kim et al., 2023).

1.1.2. Obtención modelos de homología

Los modelos de homología de las subunidades ND5, SdhA, cyt b y 4 correspondientes a los complejos I, II, III y IV respectivamente, fueron diseñados haciendo uso del software AlphaFold2, con la secuencia FASTA de cada subunidad obtenida de la base de datos Uniprot (Jumper et al., 2021; Tunyasuvunakool et al., 2021).

La validación de los modelos de homología sugeridos por el software AlphaFold2, se realizó por medio del cálculo de los porcentajes de precisión de cada sección de la estructura cristalina, lo que facilita evaluar su fiabilidad (Jumper et al., 2021).

1.1.3. Preparación y screening virtual de los ligandos y proteínas

Los ligandos seleccionados se prepararon utilizando la herramienta LigPrep de Schrödinger, Inc. En el cual se configuraron parámetros como la quiralidad, estereoisomería, y se determinó la configuración de menor energía. Después, se generaron todos los estados de protonación posibles en un rango de pH de $7,2 \pm 0,2$ y tautómeros, basados en el valor de pKa teórico calculado, entre otros ajustes predeterminados del programa (Pietro et al., 2016).

Posterior a la preparación de los ligandos, se evaluaron sus propiedades ADME utilizando la interfaz QikProp de Maestro, Schrödinger, Inc. Esto permitió obtener una predicción precisa de las propiedades farmacológicamente relevantes de cada molécula, así como el perfil ADME de los compuestos, lo que facilitó la identificación de posibles violaciones de las reglas de Lipinski o regla de 5 (peso molecular, $PM < 500$ g/mol; aceptores de hidrógeno, $AH < 5$; donadores de hidrógeno, $DH < 10$; la predicción de la permeabilidad aparente de las células Caco-2, Permeabilidad Caco-2 > 500 kcal/mol y el coeficiente de repartición octanol agua, $QPlogP/w < 5$) (Natarajan A, et al., 2015).

Las estructuras cristalinas de las subunidades 5, SdhA, cyt b y 4 correspondientes a los complejos I, II, III y IV respectivamente, se prepararon utilizando la interfaz Protein Preparation Wizard (PrepWiz) de Schrödinger, Inc (Sastry et al., 2013), donde se agregaron átomos de hidrógeno a pH fisiológico (7,4), se identificaron las cadenas laterales y los residuos faltantes, se utilizó el

campo de intensidad OPLS3e para corregir el estado de protonación y la falta de cadenas laterales. (Pietro et al., 2016; Sastry et al., 2013).

1.1.4. Docking molecular

Los probables sitios drogables de las proteínas fueron identificados utilizando la herramienta SiteMap de Schrödinger, Inc. Esta herramienta permitió localizar regiones energéticamente favorables para la unión de ligandos y proporcionó un Docking score (Dscore), parámetro calculado en la interfaz Maestro de Schrodinger. El Dscore fue empleado como un criterio cuantitativo para estimar la idoneidad de los sitios de unión y su potencial para establecer interacciones proteína-ligando estables; en este estudio se seleccionaron aquellos sitios con valores de Dscore superiores a 1, los cuales fueron considerados altamente drogables.

Adicionalmente, SiteMap permitió la selección del sitio óptimo de unión para cada proteína a partir de descriptores energéticos y geométricos derivados de cálculos cuánticos aproximados, y proporcionó información relevante sobre las posibles interacciones proteína-ligando, así como sugerencias para la optimización estructural de los compuestos (Halgren, 2009). Los sitios identificados fueron posteriormente utilizados en los estudios de acoplamiento molecular, durante los cuales el programa Glide predijo la pose de acoplamiento más favorable del ligando dentro del sitio seleccionado, lo que permitió evaluar la estabilidad y afinidad de las interacciones obtenidas.

El acoplamiento molecular se realizó en la plataforma Maestro de Schrödinger, que emplea el algoritmo Glide (Freisner, 2004). Adicionalmente, se llevaron a cabo acoplamientos con diferentes niveles de precisión, comenzando con precisión estándar (SP), el cual es un *docking* de menor precisión y posteriormente el de precisión extra (XP), el cual es un *docking* de mayor precisión en comparación al SP. Los ligandos se acoplaron en una caja de 16 Å, generando al menos 10 poses por ligando.

Posteriormente, se utilizó la herramienta Prime para generar los parámetros de energía de afinidad calculados mediante la interacción proteína-ligando, además, de eliminar iones metálicos y considerar la presencia de enlaces tipo puente de hidrógeno y moléculas de solvente. Por último, se determinaron los compuestos candidatos basándose en parámetros como el cumplimiento de los parámetros de Lipinski o regla de 5, los valores de *docking* score y energía de afinidad por debajo de 0 (indican mayor afinidad proteína-ligando), la temperatura de ebullición y las concentraciones de toxicidad. Los compuestos que cumplieron con los criterios establecidos fueron elegidos para la fase *in vivo*.

1.1.5. Visualización

Las posiciones de acoplamiento creadas por el software Maestro Schrödinger se importaron directamente a Pymol para visualizar las poses y las interacciones de cada compuesto con cada proteína.

1.2. Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo de la fase *in silico* del presente estudio.

1.2.1. Alineamiento estructuras primarias proteínas de estudio

Las proteínas de las subunidades ND5, SdhA, Cyt b y COX4, correspondientes a los complejos I, II, II y IV, respectivamente, fueron el foco central de este estudio debido a su papel esencial en el funcionamiento de dichos complejos y, por ende, en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, proceso clave para la fosforilación oxidativa y la producción de energía celular (Hirst, 2013; Sun et al., 2005; Crofts, 2004; Kadenbach et al., 2012).

Actualmente, la estructura cristalina de las subunidades de estudio de las principales especies productoras de miasis (*Oestrus ovis*, *Dermatobia hominis*, *Cochliomyia hominivorax*, *Sarcophaga*, *Chrysomya*, *Lucilia*, y *Musca domestica*), así como para *D. melanogaster* y *Ae. aegypti*, no se encuentra caracterizada en la literatura, fue necesario iniciar el análisis a partir de la estructura primaria de las proteínas. En este contexto, las secuencias aminoacídicas de cada subunidad fueron obtenidas a través de la base de datos Uniprot bajo formato FASTA.

Posteriormente, se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias primarias correspondientes a cada subunidad mitocondrial mediante la herramienta Clustal Omega (Madeira et al., 2022), con el objetivo de identificar regiones conservadas entre las diferentes especies analizadas. A partir de estos

alineamientos, se calcularon los porcentajes de identidad, los cuales se presentan en la Figura 3, Figura 4, Figura 5 y Figura 6 para la subunidad ND5 del complejo I, la subunidad SdhA del complejo II, la subunidad Cyt b del complejo III y la subunidad 4 del complejo IV, respectivamente. Estos análisis constituyeron la base para la obtención de los modelos de homología de las proteínas de interés.

Figura 3.

Alineamiento de las secuencias primarias de las proteínas Complejo I Subunidad ND5 con sus correspondientes valores del porcentaje de identidad.



Nota: Los símbolos significan: * Se conservan las propiedades, : Mismas propiedades químicas y . propiedades químicas diferentes. Clustal Omega.

Figura 4.

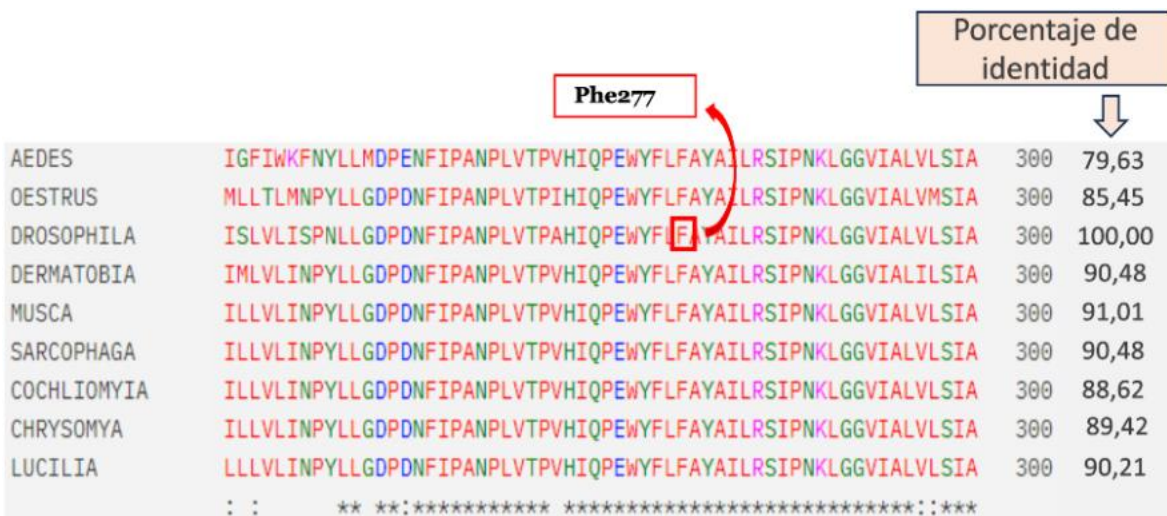
Alineamiento de las secuencias primarias de las proteínas Complejo II Subunidad A con sus correspondientes valores del porcentaje de identidad.



Nota: Los símbolos significan: * Se conservan las propiedades, : Mismas propiedades químicas y . propiedades químicas diferentes. Clustal Omega.

Figura 5.

Alineamiento de las secuencias primarias de las proteínas Complejo III Subunidad cyt b con sus correspondientes valores del porcentaje de identidad.



Nota: Los símbolos significan: * Se conservan las propiedades, : Mismas propiedades químicas y . propiedades químicas diferentes. Clustal Omega.

Figura 6.

Alineamiento de las secuencias primarias de las proteínas Complejo IV Subunidad 4 con sus correspondientes valores de porcentajes de identidad.



Nota: Los símbolos significan: * Se conservan las propiedades, : Mismas propiedades químicas y . propiedades químicas diferentes. Clustal Omega.

El análisis comparativo de las secuencias primarias de proteínas mitocondriales de *Drosophila melanogaster* frente a otras especies de dípteros mostró altos porcentajes de identidad, en su mayoría superiores al 70% (Figura 3, Figura 4, Figura 5 y Figura 6). Estos resultados evidenciaron una marcada conservación evolutiva de regiones clave en las subunidades de los complejos de la cadena transportadora de electrones, lo cual es consistente con la naturaleza altamente conservada y funcionalmente esencial de estas proteínas en los procesos de transferencia de electrones y fosforilación oxidativa en organismos eucariotas (Hirst, 2013; Letts & Sazanov, 2017).

La conservación observada coincide con lo reportado en estudios recientes, donde se demuestra que la divergencia de proteínas a lo largo de millones de años está limitada por la necesidad de preservar sitios críticos para la función y la estabilidad estructural (Echave et al., 2016; Echave et al., 2021; Mayer-Friedrich et al., 2023). Incluso en casos donde la identidad global fue moderada ($\approx 50\%$ en algunos complejos), se mantuvieron regiones conservadas funcionalmente relevantes, lo que refuerza la hipótesis de que la presión selectiva conserva regiones esenciales para la actividad catalítica y estructural de las proteínas mitocondriales (Goldstein, Pollock, & Shah, 2015; Mayer-Friedrich et al., 2023).

1.2.2. Obtención modelos de homología

Los modelos de homología de las proteínas de estudio de la especie *D. melanogaster*, fueron generados empleando el software AlphaFold2, partiendo de las secuencias aminoacídicas (estructuras primarias) extraídas de la base de datos de la Uniprot con los códigos B6E0R2, Q94523, P18935, y Q9VIQ8, las cuales corresponden a la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (complejo I) (Figura 7A), la subunidad flavoproteína SdhA del succinato deshidrogenasa (Complejo II) (Figura 7C), la subunidad citocromo b ubiquinol-citocromo c reductasa (complejo III o complejo citocromo b-c1) (Figura 7E) y la subunidad 4 del Citocromo c oxidasa (Complejo IV) (Figura 7G), respectivamente.

La confiabilidad de estos modelos se evaluó mediante los rangos de confianza representados por un código de colores, donde el color azul indica una confiabilidad superior del 90%, celeste entre el 90% y 70%, el color amarillo entre

el 50% y 70% y el color naranja inferior al 50%. Asimismo, este software indicó una confiabilidad global del 86,6 % para la estructura en conjunto. Este nivel de predicción estructural es consistente con lo reportado en la literatura, donde AlphaFold2 ha demostrado alcanzar predicciones comparables a métodos experimentales, especialmente en proteínas con regiones bien definidas (Jumper, Evans, & Pritzel, 2021; Varadi & Met y Col, 2021).

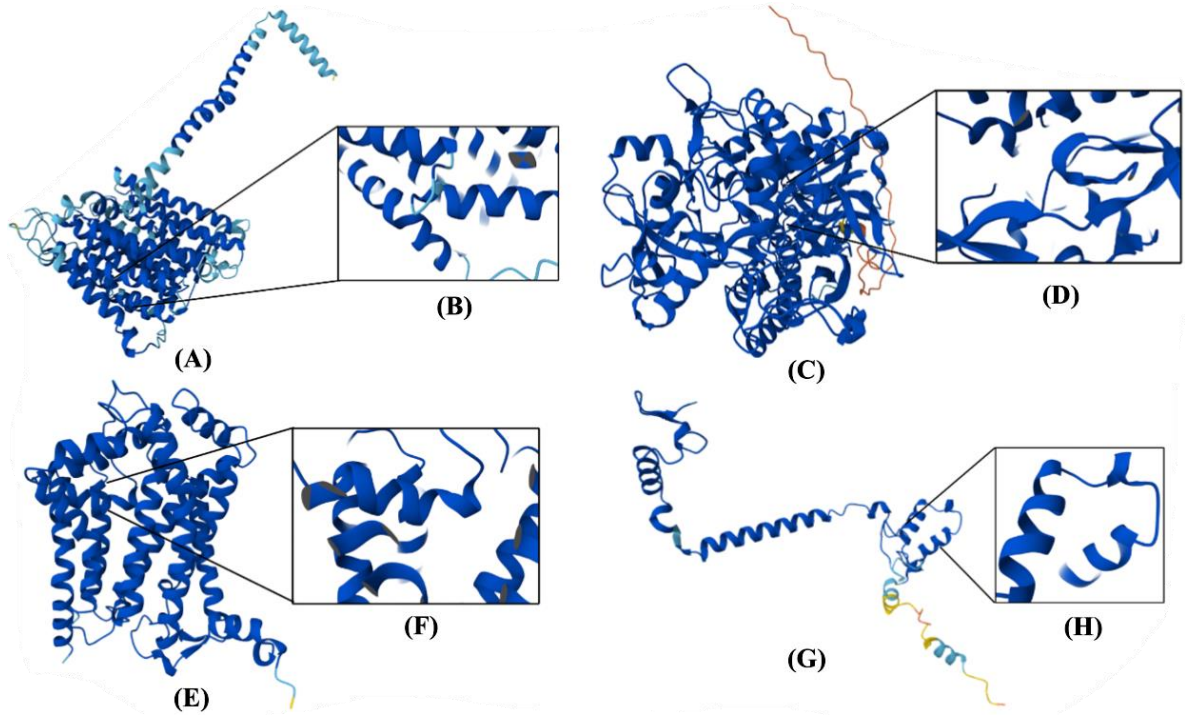
Los posibles sitios activos de las proteínas correspondientes a las subunidades ND5 (Figura 7B), SdhA (Figura 7D), citocromo b (Figura 7F) y subunidad 4 (Figura 7H) se encuentran en regiones con porcentajes de confiabilidad entre el 90 y el 70% para la subunidad ND5, y superiores al 90% para las subunidades SdhA, citocromo b y subunidad 4, lo cual permitió proseguir con los estudios posteriores.

Figura 7.

Modelos de homología de las proteínas de estudio de la especie D. melanogaster (A) Subunidad ND5 de la NADH deshidrogenasa (complejo I). Código Uniprot B6E0R2. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/B6E0R2>. (B) Posible sitio drogable de la proteína. (C) Subunidad flavoproteína SdhA del succinato deshidrogenasa (Complejo II). Código Uniprot Q94523. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q94523>. (D) Posible sitio drogable de la proteína. (E) Subunidad citocromo b ubiquinol-citocromo c reductasa (complejo III o complejo citocromo b-c1). Código Uniprot P18935. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P18935>. (F) Posible sitio drogable de la proteína. (G)

Subunidad 4 del Citocromo *c* oxidasa (Complejo IV). Código Uniprot Q9VIO8.

<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9VIO8>. (H) Posible sitio drogable de la proteína.



Los modelos de homología obtenidos con AlphaFold2 para las subunidades mitocondriales mostraron una alta confiabilidad global (86,6%), lo que respalda la su precisión estructural. Los sitios activos predichos se localizaron en regiones con valores superiores al 70% coincidiendo con zonas evolutivamente conservadas y esenciales para la función de la cadena respiratoria. Estos resultados refuerzan la utilidad de *Drosophila melanogaster* como modelo y consolidan a AlphaFold2 como herramienta clave para la identificación de blancos funcionales y terapéuticos (Jumper et al., 2021; Xu et al., 2024).

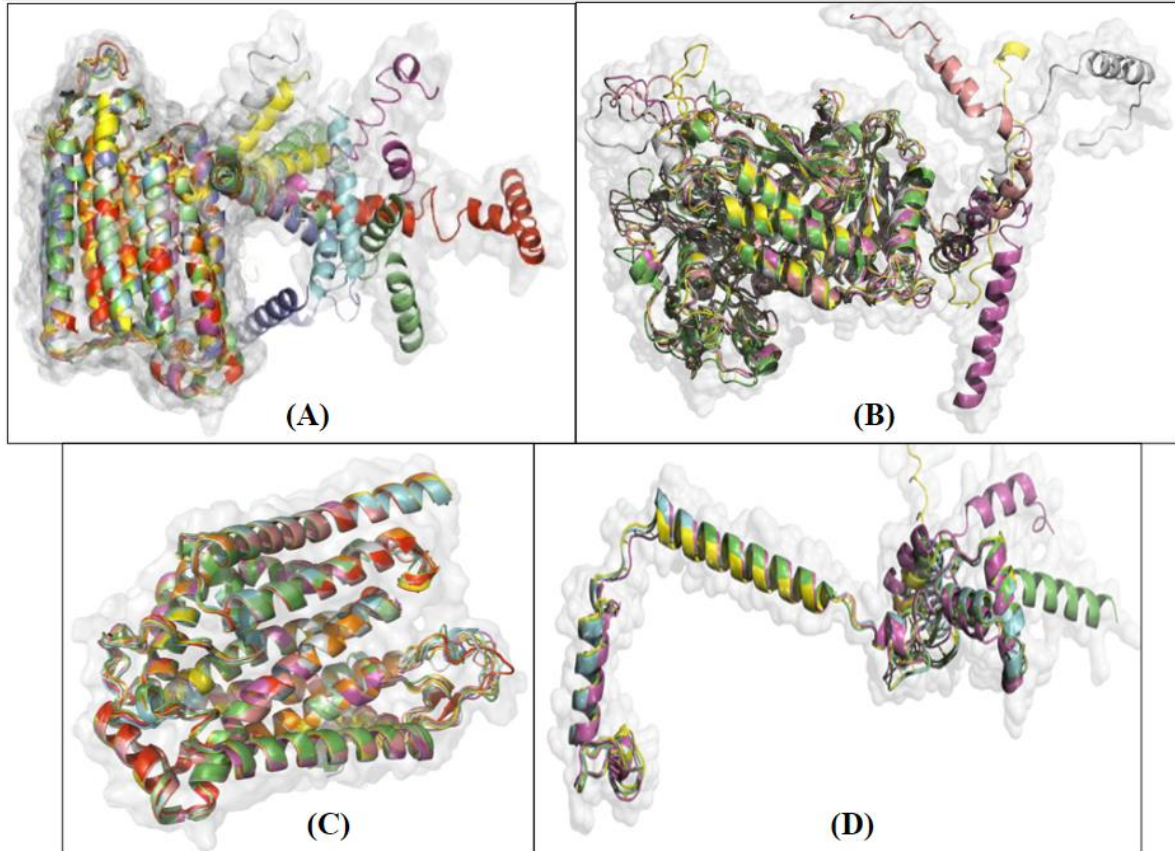
La localización de posibles sitios activos en zonas con porcentajes de confiabilidad superiores al 70% sugiere que las predicciones realizadas son robustas para análisis funcionales posteriores. En particular, los residuos ubicados en las subunidades ND5 y SdhA, así como en el citocromo b y la subunidad 4, se encuentran en regiones evolutivamente conservadas, lo que refuerza su papel crítico en la transferencia de electrones y la generación de energía mitocondrial. Estos hallazgos destacan la importancia de los modelos *in silico* para identificar blancos terapéuticos y comprender la evolución de los complejos mitocondriales en insectos y otros organismos (Bork et al., 2023; Xu et al., 2024).

1.2.3. Superposición estructuras terciarias

Una vez obtenidas las secuencias primarias de las proteínas de las especies reportadas como causantes de miasis, así como del modelo biológico *D. melanogaster*, a partir de la base de datos Uniprot, se procedió al modelado de sus estructuras terciarias, los cuales se obtuvieron mediante Alphafold2. Posteriormente, estos modelos se visualizaron utilizando PyMOL, y se realizó una superposición de las estructuras terciarias para observar la conservación de las proteínas, lo cual se aprecia en la Figura 8.

Figura 8.

Superposición de las proteínas analizadas en el presente estudio. (A) Complejo I subunidad ND5, (B) Complejo II subunidad A, (C) Complejo III subunidad cyt b y (D) Complejo IV subunidad 4. Pymol.



Nota: La superposición de los modelos estructurales de las proteínas mitocondriales mostró una alta conservación en las hélices α y dominios centrales, evidenciando una presión selectiva por mantener su función esencial en la cadena respiratoria. Esta conservación estructural, consistente con los porcentajes de identidad de secuencia, confirma la importancia de estos complejos en la bioenergética celular y respalda el uso de *D. melanogaster* como modelo de estudio de proteínas mitocondriales (Varadi et al., 2022; Martínez-Cantón et al., 2025).

La superposición de los modelos de homología de las subunidades mitocondriales ND5 (Complejo I), A (Complejo II), cyt b (Complejo III) y subunidad 4 (Complejo IV) reveló una notable conservación de la estructura terciaria entre *Drosophila melanogaster* y las especies de moscas asociadas a

miasis. Esta conservación estructural es consistente con los altos porcentajes de identidad observados en los alineamientos de secuencia, lo que sugiere que, a pesar de la divergencia evolutiva entre los taxones, las regiones críticas de estas proteínas mantienen una fuerte presión selectiva para preservar su función bioenergética.

En particular, la coincidencia de hélices α y dominios centrales indica que la arquitectura global de los complejos mitocondriales está altamente conservada, lo cual es esencial para asegurar la eficiencia en la transferencia de electrones y la producción de ATP. Esto coincide con reportes recientes que indican que, incluso en organismos distantes, las proteínas de la cadena respiratoria conservan su organización estructural debido a la necesidad de mantener la integridad funcional del metabolismo oxidativo (Martínez-Cantón et al., 2025; Meyer et al., 2023).

Además, la comparación estructural mediante herramientas de predicción como Alphafold2 ha demostrado ser altamente confiable para el estudio evolutivo y funcional de proteínas, ya que permite identificar regiones conservadas que no siempre son evidentes a nivel de secuencia (Varadi et al., 2022). En este caso, las regiones más superpuestas corresponden a los sitios catalíticos y de interacción con cofactores, lo que confirma su relevancia biológica y explica la conservación observada.

1.2.4. Docking molecular

Los metabolitos secundarios y compuestos sintéticos constituyen una fuente relevante de moléculas bioactivas con potencial aplicación en el control de insectos causantes de miasis. En este estudio, el acoplamiento molecular se utilizó como una

herramienta *in silico* para evaluar la afinidad y el modo de interacción de estos compuestos con proteínas mitocondriales clave, con el fin de identificar candidatos con posible actividad antimiasis, siguiendo el procedimiento descrito en los ítems 6-10 de la metodología (Figura 2).

Tras realizar el acoplamiento molecular (*docking*) sobre un conjunto inicial de 210 compuestos insecticidas de origen natural y sintético reportados en la literatura, se seleccionaron los ligandos con mejor desempeño en los modos de precisión SP y XP, para los cuales se calculó la energía (EA). Los resultados se presentan en la Tabla 1, ordenados de forma ascendente según los valores de EA.

Para la selección de los compuestos que se utilizaron en la fase *in vivo*, se consideraron los valores de energía de afinidad, Docking score, punto de ebullición, y las propiedades ADME siguiendo las reglas de Lipinski en los parámetros del peso molecular (<500), el número de donadores (<10) y aceptores de hidrógeno (<5), la permeabilidad en las células Caco-2 (>500), así como otros criterios como biodisponibilidad, viabilidad comercial, toxicidad, y riesgos para la salud y el medio ambiente.

Como se observa en la Tabla 1, los compuestos bendiocarb, propoxur, tetrametrina y p-cimeno marcados en rojo, son insecticidas sintéticos reportados en la literatura para el control de especies causantes de miasis, analizados para obtener un control positivo para la fase *in vivo*. El compuesto seleccionado fue el propoxur debido a su biodisponibilidad. Los metabolitos 3-butilideneftalida, verbenol y

piperina indicados en blanco, fueron descartados ya que sólo mostraban una posible inhibición en uno de los cuatro complejos de interés.

Tabla 1.

Compuestos mejor clasificados de los complejos I, II, III y IV.

Complejo	Nombre	PM	DH	AH	Permeabilidad Caco-2	Docking score	EA (kcal/mol)
CI	Bendiocarb	223,228	1,00	4,50	2,679,620	-2,911	-36,060
	Xantona	196,205	0,00	2,50	3,521,282	-3,340	-35,08
	Timol	150,220	1,00	0,75	3,816,505	-3,599	-31,41
	Carvacrol	150,220	1,00	0,75	3,687,620	-3,968	-30,95
CII	Propoxur	209,244	1,00	3,75	3,462,137	-3,367	-44,38
	Xantona	196,205	0,00	2,50	3,521,282	-4,810	-42,60
	Carvacrol	150,220	1,00	0,75	3,687,620	-4,477	-34,06
	Timol	150,220	1,00	0,75	3,816,505	-4,170	-33,42
CIII	3-Butilideneftalida	188,226	0,00	2,50	2,115,842	-7,360	-47,79
	Xantona	196,205	0,00	2,50	3,521,282	-7,853	-47,66
	Carvacrol	150,220	1,00	0,75	3,687,620	-7,816	-42,77
	Verbenol	152,236	1,00	1,70	3,568,015	-6,953	-35,77
CIV	Piperina	285,342	0,00	4,50	4,158,906	-3,476	-36,75
	Tetrametrina	331,411	0,00	5,00	1,278,225	-3,164	-35,35
	Xantona	196,205	0,00	2,50	3,521,282	-3,046	-34,36
	Carvacrol	150,220	1,00	0,75	3,687,620	-3,521	-32,41
	p-cimeno	134,221	0,00	0,00	9,906,038	-3,310	-31,47

Nota: Se presentan los resultados obtenidos de las propiedades ADME, que incluyen: PM: peso molecular, DH: número de donadores de puentes de hidrógeno, AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno y Permeabilidad Caco-2: predicción cuantitativa de la permeabilidad a través de la barrera intestinal en células Caco-2. Asimismo, se exponen los resultados obtenidos de Docking score y EA: energía de afinidad. El código de colores utilizado es el siguiente: en gris oscuro, los insecticidas sintéticos reportados en la literatura, en gris claro, los metabolitos secundarios seleccionados para la fase *in vivo* y en blanco, los metabolitos no seleccionados.

Los valores de energía de afinidad obtenidos para los diferentes complejos mitocondriales oscilaron entre -30 y -48 kcal/mol, lo que indica interacciones proteína-ligando favorables y comparables con las de los inhibidores de referencia, como rotenona y piericidina A para el Complejo I, carboxin y tenoiltrifluoroacetona para el Complejo II y mixotiazol para el Complejo III. En general, compuestos como xantona, carvacrol y bendiocarb mostraron las afinidades más bajas, indicando una mayor estabilidad en los sitios activos. Estos resultados sugieren que metabolitos fenólicos poseen un alto potencial para interferir con la cadena transportadora de electrones.

La presencia de interacciones específicas (π - π , hidrofóbicas e hidrógeno) con residuos críticos de los sitios catalíticos refuerza la validez de los valores numéricos obtenidos, ya que la afinidad observada no se limita a un acoplamiento inespecífico, sino que reproduce modos de unión similares a los de inhibidores conocidos. Este hallazgo es relevante dado que compuestos con energías más

negativas tienden a exhibir mayor probabilidad de inhibición en condiciones biológicas (Morris et al., 2020; Guo et al., 2022).

En conjunto, los resultados de la tabla evidencian que los compuestos seleccionados podrían tener un efecto inhibitorio sobre la bioenergética mitocondrial, lo cual respalda su potencial como candidatos para el desarrollo de nuevas alternativas de control contra larvas de importancia médica y veterinaria. Por ende, se seleccionaron los metabolitos xantona, carvacrol y timol para los posteriores estudios *in vivo* e *in vitro*. A continuación, se presentan los resultados de *docking* molecular con los compuestos seleccionados por cada complejo mitocondrial.

1.2.5. Complejo I. subunidad ND5

Los resultados de *docking* molecular evidenciaron que bendiocarb, xantona y carvacrol presentaron interacciones predominantes con residuos aromáticos del sitio de unión, al igual que los inhibidores de referencia, rotenona y piericidina A (Figura 9). Estas interacciones se localizaron principalmente con Phe356, mediante interacciones del tipo π - π , lo que sugiere un modo de unión similar al de los inhibidores clásicos del Complejo I (Murai & Miyoshi, 2016; Brandt, 2006).

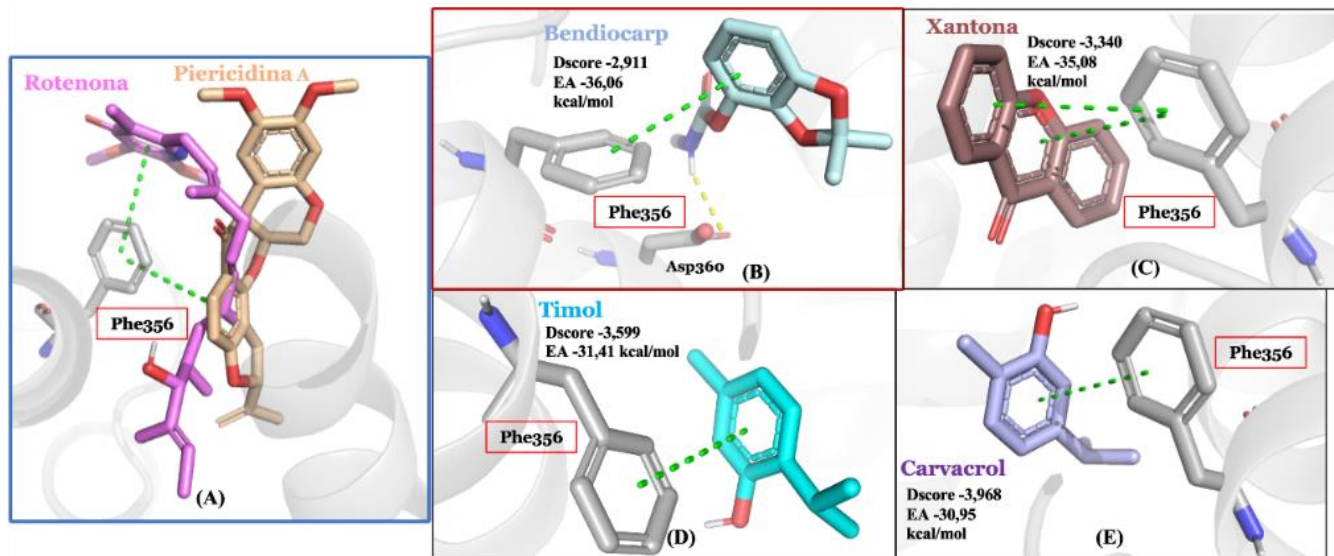
La relevancia de Phe356 radica en que este residuo forma parte del sitio hidrofóbico conservado implicado en la unión de los inhibidores rotenona y piericidina A, contribuyendo a la estabilización del ligando dentro del Complejo I mediante interacciones aromáticas conservadas (Efremov et al., 2010; Murai & Miyoshi, 2016). La convergencia en los residuos de interacción observada entre los

compuestos evaluados y los inhibidores de referencia respalda la hipótesis de que estos ligandos podrían interferir con la transferencia de electrones desde el NADH hacia la ubiquinona, afectando la función bioenergética mitocondrial.

Esto es consistente con lo reportado previamente para carbamatos y compuestos fenólicos que alteran la función del complejo I al bloquear la transferencia de electrones desde el NADH, generando disminución en la producción de ATP e incremento en la generación de ROS (Zhao et al., 2021; Zhou et al., 2023). Por lo tanto, la similitud en los sitios de interacción con los inhibidores conocidos refuerza la hipótesis de que los compuestos seleccionados podrían afectar la bioenergética mitocondrial en insectos plaga.

Figura 9.

Posiciones de acoplamiento de los compuestos mejor clasificados del complejo mitocondrial I en D. melanogaster, (A) rotenona y piericidina A, (B) bendiocarp, (C) xantona, (D) timol y (E) carvacrol.



Nota: Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, gris claro; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas: las interacciones tipo puente de hidrógeno se colorean en amarillo y en verde las interacciones del tipo π - π .

1.2.6. Complejo II. subunidad A

Los acoplamientos moleculares evidencian interacciones estables con residuos clave del Complejo II (Figura 10), lo que refleja una potencial capacidad inhibitoria de los compuestos evaluados. Esto se relaciona con reportes de moléculas como la atpenina A5, que es un potente inhibidor del sitio de unión de la ubiquinona (Geren et al., 2004), así como con compuestos naturales como el siccanin, que presenta selectividad por enzimas de distintos organismos (Matsushita et al., 2000). De manera similar, otros inhibidores descritos como el tenoiltrifluoroacetona (TTFA) han demostrado bloquear la actividad catalítica de la enzima interfiriendo en la reducción de la ubiquinona (Kusuma & Walker, 1993).

Por tanto, los valores obtenidos en el *docking* sustentan que los compuestos podrían tener efectos comparables a estos inhibidores clásicos.

Como se observa en la Tabla 1, los resultados del *docking* molecular sugieren que los compuestos propoxur, xantona, carvacrol y timol son los que presentan una mayor afinidad por la subunidad A del complejo II. Previamente, se consideraron las interacciones entre la subunidad A y los inhibidores reportados del complejo II, como el carboxin y la tenoiltrifluoroacetona (TTFA), los cuales interactuaron con regiones conservadas del sitio de unión de la ubiquinona. El carboxin mostró interacciones del tipo π - π y tipo puente hidrógeno con residuos localizados en regiones conservadas del complejo II (Figura 10A), mientras que la TTFA presentó interacciones tipo puente de hidrógeno con residuos de estas mismas regiones (Figura 10A). Dichas regiones han sido identificadas como componentes estructurales y funcionales del sitio catalítico del Complejo II, desempeñando un papel importante en la estabilización de los inhibidores y en la interrupción del flujo electrónico normal, al impedir la transferencia de electrones desde el succinato hacia la cadena respiratoria del Complejo II (Yankovskaya et al., 2003; Iverson et al., 1999; Horsefield et al., 2006).

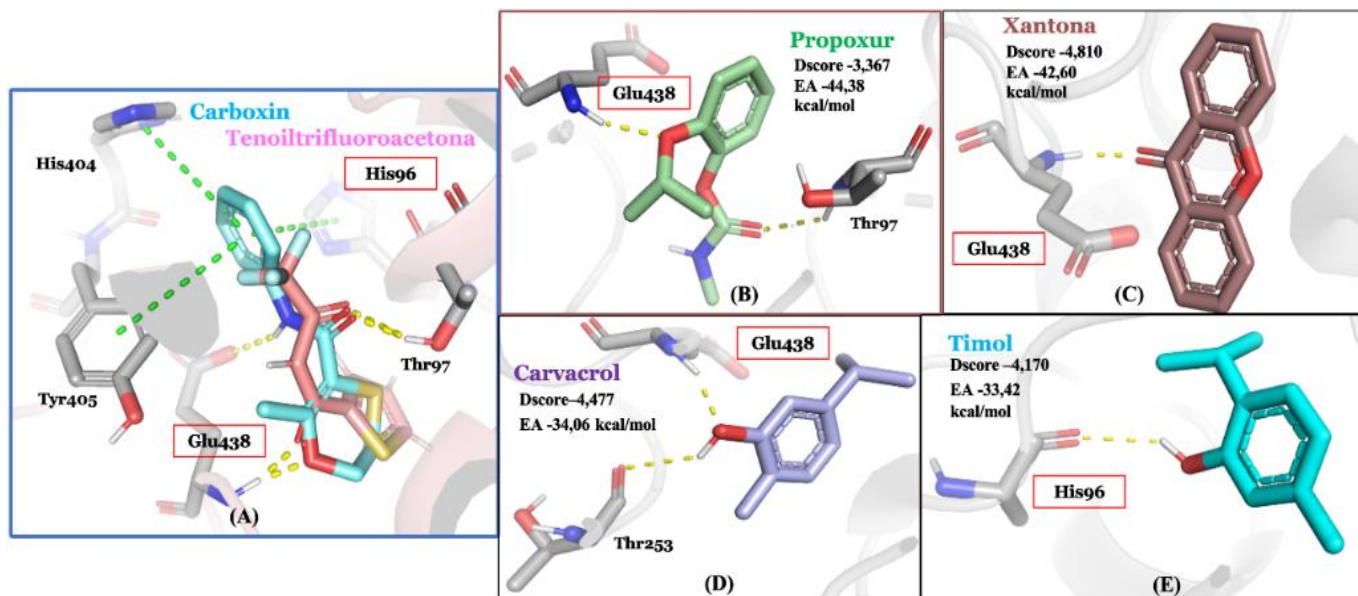
Mediante inspección visual, se observó que el propoxur (Dscore: -3,367; EA: -44,38 kcal/mol, Figura 10B) presentó dos interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos Thr 97 y Glu 438. La xantona (Dscore: -4,810; EA: -42,60 kcal/mol, Figura 10C) y el carvacrol (Dscore: -4,477; EA: -34,06 kcal/mol, Figura 10D) interaccionan de manera polar mediante enlaces de hidrógeno con Glu

438. Finalmente, el timol (Dscore: -4,170; EA: -33,42 kcal/mol, Figura 10E) mostró interacciones del tipo π - π con His 96.

En conjunto, la reproducción de patrones de interacción similares entre los compuestos evaluados y los inhibidores de referencia, particularmente en regiones funcionales conservadas del sitio de unión de la ubiquinona, respalda la selección de estos ligandos como posibles inhibidores del Complejo II y sugiere un mecanismo de acción basado en la interferencia del flujo electrónico y la alteración de la bioenergética mitocondrial.

Figura 10.

Posiciones de acoplamiento de los compuestos mejor clasificados del complejo mitocondrial II en Drosophila melanogaster, (A) carboxin y tenoiltrifluoroacetona (B) propoxur (C) xantona (D) carvacrol (E) Timol.



Nota: Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, gris claro; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas: las interacciones tipo puente de hidrógeno se colorean en amarillo y en verde las interacciones del tipo π - π .

1.2.7. Complejo III. subunidad Cyt b

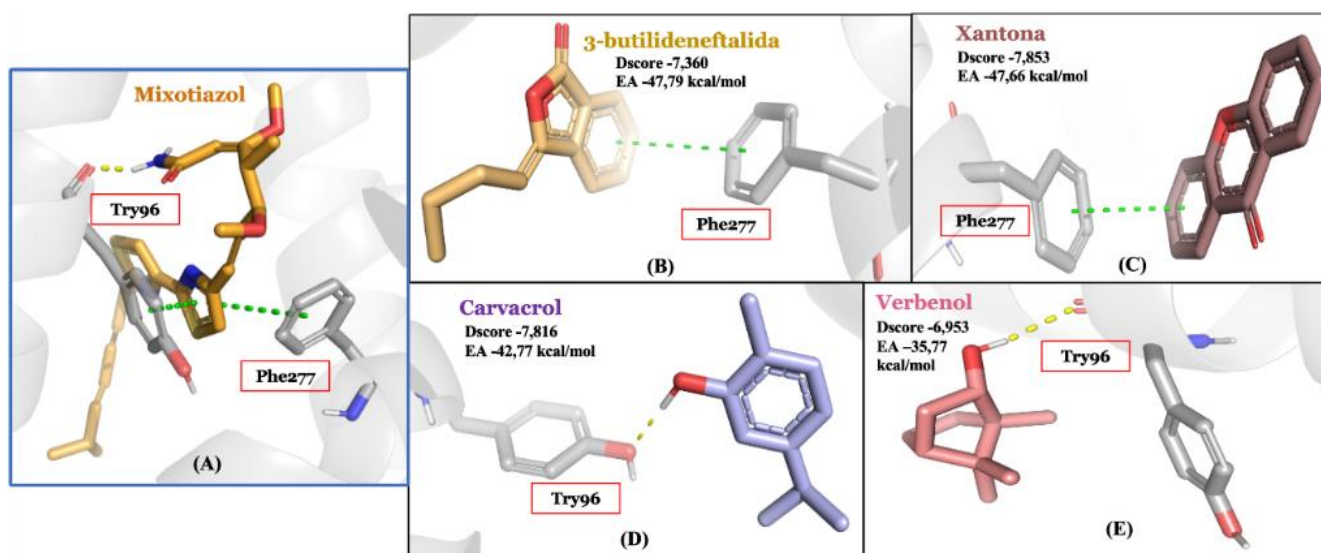
Para la subunidad cyt b del complejo III, se seleccionaron los compuestos 3-butilideneftalida, xantona, carvacrol y verbenol, los cuales presentaron las mayores afinidades según los resultados del acoplamiento molecular mostrados en la Tabla 1. Como compuesto de referencia, se empleó el mixotiazol, un inhibidor clásico del sitio de inhibición de la ubiquinol (Q_o) del Complejo citocromo bc_1 , que bloquea la transferencia de electrones en dicho sitio y, por consiguiente, inhibe la actividad del Complejo III (mixotiazol se une al sitio Q_o de la subunidad cyt b, impidiendo el flujo normal de electrones a la proteína Rieske) (Becker et al., 1981; Liebman, 1978).

En el presente estudio, el mixotiazol mostró interacciones del tipo π - π y de tipo puente de hidrógeno con residuos localizados en regiones funcionales del sitio Q_o de cyt b (Figura 11A). Estas interacciones son representativas de la unión del inhibidor a regiones estructurales conservadas del sitio Q_o , mecanismo que ha sido ampliamente descrito para la inhibición del Complejo III al impedir la oxidación del ubiquinol y la consecuente transferencia de electrones hacia el citocromo c (Mi et al., 1981).

De igual manera, los compuestos 3-butilideneftalida (Dscore: -7,360; EA: -47,79 kcal/mol, Figura 11B) y la xantona (Dscore: -7,853; EA: -47,66 kcal/mol, Figura 11C) evidenciaron una interacción de tipo π - π con Phe 277. El carvacrol (Dscore: -7,816; EA: -42,77 kcal/mol, Figura 11D) presentó una interacción de tipo puente de hidrógeno con Tyr 96, mientras que el verbenol (Dscore: -6,953; EA: -35,77 kcal/mol, Figura 11E) exhibió una interacción de tipo puente de hidrógeno con Try 96. Por ende, estos compuestos reprodujeron patrones de interacción con regiones conservadas similares a los observados para el mixotiazol, lo que sugiere que su unión a estas regiones podría estar asociada con un mecanismo inhibitorio comparable al del inhibidor de referencia.

Figura 11.

Posiciones de acoplamiento de los compuestos mejor clasificados del complejo mitocondrial III en Drosophila melanogaster, (A) mixotiazol (B) 3-butilideneftalida (C) xantona (D) carvacrol (E) verbenol.



Nota: Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, gris claro; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas: las interacciones tipo puente de hidrógeno se colorean en amarillo y en verde las interacciones del tipo π - π .

1.2.8. Complejo IV. subunidad 4

Los valores de energía de afinidad observados en el *docking* indicaron interacciones estables entre los compuestos evaluados y residuos funcionales de la subunidad 4 del Complejo IV, una subunidad con un papel regulador en la actividad de la citocromo c oxidasa. Aunque, los inhibidores clásicos del Complejo IV, como el cianuro, el monóxido de carbono y la azida sódica, se unen directamente al centro binuclear hemo-cobre localizado en la subunidad I, bloqueando la transferencia de electrones al oxígeno y deteniendo la respiración celular, la modulación de subunidades reguladoras como la subunidad IV, asociada con cambios en la eficiencia catalítica y en la regulación funcional del complejo (Rich, 2017; Sharma et al., 2019; Kadenbach & Hüttemann, 2015).

En este contexto, los resultados obtenidos de *docking* sugieren que los compuestos evaluados podrían ejercer un efecto modulador indirecto sobre la actividad del Complejo IV mediante interacciones con la subunidad IV, lo cual podría alterar la dinámica estructural del complejo y, en consecuencia, influir en el funcionamiento del sitio catalítico localizado en la subunidad I.

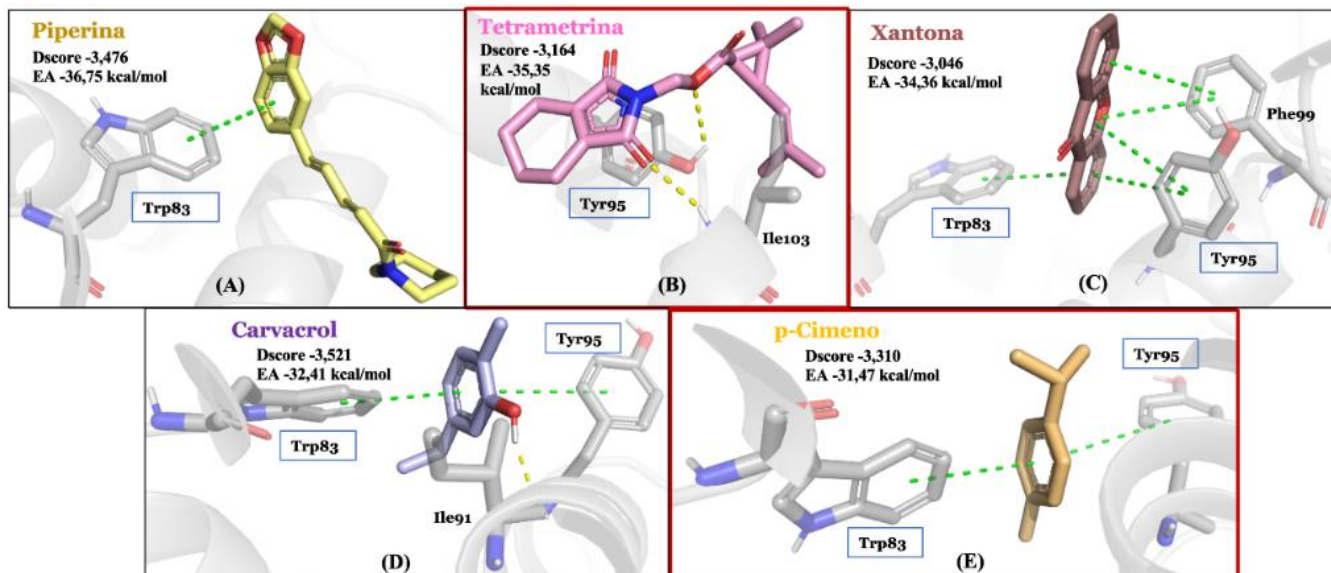
Los compuestos piperina, tetrametrina, xantona, carvacrol y *p*-cimeno evidenciaron la mayor afinidad con la subunidad 4 del complejo IV en el *docking*

molecular (Tabla 1). Debido a las limitaciones inherentes del *docking* molecular para moléculas pequeñas como el cianuro, el monóxido de carbono o la azida sódica, cuyos mecanismos de inhibición dependen de coordinación metálica directa, estados redox del sitio activo y efectos cuánticos, se optó por utilizar insecticidas reportados en la literatura como compuestos de referencia. En este sentido, se seleccionaron la tetrametrina, un insecticida sintético (Zhao et al., 2023) y el *p*-cimeno, un compuesto natural (Yang et al., 2023; Younes et al., 2021), cuyas estructuras químicas más compleja permiten una evaluación más confiable de interacciones del tipo π - π , tipo puente de hidrógeno u otras interacciones.

En el análisis de las interacciones con la subunidad de interés, se mostró que la tetrametrina (Dscore: -3,164; EA: -35,35 kcal/mol, Figura 12B) interacciona de manera polar mediante enlaces tipo puente de hidrógeno con los residuos Tyr 95 y Ile 103 y el *p*-cimeno (Dscore: -3,310; EA: -31,47 kcal/mol, Figura 12E) evidenció interacciones de tipo π - π con los residuos Trp 83 y Tyr 95. La piperina (Dscore: -3,476; EA: -36,75 kcal/mol, Figura 12A) presentó una interacción del tipo puente de hidrógeno con Trp 83, mientras que la xantona (Dscore: -3,046; EA: -34,36 kcal/mol, Figura 12C) exhibió diversas interacciones de tipo π - π con Trp 83, Try 95 y Phe99, y el carvacrol (Dscore: -3,521; EA: -32,41 kcal/mol, Figura 12D) expuso interacciones del tipo π - π con Trp 83 y Try 95 y de tipo puente de hidrógeno con Ile 91.

Figura 12.

Posiciones de acoplamiento de los compuestos mejor clasificados del complejo mitocondrial IV en *Drosophila melanogaster*, (A) piperina, (B) tetrametrina, (C) xantona, (D) carvacrol y (E) p-cimeno.



Nota: Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, gris claro; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas: las interacciones tipo puente de hidrógeno se colorean en amarillo y en verde las interacciones del tipo π - π .

1.3. Conclusiones

El análisis de alineamiento de las estructuras primarias de proteínas mitocondriales de *Drosophila melanogaster* con especies relacionadas evidenció altos porcentajes de identidad mayores al 74% (Figura 3), 61% (Figura 4), 79% (Figura 5) y 50% (Figura 6), en las subunidades ND5, SdhA, cyt b y 4 respectivamente. Esto refleja una fuerte

conservación evolutiva, asimismo, confirma que estas proteínas desempeñan funciones esenciales y altamente conservadas en los procesos de respiración celular y metabolismo energético.

La predicción estructural mediante AlphaFold2 mostró valores de confiabilidad elevados (>80), lo que respalda la calidad de los modelos obtenidos y justifica su uso en análisis posteriores, como el *docking* molecular. La validación estructural indicó que la mayoría de los residuos se encuentran en regiones favorables, lo que fortalece la fiabilidad de las conformaciones propuestas.

Los resultados de *docking* molecular (Tabla 1) sugieren que los compuestos analizados presentan afinidad significativa hacia regiones representativas de los complejos I-IV de la cadena transportadora de electrones. Los valores de energía de afinidad obtenidos indican que estas interacciones podrían comprometer la actividad bioenergética mitocondrial, afectando el flujo electrónico y, en consecuencia, la producción de ATP.

La comparación con inhibidores clásicos de cada complejo (como rotenona en el Complejo I, tenoiltrifluoroacetona en el Complejo II y antimicina A en el Complejo III), así como la tetrametrina y p-cimeno como referencias comparativas en el Complejo IV, refuerza la validez de los hallazgos, ya que los compuestos evaluados exhibieron patrones de unión y afinidades energéticas comparables en regiones estructurales asociadas a la función de dichos complejos.

La integración de los resultados respalda la hipótesis de que las moléculas analizadas tienen el potencial de actuar como moduladores o inhibidores de proteínas mitocondriales esenciales. Esto abre perspectivas para su uso como herramientas en

estudios funcionales de la mitocondria y como posibles candidatos a terapias dirigidas, aunque, será necesario validar experimentalmente la actividad inhibitoria y su relevancia biológica en modelos *in vivo*.

Con base en los resultados del screening virtual presentados en la Tabla 1, se seleccionaron la xantona, el carvacrol y el timol como metabolitos secundarios candidatos para las fases experimentales *in vivo* e *in vitro*. Esta selección se fundamentó en la consistencia de sus valores de energía de afinidad y docking score a lo largo de los complejos mitocondriales evaluados, así como el cumplimiento de los criterios farmacocinéticos ADME establecidos, incluyendo las reglas de Lipinski y valores favorables de permeabilidad en células Caco-2 (QPPCaco). Adicionalmente, se incluyó el propoxur como control positivo, dado su uso reportado como insecticida sintético y su comportamiento comparable en los análisis de acoplamiento molecular. En conjunto, estos compuestos fueron considerados los más prometedores para evaluar su efecto sobre la bioenergética mitocondrial.

2. Análisis in vivo e in vitro de compuestos con posible actividad antimiasis con afectación en los complejos mitocondriales encargados del transporte de electrones en *Drosophila melanogaster*

Este capítulo presenta los resultados obtenidos con los compuestos seleccionados durante la fase *in silico*, los cuales fueron evaluados en las fases *in vivo* e *in vitro*. Para ello, se determinó la actividad insecticida mediante pruebas de toxicidad. Posteriormente, se corroboró si el efecto tóxico observado estaba relacionado con la inhibición directa de los complejos de la cadena mitocondrial respiratoria. Por ende, este capítulo expone los resultados toxicológicos de los compuestos xantona, carvacrol y timol en el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, junto con la evaluación del posible mecanismo de acción en la mitocondria, con el fin de correlacionar la actividad insecticida con una posible inhibición de la actividad enzimática de los complejos mencionados. Los resultados presentados abordan los siguientes objetivos:

Determinar el efecto de los compuestos previamente seleccionados en el desarrollo de la especie *Drosophila melanogaster*.

Evaluar *in vitro* el efecto de los metabolitos con mejor actividad insecticida sobre la bioenergética mitocondrial en el estadio adulto *Drosophila melanogaster*.

Fases *in vivo* e *in vitro*

En este capítulo, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* e *in vitro* con el propósito de validar los compuestos seleccionados en la fase *in silico*. En la fase *in vivo* (Figura 13), se evaluó la actividad insecticida de los compuestos naturales xantona, carvacrol y timol en *Drosophila*

melanogaster, utilizando medios de alimentación enriquecidos con los compuestos y sus respectivos controles positivos y negativos. Se seleccionaron grupos de moscas vírgenes (5 hembras y 3 machos), y se realizó un seguimiento a lo largo de su ciclo de vida. Durante esta etapa se determinaron parámetros clave como el promedio de supervivencia post-embrionaria, mediante el cálculo del número de individuos adultos emergidos respecto al número total de embriones comparado con el control negativo, y la concentración inhibitoria medio (IC_{50}), que corresponde a la dosis necesaria para inhibir el 50% de la eclosión o supervivencia larval, lo cual es un indicador estándar de toxicidad aguda (Abbott, 1925; Finney, 1971). Estas evaluaciones permiten cuantificar el efecto letal y subletal de los compuestos probados.

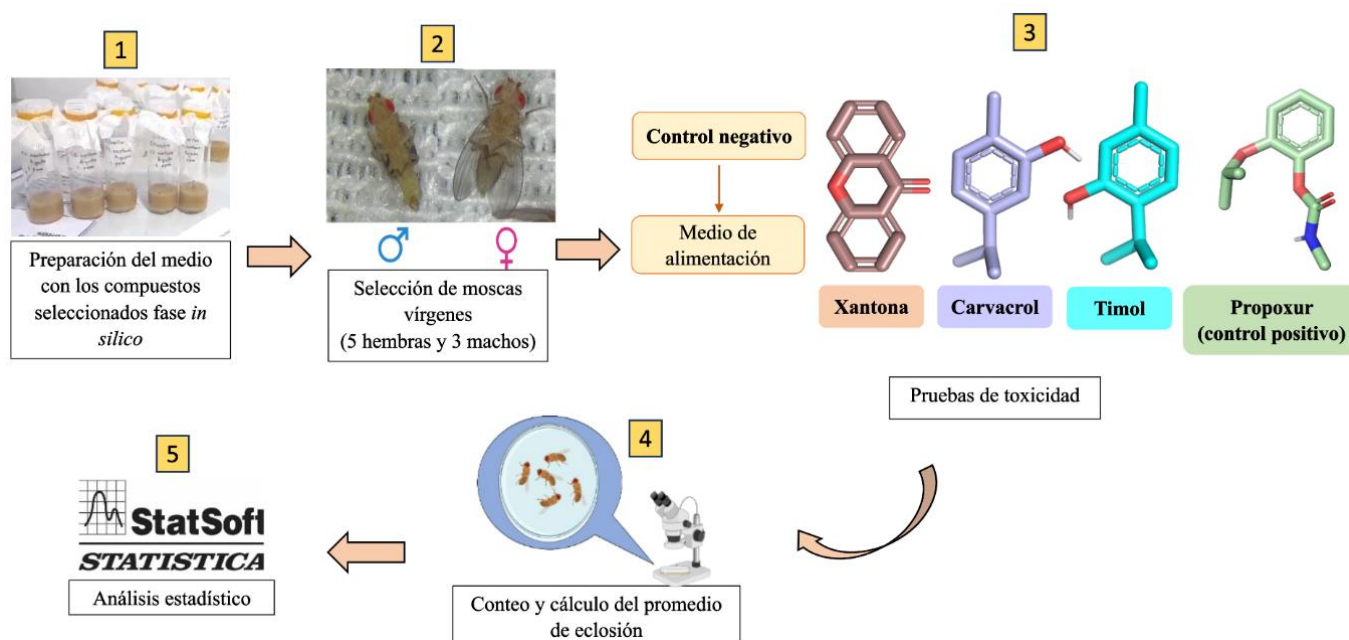
En la fase *in vitro* (Figura 14), se analizó el efecto de los compuestos en la bioenergética mitocondrial a partir de homogeneizados de moscas adultas. Las muestras fueron procesadas en tampones específicos (sacarosa, HEPES, BSA, EGTA) y posteriormente filtradas para obtener extractos crudos ricos en proteínas. La cuantificación de proteínas totales se realizó utilizando el método de Bradford, basado en el cambio de absorbancia generado por la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-50 a las proteínas, lo que permite una medición rápida, sensible y compatible con diversos tampones (Bradford, 1976).

Posteriormente, se evaluó la actividad enzimática mitocondrial asociada a los complejos I-IV mediante la medición de la actividad de las enzimas NADH oxidasa y succinato oxidasa, las cuales fueron analizadas utilizando el método de Singer (Singer, 1974), que permite cuantificar la velocidad de consumo de oxígeno en función de la actividad mitocondrial. Estas mediciones se realizaron mediante un oxígrafo de alta resolución Oroboros O₂k, que permite determinar la tasa respiratoria mitocondrial en tiempo real con alta sensibilidad y precisión. Este enfoque integrador

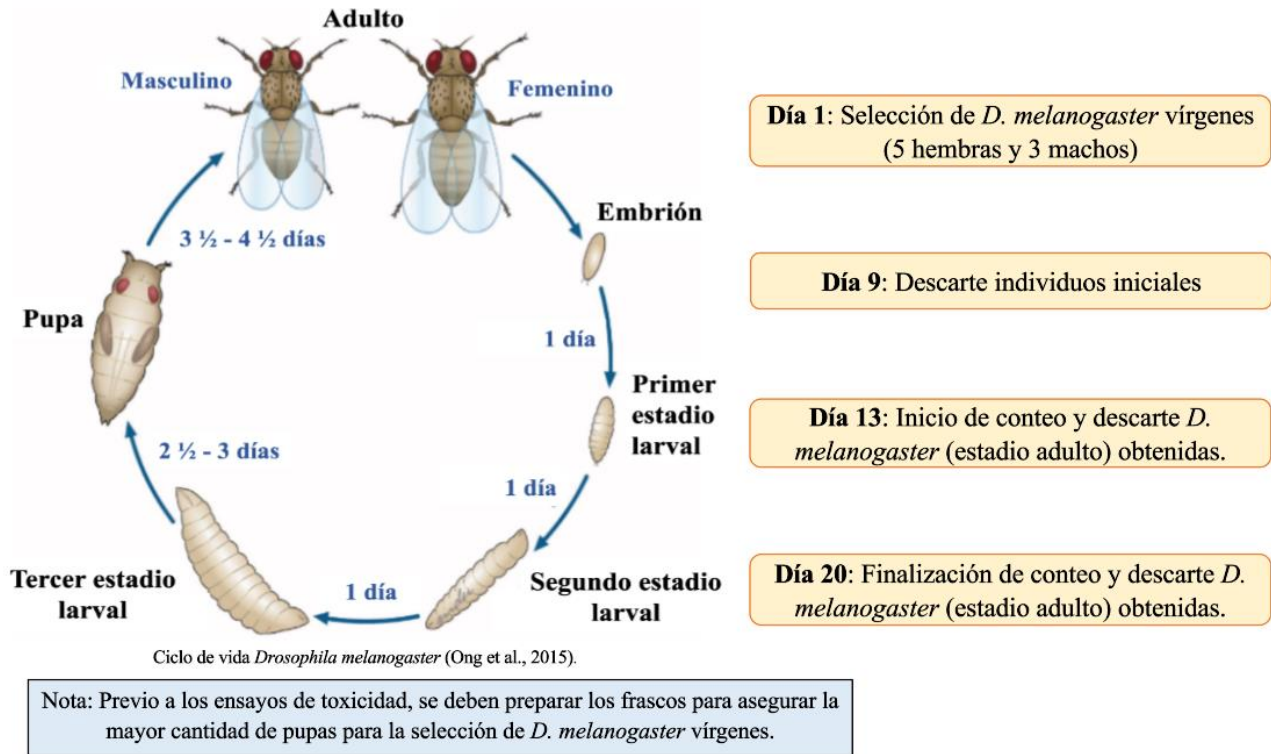
permitió correlacionar los efectos observados *in vivo* con alteraciones funcionales a nivel mitocondrial, fundamentales para comprender el mecanismo de acción de los compuestos.

Figura 13.

Esquema fase *in vivo* (A) Descripción de la metodología de la fase *in vivo*. (B) Descripción de los ensayos de toxicidad en *D. melanogaster*.



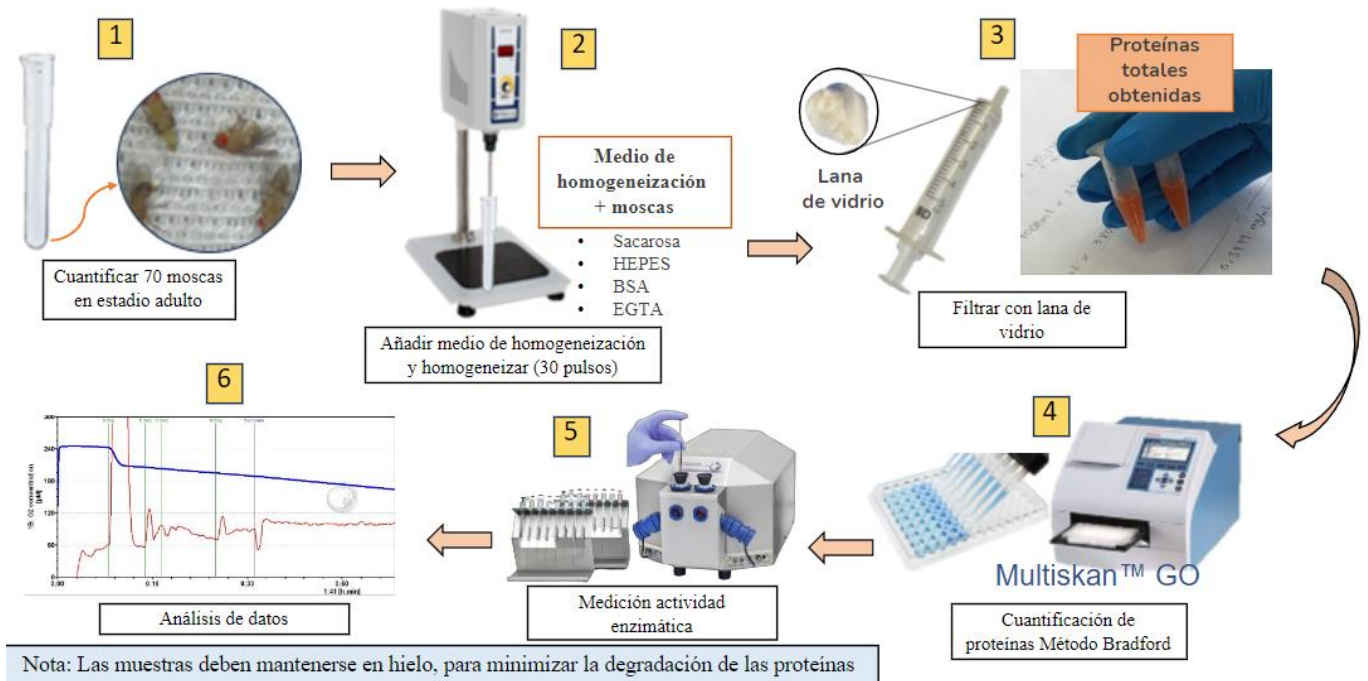
(A)



(B)

Figura 14.

Descripción de la metodología de la fase in vitro.



2.1. Metodología fase *in vivo*: Actividad insecticida

Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo con la colonia silvestre de *Drosophila melanogaster*, mantenida en frascos con alimento o medio para moscas a 24°C, 70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se determinó la solubilidad de la xantona, carvacrol y timol en etanol y DMSO, seleccionando el etanol como disolvente a concentraciones inferiores al 0.1%, para evitar toxicidad en las moscas.

Los valores de concentraciones iniciales de estudio correspondieron a los cálculos de CL₅₀ obtenidos por las estudiantes María Fernanda Pérez y Daniela Zulay Angarita, quienes realizaron estudios en el Grupo de Investigación de Bioquímica y Microbiología (GIBIM) y el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP). En su investigación, evaluaron la actividad insecticida de metabolitos secundarios en *Aedes*

aegypti, con la mitocondria y la acetilcolinesterasa como dianas farmacológicas. Las enzimas de la cadena transportadora de electrones utilizadas en su estudio coinciden con las empleadas en este proyecto, y el alineamiento de sus secuencias primarias con las especies de interés mostró altos porcentajes de identidad (Figura 3, Figura 4, Figura 5 y Figura 6), proporcionando un punto de partida para determinar las concentraciones iniciales a evaluar. Sus resultados reportaron valores de CL₅₀ de 3,5 ppm para la xantona, 37,4 ppm para el carvacrol y 63,3 ppm para el timol (Angarita Vergara, 2023; Pérez Rojas, 2022).

Los metabolitos seleccionados (xantona, carvacrol y timol) y el propoxur (control positivo), un insecticida comercial principalmente empleado en insectos de importancia sanitaria (Balaska, 2024), se incorporaron al medio de alimentación de *Drosophila melanogaster* a las concentraciones previamente establecidas. La adición de cada compuesto se realizó antes de la solidificación del alimento, asegurando una mezcla homogénea. Posteriormente, el medio se distribuyó en viales estériles para los ensayos.

Para los bioensayos (Figura 13), se seleccionan moscas vírgenes (5 hembras y 3 machos) y se colocaron en viales con el alimento tratado y en viales de control (medio sin adición de compuestos). Tras nueve días, los individuos parentales se descartaron, permitiendo el desarrollo de la progenie en el medio correspondiente. A partir del día 13, se inició el conteo de los adultos emergidos, proceso que se mantuvo hasta el día 20, cuando se registró el número total de moscas eclosionadas en cada condición experimental.

Cada tratamiento se evaluó en tres ensayos independientes y cinco réplicas por cada ensayo, los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente para determinar el efecto

de los compuestos sobre el porcentaje de eclosión y el desempeño reproductivo, comparando los resultados frente al control. La metodología empleada para estos bioensayos se basó en el trabajo de referencia de Kumar et al (2013), adaptada a los objetivos del presente estudio.

Posteriormente, considerando los resultados de las concentraciones diagnósticas frente al control negativo, se seleccionaron concentraciones adicionales para profundizar en la respuesta biológica: 1,0 y 5,0 ppm para la xantona, 5,0 y 50,0 ppm para el carvacrol y 150,0 y 300,0 ppm para el timol. El control negativo consistió en el medio de alimentación sin adición de metabolitos. Para cada concentración se realizaron ensayos por quintuplicado (n=40 adultos), con tres réplicas independientes, utilizando un total de 120 adultos por tratamiento.

El registro de los adultos que completaron todas las etapas post-embrionarias se efectuó durante los últimos ocho días del ensayo, contabilizando los individuos cada 24 h y clasificándolos por sexo. Finalmente, los valores obtenidos se compararon con el control negativo para calcular los porcentajes de supervivencia post-embrionaria. Estos datos se analizaron mediante un modelo de regresión logarítmica con el programa Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2011), determinándose los valores de la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) para cada metabolito.

2.2. Metodología fase *in vitro*: Determinación de la actividad enzimática mitocondrial

En la fase *in vitro* se evaluó la actividad enzimática mitocondrial de los compuestos que demostraron efectos insecticidas en la fase *in vivo*. El objetivo fue determinar si los metabolitos (xantona, carvacrol y timol) presentan actividad sobre la bioenergética

mitocondrial, particularmente en las enzimas oxidasas de la cadena transportadora de electrones. Se realizaron tres ensayos independientes en cuadruplicado para cada concentración, empleando como punto de partida los valores de IC₅₀ previamente establecidos (3,5 ppm para xantona, 50,0 ppm para carvacrol y 150,0 ppm para timol).

2.2.1. Homogeneizado y cuantificación de proteínas *D. melanogaster*

Se utilizaron 70 adultos de *D. melanogaster* por ensayo, los cuales fueron previamente sedados con CO₂ y mantenidos en condiciones frías para evitar la degradación proteica. Los organismos se homogeneizaron en 500 µL de medio de aislamiento compuesto por sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, y EGTA 1 mM ajustado a pH 7,2. La homogeneización se realizó en un potter-elvehjem, seguido de filtración mediante lana de vidrio para eliminar restos celulares gruesos.

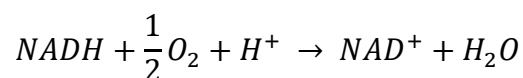
La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), basado en la unión de proteínas al colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 y cuantificado a 595 nm. Este procedimiento permitió estandarizar la cantidad de proteína empleada en los análisis enzimáticos.

2.2.2. Medición enzimas oxidasas (*NADH oxidasa y succinato oxidasa*)

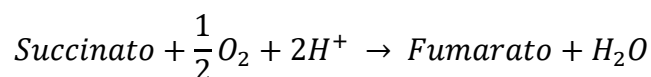
La actividad de las enzimas oxidasas dependientes de NADH (complejo I) y succinato (complejo II) se evaluó utilizando el método descrito por Singer (1974) el cual permite determinar la velocidad de oxidación de los sustratos y, en consecuencia, la tasa de consumo de oxígeno asociada al transporte electrónico.

El sistema de reacción consistió en un buffer fosfato 80 mM (pH 7,4), EDTA 50 μ M y 0,2 mg/mL de proteína extraída. Como sustratos se emplearon NADH (0,17 mM) o succinato (10 mM), midiendo la velocidad de oxidación en ausencia y presencia de los metabolitos (xantona, carvacrol y timol). La reacción se llevó a cabo en un oxígrafo O2k-Respirometer (Oroboros Instruments), registrando la actividad enzimática mediante el software DatLab CD (Gnaiger, 2009). Las reacciones evaluadas corresponden a:

Ecuación 1. Esquema de reacción NADH oxidasa.



Ecuación 2. Esquema de reacción del succinato oxidasa.



2.3. Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron en tres experimentos independientes, cada uno con cuatro réplicas por sustrato. Los datos obtenidos fueron organizados en hojas de cálculo y sometidos a un análisis descriptivo (media, desviación estándar y porcentaje de error). Posteriormente, se aplicaron pruebas de normalidad para determinar la distribución de los datos.

En los casos con distribución normal se utilizó un ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey; mientras que, en ausencia de normalidad, se aplicaron pruebas no

paramétricas. El nivel de significancia estadística se estableció en $p \leq 0.05$. El análisis se llevó a cabo utilizando el software Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2011).

2.4. Resultados y discusión de la actividad insecticida

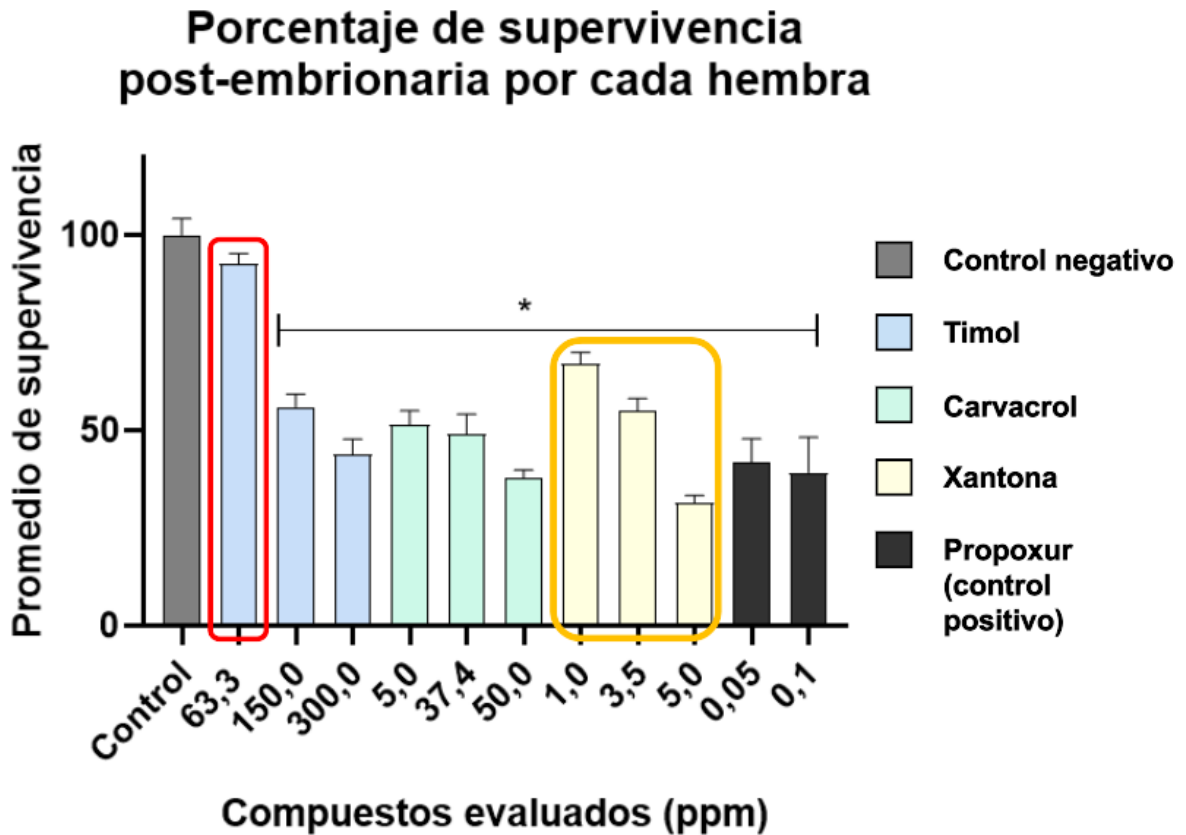
Se evaluó la actividad insecticida de cada metabolito (xantona, carvacrol y timol) en el ciclo de vida *D. melanogaster*, mediante pruebas de toxicidad, comparando el número de individuos adultos obtenidos luego de la fase post-embionaria con la presencia y ausencia (control negativo) de los metabolitos en estudio.

Inicialmente, se evaluaron concentraciones diagnósticas basadas en los valores obtenidos de las concentraciones inhibitorias al 50% (IC_{50}), en estudios previos realizados por el grupo de investigación, los cuales fueron 3,5 ppm para la xantona, 37,4 ppm para el carvacrol y 63,3 ppm para el timol. Se usó el medio de alimentación como control negativo y como control positivo, se utilizó el propoxur. Estos resultados se compararon con el control negativo para determinar el porcentaje de supervivencia post-embionaria, lo que permitió seleccionar concentraciones adicionales, con el fin de obtener la concentración el porcentaje de la concentración inhibitoria al 50% de cada metabolito.

Los ensayos con las concentraciones diagnósticas demostraron resultados estadísticamente significativos con respecto al control (Figura 15) con la xantona a 3,5 ppm y el carvacrol a 37,4 ppm con porcentajes de supervivencia de 56,32% y 51,01%, respectivamente, sin embargo, el timol a 63,3 ppm con un porcentaje de supervivencia del 93,01% no evidenció diferencias estadísticamente significativas con su respectivo control. En consecuencia, se estableció evaluar concentraciones de 1,0 y 5,0 ppm para la xantona, 5,0 y 50,0 ppm para el carvacrol y 150,0 y 300,0 ppm para el timol.

Figura 15.

*Porcentaje de supervivencia post-embriónica en individuos *Drosophila melanogaster* alimentados con los compuestos timol, carvacrol, xantona y propoxur.*



Nota: Se realizó cinco replicas para cada ensayo y tres ensayos independientes, donde

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

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* (Figura 15) muestran que los metabolitos evaluados (xantona, carvacrol y timol) ejercieron diferentes grados de efecto insecticida sobre *Drosophila melanogaster*. La xantona evidenció la mayor capacidad insecticida, presentando una disminución significativa en el porcentaje de supervivencia post-embriónica de 68,37% y 56,32% incluso a bajas concentraciones (1,0 y 3,5 ppm)

alcanzando un 52,98% de supervivencia en la dosis más alta (5,0 ppm). Estos hallazgos sugieren que la xantona interfiere de manera eficaz con el desarrollo de la mosca, posiblemente a través de alteraciones en la bioenergética mitocondrial, mecanismo previamente reportado para compuestos fenólicos con propiedades pro-oxidantes (Martínez et al., 2020; Cazarolli et al., 2008).

Por otro lado, el carvacrol exhibió un efecto intermedio y dependiente de la dosis: mostró disminuciones en supervivencia con porcentajes de 51,01% y 39,34% en concentraciones medias-altas (37,4 ppm y 50,0 ppm), coherente con la literatura que describe a los monoterpenos fenólicos como agentes capaces de alterar membranas celulares, generar estrés oxidativo y afectar funciones mitocondriales en insectos (Pavela & Benelli, 2016; Isman, 2020).

Respecto al timol, la Figura 15 y los análisis indican un comportamiento dosis-dependiente: no se observaron diferencias significativas frente al control a 63,3 ppm, pero, sí se detectaron reducciones significativas de supervivencia a las concentraciones mayores evaluadas (150,0 y 300,0 ppm) con porcentajes de supervivencia de 55,87% y 45,06%, respectivamente. Esto sugiere que el timol requiere una dosis umbral relativamente alta para manifestar efectos letales o subletales en *D. melanogaster* bajo las condiciones del ensayo. Este patrón es consistente con estudios previos que muestran que la eficacia del timol (y de compuestos afines) puede variar mucho según la especie, la vía de exposición y la dosis utilizada (Isman, 2020; Koul et al., 2008)

El propoxur, empleado como control positivo, mostró una marcada reducción en la supervivencia post-embrionaria (41,80% y 35,31% a 0,005 y 0,1 ppm, respectivamente)

validando la sensibilidad del modelo experimental y la fiabilidad de los procedimientos de exposición y conteo (Balaska, 2024).

En conjunto, los resultados indican que: (i) la xantona es una candidata prometedora para futuras evaluaciones (mecanismos de acción y pruebas de selectividad), (ii) el carvacrol presenta un efecto moderado pero consistente con la acción típica de monoterpenos, y (iii) el timol requiere concentraciones superiores para mostrar actividad significativa en *D. melanogaster*. Estas diferencias pueden atribuirse a la estructura química de cada compuesto y su afinidad por blancos moleculares asociados a la bioenergética y al sistema nervioso de los insectos.

2.5. Resultados actividad enzimática mitocondrial

Teniendo en cuenta la mortalidad presentada por la presencia de los metabolitos secundarios (xantona, carvacrol y timol) en la fase *in vivo* y sus bajas concentraciones inhibitorias al 50% (IC₅₀), se evaluó el efecto de los metabolitos sobre la actividad mitocondrial con el fin de determinar si estas moléculas presentan inhibición en la cadena respiratoria encargada del transporte de electrones.

Se determinó la actividad de las enzimas oxidasas (NADH y succinato oxidasa), empleando como concentraciones de referencia aquellas equivalentes a las IC₅₀: 3,5 ppm para la xantona, 50,0 ppm para el carvacrol y 150,0 ppm para el timol. Posteriormente, se incluyeron concentraciones adicionales (más bajas) con el propósito de establecer si el efecto observado era dependiente de la dosis y descartar artefactos relacionados con la desnaturalización proteica.

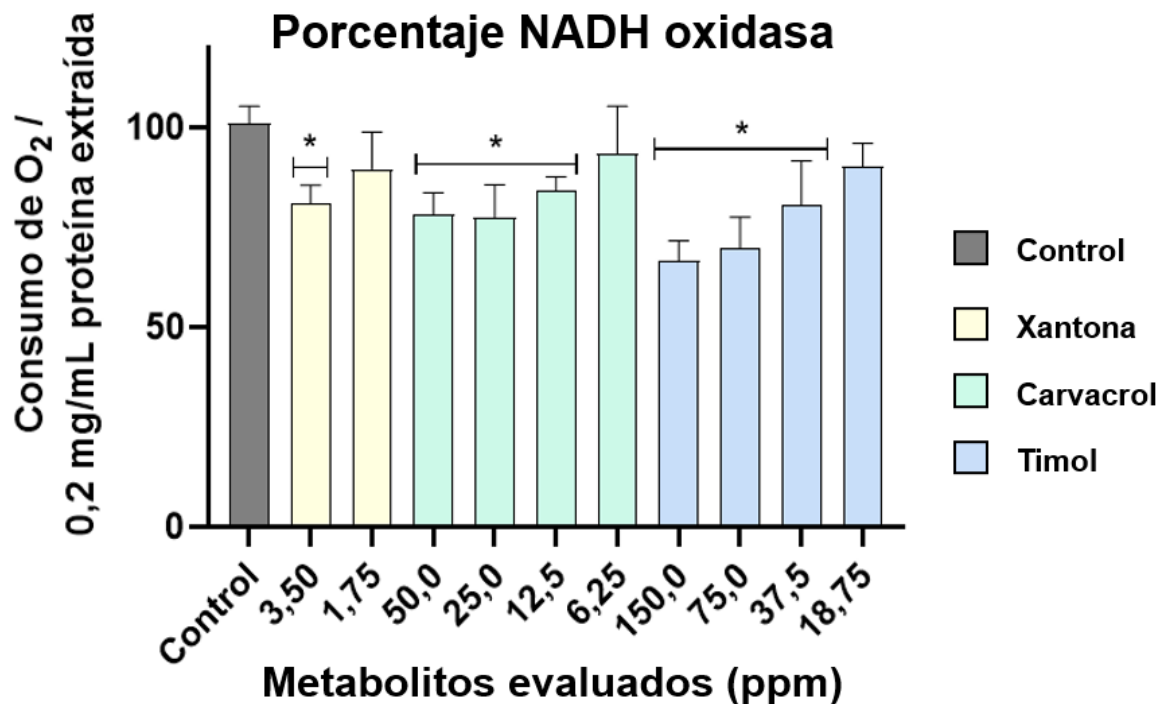
2.5.1. *NADH oxidasa*

En este ensayo se evaluó la actividad de la NADH oxidasa, enzima que transfiere electrones desde el NADH a través de los complejos I-IV de la cadena respiratoria, hasta el oxígeno molecular, que actúa como aceptor final y se reduce a agua.

Tal como se observa en la Figura 16, los metabolitos evaluados evidenciaron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración, con diferencias estadísticamente significativas frente al control negativo. La xantona presentó una reducción clara de la actividad enzimática a 3,5 ppm, mientras que a la menor concentración evaluada (1,75 ppm) no se detectaron diferencias estadísticas. El carvacrol mostró un efecto inhibitorio progresivo, con reducciones significativas en el consumo de oxígeno desde 50,0 hasta 12,5 ppm, siendo más evidente en las concentraciones intermedias, lo que indica un perfil de inhibición sostenida. En el caso del timol, se observaron disminuciones significativas desde 150,0 hasta 37,5 ppm, mientras que a 18,75 ppm no se registraron diferencias con respecto al control, lo que sugiere un comportamiento lineal dependiente de la dosis.

Figura 16.

Actividad de la NADH oxidasa, en presencia de xantona, carvacrol y timol.



Nota: El control tiene un valor de $69,27 \pm 1,83 \text{ pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} / 0,2 \text{ mg/mL}$ que corresponde al 100% de la actividad de la enzima.

Estos resultados indican que la xantona fue el compuesto más efectivo en término de inhibición de la NADH oxidasa, seguida por el carvacrol, y por último el timol. La inhibición observada a bajas concentraciones para la xantona y el carvacrol sugiere que estos metabolitos pueden interferir de manera directa con la actividad de los complejos mitocondriales implicados en la transferencia de electrones, afectando el flujo electrónico y disminuyendo la actividad enzimática, en concordancia con lo reportado para otros moduladores del transporte electrónico mitocondrial (Hirst, 2013; Sousa et al., 2018).

La disminución del consumo de oxígeno observada en la presencia de los metabolitos respalda la hipótesis de que interfiere en el flujo electrónico de la cadena respiratoria, afectando la producción de ATP por fosforilación oxidativa. Este mecanismo mitocondrial explica los efectos insecticidas encontrados en la fase *in vivo*, donde también se evidenció una reducción significativa en la supervivencia de *D. melanogaster*. En conjunto, los hallazgos confirman que la mitocondria constituye una diana farmacológica central para estos compuestos naturales (Affourtit et al., 2001; Perić-Mataruga et al., 2018).

2.5.2. *Succinato oxidasa*

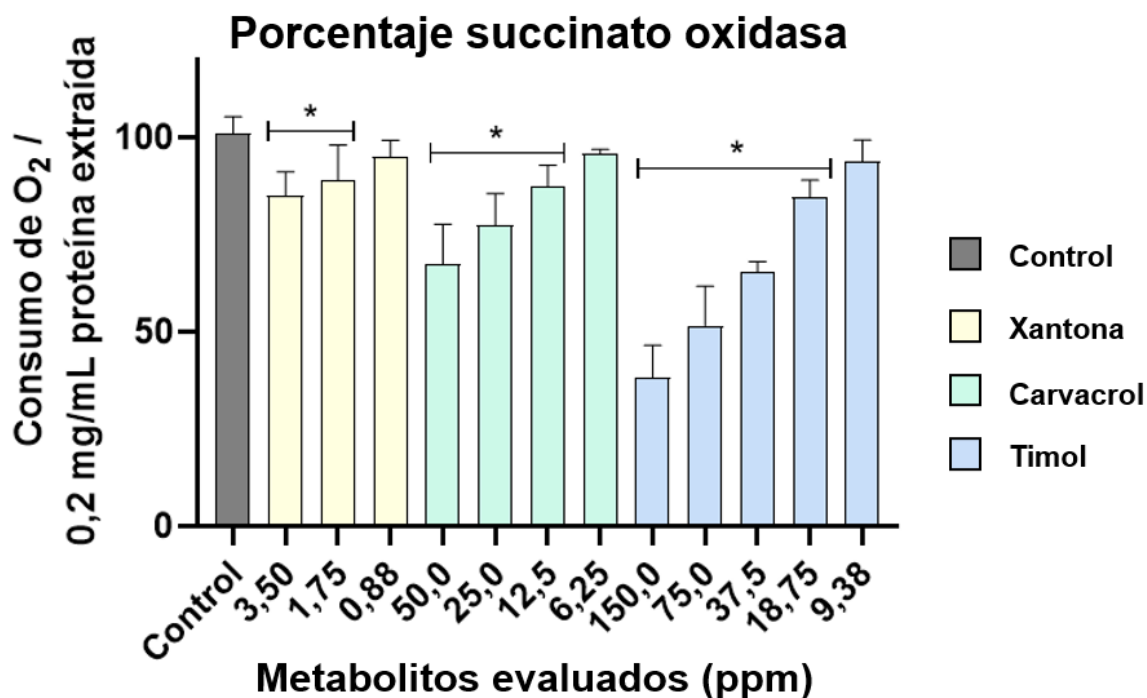
La enzima succinato oxidasa cataliza el paso de electrones desde el succinato hacia el complejo II y posteriormente a través de los complejos III y IV de la cadena de transporte electrónico, contribuyendo directamente a la producción de ATP. Su inhibición compromete el metabolismo energético celular, lo que puede ser letal para organismos dependientes de una alta tasa respiratoria como los insectos.

En la Figura 17, se observa que los tres metabolitos evaluados (xantona, carvacrol y timol) generaron una disminución significativa de la actividad de la succinato oxidasa con respecto al control, aunque con diferencias marcadas en potencia y concentración:

- Xantona: A la concentración inhibitoria al 50% (3,5 ppm), produjo una inhibición moderada, cercana al 80% de la actividad relativa. Efecto similar se observó a la mitad del IC₅₀ (1,75 ppm), sugiriendo que este compuesto interfiere fuertemente el transporte de electrones desde el Complejo II, sin variaciones drásticas dependientes de la dosis.
- Carvacrol: Mostró un efecto más pronunciado y dependiente de la concentración. En 50,0 ppm la inhibición fue significativa (actividad reducida cercana del 70%), mientras que en dosis intermedias (25,0 y 12,5 ppm) la reducción fue más marcada, llegando incluso al 60% en promedio. Esto sugiere que el carvacrol ejerce una interferencia más fuerte sobre la succinato oxidasa que la xantona, posiblemente por interacción directa con los sitios catalíticos de la enzima o con la membrana interna mitocondrial.
- Timol: Fue el metabolito con mayor efecto inhibitorio. En la concentración de 150,0 ppm, la actividad enzimática se redujo drásticamente a niveles cercanos al 40% manteniéndose baja incluso en las concentraciones intermedias (75,0 y 37,5 ppm). Aunque en dosis bajas (18,7 y 9,38 ppm) la inhibición fue menos severa, y a 18,7 ppm todavía registró diferencias significativas con respecto al control.

Figura 17.

Actividad de la succinato oxidasa, en presencia de xantona, carvacrol y timol.



Nota: El 100% corresponde a la respiración del control negativo con un valor de $85,16 \pm 2,01 \text{ pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} / 0,2 \text{ mg/mL proteína}$ que corresponde al 100% de la actividad de la enzima.

Estos resultados evidencian que los tres metabolitos interfieren con el transporte de electrones en algún punto desde el Complejo II al IV, confirmando que la mitocondria es un blanco primario de su acción. La inhibición sobre la succinato oxidasa puede generar un colapso en la síntesis de ATP, acumulación de electrones reducidos y aumento del estrés oxidativo (Vercesi et al., 2006; Peric-Mataruga et al., 2018).

En términos comparativos, mientras la xantona mostró un efecto inhibitorio más estable y moderado, el carvacrol y especialmente el timol evidenciaron un perfil de inhibición más fuerte y dependiente de la concentración. Estos resultados

coinciden con lo observado en la inhibición de la NADH oxidasa, reforzando la hipótesis de que estos metabolitos podrían afectar múltiples sitios de la cadena respiratoria.

2.6. Discusión de la actividad enzimática mitocondrial

2.6.1. Inhibición de la NADH oxidasa

Los resultados obtenidos para la NADH oxidasa evidencian que los metabolitos evaluados (xantona, carvacrol y timol) presentaron inhibiciones significativas a las concentraciones diagnósticas (Figura 16). Esto indica que estas moléculas interfieren directamente con el transporte de electrones desde el Complejo I hacia la coenzima Q, comprometiendo así la eficiencia del metabolismo energético mitocondrial.

Estudios previos han demostrado que compuestos fenólicos y heterocíclicos pueden afectar el flujo electrónico en el Complejo I, generando una reducción en la capacidad bioenergética y un incremento del estrés oxidativo (González-Laredo et al., 2021; Sanz et al., 2022). En particular, el carvacrol ha sido reportado como un inhibidor potente del transporte de electrones en células eucariotas debido a su capacidad de alterar la membrana mitocondrial y desestabilizar proteínas respiratorias (Marchese et al., 2018).

2.6.2. Inhibición de la succinato oxidasa

En el caso de la succinato oxidasa, se observaron diferencias dependientes de la concentración (Figura 17). La xantona produjo inhibición únicamente a su

mayor concentración (3,5 ppm), mientras que el timol mostró un efecto claro y significativo a concentraciones altas (150,0 y 75,0 ppm), pero, no a valores más bajos. El carvacrol, en contraste, presentó un perfil más potente, evidenciando inhibición incluso a concentraciones intermedias (25,0 y 12,5 ppm), lo que lo posiciona como el mejor metabolito con mayor capacidad para alterar la función del transporte de electrones desde el Complejo II.

Este comportamiento es consistente con lo descrito en la literatura, donde compuestos monoterpénicos como carvacrol y timol ejercen acciones insecticidas mediante la disrupción de membranas y la inhibición de enzimas mitocondriales clave, lo que conlleva a una reducción de la producción de ATP y, finalmente, a la muerte celular (Ahmad et al., Pavela & Maggi, 2017).

2.6.3. Comparación entre metabolitos

La comparación integrada de ambos sistemas revela que la xantona es el metabolito más eficaz, ya que evidenció inhibición en las enzimas NADH y succinato oxidasa a concentraciones mucho menores que las requeridas por el carvacrol y el timol, lo cual indica una mayor afinidad o capacidad de interacción con los sitios críticos de la cadena respiratoria. El carvacrol, aunque mostró un efecto sostenido en ambos complejos evaluados, necesitó concentraciones más elevadas para producir inhibiciones significativas. Por su parte, el timol presentó un perfil más variable y dependiente de la dosis, con un efecto más marcado sobre la succinato oxidasa que sobre la NADH oxidasa. Este patrón diferencial sugiere que, aunque los tres metabolitos comparten la capacidad de interferir con la

respiración mitocondrial, la xantona se perfila como el metabolito con mayor potencial insecticida debido a su acción inhibitoria a bajas concentraciones.

2.6.4. Relación con la actividad insecticida

Los resultados *in vitro* respaldan los hallazgos observados en los ensayos *in vivo*, donde se registró una mayor mortalidad post-embionaria en *Drosophila melanogaster* al exponerla a carvacrol y timol. La inhibición simultánea observada en las enzimas NADH y succinato oxidasa representa un mecanismo clave del efecto insecticida, ya que compromete el flujo electrónico y, por tanto, la producción de energía en la mitocondria. Este doble bloqueo puede explicar la eficacia diferencial entre los metabolitos, reforzando la idea de que la alteración de la bioenergética mitocondrial constituye un blanco estratégico en el desarrollo de insecticidas de origen natural (Ahmad et al., 2019; Sanz et al., 2022).

2.7. Conclusiones

Los ensayos *in vivo* demostraron que los metabolitos secundarios evaluados, xantona, carvacrol y timol, ejercen un efecto diferencial en el desarrollo post-embionario de *Drosophila melanogaster*. La xantona se destacó como el compuesto más activo, reduciendo significativamente la eclosión de adultos incluso a bajas concentraciones (1,0-5,0 ppm). El carvacrol presentó un efecto insecticida intermedio y dependiente de la concentración, mientras que el timol sólo evidenció reducciones en la supervivencia con

requerimientos de concentraciones más elevadas para inducir mortalidad significativa, indicando una menor potencia relativa bajo las condiciones evaluadas.

En la fase *in vitro*, los análisis de actividad mitocondrial evidenciaron que los tres metabolitos inhibieron las enzimas NADH oxidasa y succinato oxidasa, confirmando una alteración del transporte electrónico mitocondrial. La xantona presentó una notable capacidad inhibitoria en ambas enzimas a concentraciones considerablemente menores que las requeridas para el carvacrol y timol, lo que indica una mayor eficacia para comprometer la bioenergética mitocondrial. El carvacrol y el timol también afectaron la actividad enzimática, aunque de forma más dependiente de la concentración y con perfiles diferenciales entre ambas oxidadas.

La integración de los resultados *in vivo* e *in vitro* permite concluir que la respiración mitocondrial está asociada con la reducción de la supervivencia post-embrionaria observada en *D. melanogaster*. En particular, la xantona se perfila como el metabolito con mayor potencial insecticida, al combinar una alta eficacia biológica con una inhibición mitocondrial significativa a bajas concentraciones. Por su parte, el carvacrol y timol, aunque activos, requieren concentraciones más altas para producir efectos comparables.

3: Discusión y conclusiones globales

3.1. Discusión global

La búsqueda de nuevos agentes de control de insectos se ha orientado hacia metabolitos secundarios de plantas debido a su menor persistencia ambiental y potencial de selectividad. En este estudio, la integración de metodologías *in silico*, *in vivo* e *in vitro* permitió validar la mitocondria como una diana farmacológica estratégica para metabolitos como la xantona, el carvacrol y el timol en el modelo *Drosophila melanogaster*.

Los altos porcentajes de identidad (hasta 79%) en las subunidades mitocondriales de *D. melanogaster* respecto a otras especies sugieren una conservación evolutiva crítica. El uso de AlphaFold2 y el *docking* molecular permitió predecir que la xantona, el carvacrol y el timol interactúan con regiones clave de los complejos I al IV. Esta afinidad predicha es consistente con lo reportado para compuestos fenólicos que actúan como inhibidores del transporte de electrones al mimetizar o competir con la ubiquinona (Hirst, 2013).

El efecto diferencial observado en la supervivencia post-embionaria demuestra que no todos los metabolitos poseen la misma biodisponibilidad o potencia. La xantona se destacó por su alta toxicidad a concentraciones mínimas (1,0-3,5 ppm). En contraste, el timol requirió dosis hasta 100 veces superiores (150,0-300,0 ppm) para mostrar efectos significativos. Según Isman (2020) y Koul et al. (2008), esta variabilidad en compuestos ingeridos suele estar ligada a la tasa de detoxificación en el tracto digestivo, donde enzimas como las carboxilesterasas y citocromos, que son altamente expresadas en el intestino

medio de *D. melanogaster*, pueden inactivar rápidamente monoterpenos como el timol antes de que alcancen la circulación sistémica y sus dianas mitocondriales.

La inhibición de las oxidasas NADH y succinato confirma que el efecto insecticida de los metabolitos evaluados trasciende el nivel sistemático, manifestándose mediante un mecanismo de acción celular y mecánico directamente en la mitocondria. En el caso de la NADH oxidasa, la xantona demostró la mayor eficacia inhibitoria, lo cual es consistente con investigaciones que sugieren que la xantona pueden inducir el colapso del potencial de membrana mitocondrial, bloqueando eficazmente el flujo de electrones (Martínez et al., 2020). Por otra parte, el carvacrol exhibió un perfil de inhibición más pronunciado sobre la succinato oxidasa, comportamiento que se atribuye a la capacidad de los monoterpenos fenólicos para desestabilizar la bicapa lipídica mitocondrial, alterando así el entorno funcional de las proteínas integrales como el Complejo II (Pavela & Benelli, 2016). En conjunto, la correlación positiva entre la inhibición enzimática y la mortalidad *in vivo* refuerza la hipótesis de que el compromiso de la bioenergética y la consecuente caída en la producción de ATP constituyen el evento primario que conduce a la detención del desarrollo y la posterior muerte de *D. melanogaster* (Perić-Mataruga et al., 2018).

3.2. Conclusiones globales

Se identificaron los metabolitos naturales xantona, carvarol y timol como compuestos con alta afinidad hacia los complejos de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. La validación estructural y los parámetros ADME confirmaron que estas moléculas poseen las características fisicoquímicas adecuadas para actuar como ligandos en dianas bioenergéticas.

Se determinó que los metabolitos seleccionados afectan negativamente el desarrollo post-embriionario de *Drosophila melanogaster*. La xantona se consolidó como el compuesto con mayor actividad insecticida a bajas concentraciones, mientras que el carvacrol y el timol mostraron una eficacia dependiente de la dosis, validando el modelo de *D. melanogaster* para el tamizaje de toxicidad de productos naturales.

Se comprobó que los metabolitos evaluados reducen significativamente el consumo de oxígeno mediante la inhibición de las enzimas NADH oxidasa y succinato oxidasa. La xantona presentó la mayor potencia inhibitoria en la bioenergética mitocondrial del estadio adulto, estableciendo un vínculo directo entre la disrupción del flujo electrónico mitocondrial y el efecto insecticida observado.

3.3. Recomendaciones

Los resultados obtenidos en este estudio permiten proponer diversas líneas de investigación futura que fortalezcan el desarrollo de metabolitos secundarios como alternativas insecticidas. En primer lugar, se recomienda realizar ensayos de campo con xantona, carvacrol y timol, con el fin de validar la eficacia observada en condiciones de laboratorio bajo escenarios ambientales más complejos. Estos estudios deberían incluir evaluaciones de estabilidad, persistencia y eficacia frente a diferentes especies de insectos de importancia sanitaria y agrícola.

Asimismo, es necesario profundizar en estudios toxicológicos y eco toxicológicos que permitan establecer los perfiles de seguridad de estos metabolitos en organismos no objetivo, tales como polinizadores, animales domésticos y seres humanos. Este aspecto

resulta fundamental para garantizar la viabilidad del uso de metabolitos naturales en programas de manejo integrado de plagas y en el desarrollo de formulaciones comerciales.

Finalmente, se sugiere la exploración de formulaciones que mejoren la estabilidad y biodisponibilidad de la xantona, dado que este metabolito demostró ser el más activo en las fases *in vivo* e *in vitro*. En este sentido, la combinación podría potenciar su eficacia y reducir la cantidad de compuesto requerido para generar un efecto insecticida.

3.4. Divulgación de resultados

Los resultados correspondientes a la fase *in silico* del proyecto 31612 “IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIMIASIS EMPLEANDO *Drosophila melanogaster* COMO MODELO BIOLÓGICO Y LA MITOCONDRIA COMO DIANA FARMACOLÓGICA”, fueron presentados en modalidad póster en el V Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular (C2B2) 2023, bajo el título “IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON POSIBLES PROPIEDADES ANTIMIASIS EMPLEANDO MITOCONDRIAS EXTRAIDAS DE *Drosophila melanogaster* COMO MODELO EXPERIMENTAL Y FARMACOLÓGICO” (Apéndice B).

Posteriormente, los resultados globales del proyecto fueron presentados en modalidad presentación oral extendida en el VI Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular (C2B2) 2025, con el título “IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIMIASIS EMPLEANDO *Drosophila melanogaster* COMO MODELO BIOLÓGICO Y LA MITOCONDRIA COMO DIANA FARMACOLÓGICA” (Apéndice C).

Referencias bibliográficas

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Affourtit, C., Krab, K., & Moore, A. L. (2001). Control of plant mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1504(1), 58–69. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00244-7)
- Ahmad, S., Khan, R. A., & Javed, S. (2019). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction: the key players in the insecticidal action of plant-derived compounds. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 157, 138–145.
- Aina, D. A., Olabisi, F. O., & Jimoh, T. O. (2020). *In silico* pharmacokinetics and molecular docking studies of lead compounds derived from *Diospyros mespiliformis*. *PharmaTutor*, 8(7), 14–23. <https://www.pharmatutor.org/articles/in-silico-pharmacokinetics-and-molecular-docking-studies-of-lead-compounds-derived-from-diospyros-mespiliformis>
- Ajiboye, B. O., Eze, A. A., & Afolabi, M. O. (2023). A molecular docking approach to evaluate the pharmacological properties of natural and synthetic treatment candidates for use against hypertension. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(6), 923. <https://doi.org/10.3390/ijerph16060923>
- Almeida, L. F., Paula, J. T., Silva, M. G., & Figueiredo, R. C. (2019). Mitochondrial dysfunction in insects: potential targets for insecticide development. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 159, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.007>

- Alonso, H., Bliznyuk, A. A., & Gready, J. E. (2006). Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal Research Reviews*, 26(5), 531–568. <https://doi.org/10.1002/med.20067>
- Angarita Vergara, D. Z. (2023). Actividad insecticida de metabolitos de plantas medicinales que influyen en la bioenergética mitocondrial y la acetilcolinesterasa en larvas de mosquitos *Aedes aegypti* [Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander]. Repositorio Institucional Universidad Industrial de Santander.
- Arregui, M. C., Oliva, A., Gigli, D., & Lajmanovich, R. (2008). Efectos de insecticidas sobre organismos acuáticos: Aspectos fisiológicos y bioquímicos. *Interciencia*, 33(10), 738–745.
- Balaska, S. (2024). Investigation of the molecular mechanisms underlying insecticide resistance in insects of medical importance. <https://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/58013>
- Balaska, S. (2024). Propoxur and its applications in public health entomology: An updated review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 197, 105525. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105525>
- Balaska, S. (2024). Propoxur as a reference insecticide in bioassays: standardization and validation of toxicological studies. *Journal of Vector Ecology*, 49(1), 45–53. <https://doi.org/10.1002/jvec.22045>
- Becker, W. F., von Jagow, G., Anke, T., & Steglich, W. (1981). An inhibitor of mitochondrial respiration which binds to cytochrome b and displaces quinone from the iron-sulfur protein of the cytochrome bc₁ complex. *European Journal of Biochemistry*, 116(3), 235–242. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06121.x>

- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... Bourne, P. E. (2000). *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Birrell, J. A., Hirst, J., & Roessler, M. M. (2021). Investigating structure, function and mechanism of respiratory complex I by spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1862(7), 148446. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2021.148446>
- Bohbot, J. D., & Pitts, R. J. (2015). The narrowing olfactory landscape of insect odorant receptors. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3, 39. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00039>
- Bork, P., et al. (2023). Computational approaches to protein structure, dynamics, and function in the age of AI. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24, 653–672. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00578-5>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandt, U (2006). Energy converting NADH: quinone oxidoreductase (complex I). *Annual Review of Biochemistry*, 75, 69-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142536>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Caboni, P., & Ntalli, N. (2014). Natural products from plants as eco-friendly insecticides. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 4, 120–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00068-3>

- Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (2019). Post-translational modifications near the quinone binding site of mammalian complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 294(22), 8447–8456. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008077>
- Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Figueiredo, M. S., Folador, P., Damázio, R. G., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2008). Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(13), 1429–1440. <https://doi.org/10.2174/138955708786369564>
- Cestari, T. F., Martignago, B. F., & Meneghello, L. P. (2007). Myiasis: Clinicopathological study of 177 cases. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 82(2), 123–128. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962007000200004>
- Chaaban, A., de Souza, L. A., & Estevam, E. B. (2017). Essential oils for myiasis control: Potentialities for ecofriendly insecticides. *International Journal of Current Research*, 9(12), 62460–62467.
- Chambers, M. G., Yan, J., Parmar, V. D., Sazanov, L. A., & Capaldi, R. A. (2009). Mutational analysis of cytochrome b at the ubiquinol oxidation site of yeast complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20804–20812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.010439>
- Crofts, A. R. (2004). The cytochrome bc₁ complex: Function in the context of structure. *Annual Review of Physiology*, 66, 689–733. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251>
- DeLano, W. L. (2002). The PyMOL molecular graphics system (versión 2.0). *Schrödinger LLC*.
- Dik, B., Uslu, U., & Ipek, D. N. (2012). Myiasis in animals and human beings in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(1), 37–42. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.5043>

- Duque, J. E., Rivera, M. J., & Suárez, J. M. (2023b). Inhibition of mitochondrial enzymes by natural products: Insecticidal effects in *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 189, 105393. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105393>
- Duque, J. E., Vásquez-Arteaga, L. R., & García, L. P. (2023a). Secondary plant metabolites: A sustainable alternative for insecticide design. *Plants*, 12(2), 459. <https://doi.org/10.3390/plants12020459>
- Echave, J., Spielman, S. J., & Wilke, C. O. (2016). Causes of evolutionary rate variation among protein sites. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 109-121. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.18>
- Echave, J., Spielman, S. J., & Wilke, C. O. (2021). Relationship between protein thermodynamic constraints and evolutionary rates. *Annual Review of Biophysics*, 50, 59-79. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-101920-093447>
- Echave, J., Spielman, S. J., & Wilke, C. O. (2021). Molecular function limits divergent protein evolution on planetary timescales. *eLife*, 10, e39705. <https://doi.org/10.7554/eLife.39705>
- Efremov, R. G., Baradaran, R., & Sazanov, L. A. (2010). The architecture of the respiratory complex I. *Nature*, 465, 441-445. <https://doi.org/10.1038/nature09066>
- Fernández-Moreno, M. A., Farr, C. L., Kaguni, L. S., & Garesse, R. (2007). *Drosophila melanogaster* as a model system to study mitochondrial biology. *Methods in Molecular Biology*, 372, 33-49. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_3
- Finney, D. J. (1971). *Probit analysis* (3rd ed.). Cambridge University Press.
- Francesconia, F., & Lupi, O. (2012). Myiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 79-105. <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-11>

- Freisner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., & Mainz, D. T. (2004). Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- 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
- Gnaiger, E. (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: New perspectives of mitochondrial physiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(10), 1837–1845. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.013>
- González, J. L., García, M., & Martínez, S. (2008). Piretroides: Toxicología, metabolismo y riesgos para la salud. *Revista Cubana de Salud Pública*, 34(4), 1–12.
- González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., & Reynoso-Camacho, R. (2021). Phenolic compounds as mitochondrial modulators: implications for insect bioenergetics. *Phytochemistry Reviews*, 20(3), 721–740.
- Guo, S., & Smith, D. P. (2017). Odorant receptor signaling in *Drosophila melanogaster*. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 142, 93–125. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.05.004>
- Halgren, T. A. (2009). Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(2), 377–389. <https://doi.org/10.1021/ci800324m>
- 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.

- Hirst, J. (2013). Mitochondrial complex I. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 551–575.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-070511-103700>
- Isman, M. B. (2020). Botanical insecticides in the twenty-first century—Fulfilling their promise. *Annual Review of Entomology*, 65, 233–249. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025010>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kadenbach, B., Ramzan, R., Vogt, S., & Hüttemann, M. (2012). Regulation of mitochondrial respiration by cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, 12(1), 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.09.003>
- Kadenbach, B., & Hüttemann, M. (2015). The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, 24, 64–76.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.07.002>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., ... Bolton, E. E. (2023). PubChem in 2023: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1373–D1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1030>
- Koul, O., Walia, S., & Dhaliwal, G. S. (2008). Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopesticides International*, 4(1), 63–84.
- Kumar, A., Pandey, A., & Singh, S. S. (2013). Mutagenic effects of gold nanoparticles induce aberrant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9(5), 856–864. <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1570>

- Liebman, M. N. (1978). Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome bc₁ segment of the respiratory chain. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA)-Bioenergetics*, 501(3), 405-415. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(78\)90156-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(78)90156-1)
- Leal, W. S. (2013). Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58, 373-391. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>
- Lee, S. H., Kang, J. S., Min, J. S., Yoon, K. S., Strycharz, J. P., Johnson, R., Mittapalli, O., Margam, V. M., Sun, W., Li, H. M., Xie, J., Wu, J., Kirkness, E. F., Berenbaum, M. R., Pittendrigh, B. R., & Clark, J. M. (2016). Mitochondrial genome and insecticide mode of action research: a review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 127, 38-48. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.07.002>
- Leite, N. R., Krogh, R., Xu, W., Ishida, Y., Struchiner, C. J., Ho, P. L., ... & Leal, W. S. (2009). Structure of an odorant-binding protein from the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23), 9835-9840. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900610106>
- Li, Y., Park, J. S., Deng, J. H., & Bai, Y. (2006). Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 38(5-6), 283-291. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9052-6>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3-26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)

- López-Muñoz, R., Escudero-Lourdes, C., & Ramírez-Romero, R. (2021). Phenolic compounds as insecticidal agents: mechanisms of action and potential applications. *Phytochemistry Reviews*, 20(6), 1371–1392. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09778-y>
- Lümmen, P. (1998). Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1364(2), 287–296. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00029-6)
- Lümmen, P. (2007). Mitochondrial electron transport complex as biochemical target for insecticides and acaricides. *Invertebrate Neuroscience*, 7(3), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10158-007-0049-0>
- Madeira, F., Toloza, É. M. O., Ferreira, C., Madeira, S. C., & Rocha, I. (2022). Clustal Omega and alternatives: an overview. *Briefings in Bioinformatics*, 23(6), bbac488. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac488>
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., ... & Nabavi, S. M. (2018). Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol: a comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 66–75.
- Martín, Y. C. (2009). A bioavailability score. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(9), 3164–3170. <https://doi.org/10.1021/jm0492002>
- Martínez, C., Gómez, D., & Pérez, J. (2020). Role of polyphenols in insect oxidative stress modulation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 166, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104567>
- Martínez-Cantón, M., et al. (2025). Mitochondrial genome of *Bactrocera* fruit flies (Tephritidae: Dacini): Evolutionary conservation and divergence. *BMC Genomics*, 26, 872. <https://doi.org/10.1186/s12864-025-11872-8>

- Matthews, B. J., et al. (2015). Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. *Nature*, *563*(7732), 501–507. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0692-z>
- Mayer-Friedrich, A., et al. (2023). Mitochondrial complexome reveals quality-control pathways of protein import. *Nature Communications*, *14*(1), 765. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36697-4>
- McGraw, T. A., & Turiansky, G. W. (2008). Cutaneous myiasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *58*(6), 907–926. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.12.028>
- Mi, H., Yu, L., & Yu, C. A. (1981). Interaction of myxothiazol with cytochrome b of the mitochondrial bc₁ complex. *Biochemistry*, *20*(23), 6736–6740. <https://doi.org/10.1021/bi00527a032>
- Moraes, R. C., & Montagne, J. (2021). *Drosophila melanogaster* as a model organism in experimental toxicology. *Toxicology Reports*, *8*, 169–183. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.12.007>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Murai, M., & Miyoshi, H. (2016). Structural determinants of rotenone binding in mitochondrial complex I. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1857*, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.003>
- Murai, M., Ishii, N., & Kanno, S. I. (2021). Rotenone-induced neurotoxicity is mediated by reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction in human dopaminergic

- SH-SY5Y cells. *Journal of Toxicological Sciences*, 46(1), 1–10.
<https://doi.org/10.2131/jts.46.1>
- Myiasis, M., & Ramana, K. V. (2012). Human myiasis – A review. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 5(2), 150–155. <https://doi.org/10.4103/1755-6783.98622>
- Natarajan, A., Sugumar, S., Bitragunta, S., & Balasubramanian, 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.
- Natarajan, A., Yardimci, G. G., & Schmidt-Dannert, C. (2015). Integrated approach for in silico drug screening and in vitro bioactivity assays. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(3), 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2015.07.003>
- Ong et al., 2015. Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), 396–403.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2014.940405>
- Owino, J., Wamakima, H., & Were, H. (2022). Molecular docking, simulation and binding free energy analysis of small molecules as PfHT1 inhibitors. *BioMed Research International*, 2022, Article ID 2413961. <https://doi.org/10.1155/2022/2413961>
- Palmieri, F., Monné, M., & Fiermonte, G. (2020). *Drosophila melanogaster* mitochondrial carriers: Similarities and differences with the human carriers. *Cells*, 9(9), 1968.
<https://doi.org/10.3390/cells9091968>
- Paradise, D. A., Buschlen, S., Daum, B., Neupert, W., & Stuart, R. A. (2010). Loss of a conserved tyrosine residue of cytochrome b induces reactive oxygen species production by cytochrome bc1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 23442–23451.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126045>

- Pavela, R. (2016). History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects – a review. *Plant Protection Science*, 52(4), 229–241. <https://doi.org/10.17221/31/2016-PPS>
- Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
- Pavela, R., & Maggi, F. (2017). Essential oils as ecofriendly biopesticides. Challenges and constraints. *Trends in Plant Science*, 22(12), 1000–1002.
- Pedroso, D., Ribeiro, A., & Brandão, H. (2023). Oxidative stress and larvicidal effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(3), 5871–5882. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23295-4>
- Pereira, C. V., Fite, A., & Tomás, C. (2021). Complex II inhibitors in mitochondrial dysfunction and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 162, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.006>
- Pereira, S. I., Gonçalves, A. M., & Ferreira, M. J. (2020). Xanthones as insecticidal agents: recent advances and perspectives. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 168, 104642. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104642>
- Pérez Rojas, M. F. (2022). Actividad larvicida de metabolitos de plantas que afectan la bioenergética mitocondrial de mosquitos *Aedes aegypti* [Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander]. Repositorio Institucional Universidad Industrial de Santander.
- Perić-Mataruga, V., Vlahović, M., Prolić, Z., & Nenadović, V. (2018). Mitochondrial bioenergetics as a target of insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 148, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.007>

- 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.
- Pietro, R. C. L. R., Silva, V. B., Silva, T. G., Amaral, J. L., Tavares, J. F., & Barbosa-Filho, J. M. (2016). Molecular docking and ADME/Tox screening of alkaloids from Annonaceae as potential anticancer agents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(5), 657–665. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.04.010>
- Ponce, M., Alzogaray, R. A., & Zerba, E. (2006). Toxicidad de insecticidas neurotóxicos en insectos: Mecanismos de acción. *Revista de Toxicología*, 23(1), 15–23.
- Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29(9), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>
- Rich, P. R. (2017). Mitochondrial cytochrome c oxidase: Catalysis, coupling and controversies. *Biochemical Society Transactions*, 45(2), 813–829. <https://doi.org/10.1042/BST20160135>
- Robbins, K., & Khachemoune, A. (2010). Cutaneous myiasis: A review of the common types of myiasis. *International Journal of Dermatology*, 49(10), 1092–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04577.x>
- Rocha, J. J. (2013). *Drosophila melanogaster*: A model system for the study of mitochondrial function. *Genetics and Molecular Biology*, 36(1), 35–45. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000100006>
- Sanz, J., Morales, P., & Martínez-Peinado, P. (2022). Targeting mitochondrial respiration with natural products: a promising insecticidal strategy. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 183, 105064.

- Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
- Scholl, P. J., Colwell, D. D., & Cepeda-Palacios, R. (2019). Myiasis (Muscoïd fly larvae). In D. Colwell, M. J. Hall, & P. J. Scholl (Eds.), *Veterinary Entomology* (2nd ed., pp. 312–344). Wiley-Blackwell.
- Schrödinger, LLC. (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0*. <https://pymol.org/>
- Schrödinger, LLC. (2021). *Schrödinger Release 2021-4: Glide, Maestro, LigPrep, QikProp*. New York, NY. <https://www.schrodinger.com/>
- Schrödinger, LLC. (2025). *SiteMap* (Version 2025-3) [Computer Software]. Schrödinger. <https://www.schrodinger.com/sitemap>
- Schrödinger, LLC. (2025). *LigPrep* (Version 2025-3) [Computer Software]. Schrödinger. <https://www.schrodinger.com/ligprep>
- Schrödinger, LLC. (2025). *Prime* (Version 2025-3) [Computer Software]. Schrödinger. <https://www.schrodinger.com/prime>
- Schrödinger, LLC. (2025). *Protein Preparation Wizard* (PrepWiz) in Maestro (Version 2025-3) [Computer Software]. Schrödinger. <https://www.schrodinger.com/protein-preparation-wizard>
- Schrödinger, LLC. (2025). *QikProp module in Maestro, Schrödinger Suite 2025-3* [Software]. Schrödinger. <https://www.schrodinger.com/platform/products/qikprop/>

- Shalaby, H. A., El Namaky, A. H., & Kamel, A. A. (2016). Efficacy of some essential oils on *Lucilia sericata* larvae. *Parasitology Research*, 115(4), 1463–1472. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4874-3>
- Sharma, V., Belevich, I., Gamiz-Hernandez, A. P., et al. (2019). Redox-induced activation of the pump in the respiratory complex IV. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(22), 10993–10998. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817331116>
- Sidhu, A. K., Joshi, R., & Mehta, S. K. (2019). Insecticide resistance in blowflies and its management. *Veterinary Parasitology*, 266, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.007>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science*, 27(1), 135–145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>
- Singer, T. P. (1974). Determination of the activity of respiratory enzymes. In *Methods in Biochemical Analysis* (Vol. 22, pp. 123–175). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch4>
- Singer, T. P. (1974). Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and α -glycerophosphate dehydrogenases. *Methods of Biochemical Analysis*, 22, 123–175. <https://doi.org/10.1002/9780470110426.ch3>
- SiteMap. (2015). *SiteMap User Manual*. Schrödinger, LLC. <https://www.schrodinger.com/SiteMap>
- Sousa, J. S., Mills, D. J., Vonck, J., & Kühlbrandt, W. (2018). Functional asymmetry and electron flow in the bovine respirasome. *eLife*, 5, e21290. <https://doi.org/10.7554/eLife.21290>

- Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- StatSoft Inc. (2011). Statistica (*data analysis software system*), version 10. Tulsa, OK: StatSoft Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.020>
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory complex II. *Cell*, 121(7), 1043-1057.
- The UniProt Consortium. (2023). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Žídek, A., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, 596(7873), 590–596. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>
- Varadi, M., et al. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Xu, J., et al. (2024). Advances in mitochondrial protein structure prediction and implications for disease and therapeutics. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 11, 1401123. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1401123>
- Yang, D., Liu, Z., Zhang, L., Wang, C., Zhang, Y., Li, L., & Wang, J. (2023). Bioactivities of thymol and p-cymene from the essential oil of *Adenosma buchneroides* against three

- stored-product insects. *Industrial Crops and Products*, 202, 117084.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117084>
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., & Iwata, S. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299(5607), 700–704.
<https://doi.org/10.1126/science.1079605>
- Younes, M. W. F., Abou-Taleb, H. K., Mohamed, M. I. E., & Abdel Rahman, S. M. (2021). Insecticidal, biochemical and histological effects of monoterpenes against *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Scientific Reports*, 11(1), 16754.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-95994-2>
- Zhao, Y., Liu, W., Liu, X., Zhang, X., Wang, Z., Yu, Y., ... & Xu, C. (2023). Systematic stereoselectivity evaluations of tetramethrin enantiomers: Stereoselective cytotoxicity, metabolism, and environmental fate. *Environmental Science & Technology*, 57(2), 555–566. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c06369>

Apéndices

Apéndice A.

Base de datos de compuestos reportados con actividad insecticida

PubChem ID	Nombre del compuesto	Masa molecular (g/mol)
440966	(-)-Camphene	136,23
170833	(-)-Isopulegol	154,25
73067	(+)-Medicarpin	270,28
10887971	(+)-Sabinene	136,23
5284507	(E) nerolidol	222,37
12044484	(E),(E)-Farnesol	312,5
637563	(E)-Anethole	148,2
14601153	(E)-isocroceacin	192,21
11141599	(E)-Piperolein A	315,41
5281758	(Z)-Asarone	208,25
5315892	1,10-di-epi-Cubenol	222,37
40326	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	734,1
176983	1,3,8- p- mentatrieno	134,22
2758	1,8-Cineol	154,25
520687	16-Kaurene	272,5
5991	17-alpha-Ethinylestradiol	296,4
2758	1-8 cineole (Eucalyptol)	154,25
10022321	1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene	375,2

53167	1-Monostearin	358,6
71402779	2,2-Dimethyl-6- vinylchroman	202,25
5280343	2-Arachidonoylglycerol	378,5
12741	2-Decanona	156,26
87839	2-Ethylhexyl salicylate	280,4
6755	2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone	174,15
16871	2-Methoxy-1,4- naphthoquinone	188,18
13187	2-Nonanona	142,24
14104353	2-Senecioid-4- vinylphe-nol	202,25
8163	2-Undecanona	170,29
80922	3,4,5- Trimethoxytoluene	182,22
1615	3,4,5'-trimetóxi-3',4'- metilenodióxi- 7-9:7'9 diepoxilignan	193,24
8557	3,4,5-trimethoxybenzaldehyde	196,2
8468	3,4-dimethoxybenzaldehyde	166,17
77844	3,5- dimethoxytoluene	152,19
375117	3-Epimacronine	329,35
617233	aliltetrametoxibenceno	238,28
5368821	Alloocimene	136,23
10931629	alpha,beta-thujone	152,23
1549026	alpha-Bisabolol	222,37
442359	alpha-Cubebene	204,35
92762	alpha-Eudesmol	222,37
10931629	alpha-Thujone	152,23
137566	Antimycin A	548,6
10659	Apiol	222,24

10467	Arachidic acid	312,53
91354	Aromadendrene	204,35
558221	AR-tumerone	216,32
11869417	Asaricina	354,4
10545	Ascaridole	168,23
442638	Atractyloside	726,7
261491	Atranorin	374,3
3352	Azide	65,01
62566	B-bourbonene	204,35
8215	Behenic acid	340,58
2314	Bendiocarp	223,22
10104370	beta-Bisabolene	204,35
442353	beta-Chamigrene	204,35
93081	beta-Cubebene	204,35
31253	Beta-myrcene	136,23
14896	Beta-Pinene	136,23
64971	Betulinic acid	456,7
91457	b-eudesmol	222,37
13894537	Bicyclogermacrene	204,35
5281045	Bongkreki Acid	486,6
64685	Borneol	154,25
12097317	Borneol acetate	196,29
160006	Bruceine A	522,54
100199	Burchellin	340,37
5352899	Butylidenephthalide	188,22
28481	Calarene	204,35

2537	Camphor (alcanfor)	152,23
11972305	Cappariloside B	496,46
281	Carbon Monoxide	28,01
21307	Carboxin	253,30
26049	Careno	136,24
442347	Carotol	222,37
10364	Carvacrol	150,22
7439	Carvona	150,22
6432475	Carvotanacetone	152,23
1742210	Caryophyllene oxide	220,35
65575	Cedrol	222,37
1549026	Chavicol	134,18
5280666	Chrysoeriol	300,26
637511	Cinnamaldehyde	132,16
643779	Citronellol	156,26
3036	Clofenotane	354,49
19725	Copaene	204,35
597	Cyanide	26018
99856	Cyperene	204,35
162747	Damnacanthol	284,26
14458886	Deacetylsalannin	554,7
441005	delta-Cadinene	204,35
12309449	delta-Elemene	204,35
345501	Desoxypodophyllotoxin	398,41
16590	Diallyl disulfide	146,27
16315	Diallyl trisulfide	178,34

10231	Dilapiol	222,24
1493	Dinitrophenol	184,11
8205	Dodecyl acetate	228,37
636822	E)-Asarone	208,25
637563	E-anethol	148,2
479931	Elatol	333,69
5284507	E-nerolidol	222,37
8815	Estragole	148,2
3314	Eugenol	164,2
3346	Fenthion	278,33
5280378	Formononetin	268,26
9651	Galantamine	287,35
637511	Geraniol	154,25
1549026	Geranyl acetate	196,29
96943	Girinimbine	263,33
13942832	Glochidone	422,69
45267103	Gramicidin A	1882,3
227829	Guaiol	222,37
6442405	Guineensine	383,52
17525	Hexyl butyrate	172,26
100633	Karanjin	292,29
97487	Koenimbine	293,36
10978265	Lanceolatin B	262,26
94266	Lauric acid	200,32
22311	Limonene	136,23
6549	Linalool	154,25

638011	Linalyl acetate	196,29
16666	L-menthol	156,26
439247	L-menthone	154,25
167963	Mahanimbine	331,45
27867	Menthyl acetate	198,3
4091	Metformin	129,16
7150	Methyl benzoate	136,15
637520	Methyl cinnamate	162,19
31253	Mirceno	136,23
4276	Miristicina	192,21
8083	Morpholine	87,12
5460593	Mucidina (Stigmatellin A)	514,6
92998	Myristic acid	228,37
104279	Myxothiazol	487,6
8222	n-Eicosane	282,55
643779	Neral	152,23
637563	Nerol	154,25
108058	Nimbin	540,6
8193	N-methylpiperazine	100,16
12592	n-Tetracosane	338,65
445639	Oleic acid	282,46
5281873	Oligomycin A	791
11851219	Pacharin	270,28
91456	Palmitic acid	256,4
10955174	Patchouli alcohol	222,37
7463	p-cimeno	134,22

7731	p-cresol metil éter	122,16
5318516	Pellitorine	223,35
16441	Perillaldehyde	150,22
61126	Phthalic acid	166,13
25244302	Piericidin A	415,6
6427105	Pinocamphone	152,23
121719	Pinocarvone	150,22
11203891	Pipbinine	570,7
5320618	Piperanine	287,35
5372162	Pipercide	355,7
638024	Piperine	285,34
9974595	Pipernonaline	341,4
8438	Piperonal (piperona)	150,13
10970518	Pipzorine	363,62
443014	Podophyllotoxone	412,39
4944	Propoxur	209,24
442495	Pulegone	152,23
11012859	Retrofractamide A	327,4
131751424	Retrofractamide D	341,4
6758	Rotenone	394,4
442497	Rotundifolona	166,22
5281555	Rutamycin	777
18818	Sabinene	136,23
10104370	Safrole	162,18
519872	Santolina triene	136,23
6440616	Sarniensine	221,34

72307	Sesamin	354,35
68229	Seselin	228,24
341779	Sesquicineole	222,37
442495	Solanesol	631,1
92231	Spathulenol	220,35
5353001	Spilanthol	221,34
441612	Squamocin	622,92
91354	Stearic acid	284,5
5460593	Stigmatellin A (MucidinaCl)	514,6
12304570	Sylvestrene	136,23
11230	Terpinen-4-ol	154,25
17100	Terpineol	154,25
11463	Terpinolene	136,23
94896	tert-butyl dodecadienamide	255,44
83975	Tetramethrin	331,40
5601	Thenoyl trifluoroacetone	222,19
6989	Thymol	150,22
23634636	Triterpeno	516,799
445070	Ubiquinone-1	250,33
8163	Undecan-2-one	170,29
5943	Valinomycin	1111,3
5281605	Venturicidin A	750
61126	Verbenol	152,23
2912	Verbenone	150,22
24772948	Violanone	316,31
7020	Xantona	196,2

6654	α -Pinenos	136,23
7462	α -terpineno	136,23
17868	α -Tujeno	136,23
27208	β -Bisabolol	222,37
62566	β -Bourboneno	204,35
31253	β -mirceno	136,23
5281553	β -ocimene	136,24
14896	β -Pinenos	136,23
222284	β -Sitosterol	414,71
7461	γ -terpineno	136,23
442461	δ -3-Carene	136,24

Apéndice B.

Certificado de participación en el V Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular (C2B2) 2023.



Apéndice C.

Certificado de asistencia y participación en el VI Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular (C2B2) 2025.



