

Evaluación de la actividad repelente de terpenos contra la picadura de hembras de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae): un estudio de enfoque con simulaciones in sílico de la proteína odorante 3K1E

Johan Sebastián Portilla Pulido

Trabajo de Grado para optar por el título de Químico

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez
Doctora en Ciencias Bioquímicas

Codirectores

Jonny Edward Duque Luna
Doctor en Ciencias Biológicas énfasis en Entomología Médica
Ruth Mariela Castillo Morales
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2018

Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente a mi familia, en especial a mi madre por su apoyo en los momentos más difíciles durante todo mi trayecto estudiantil y de vida. A mi amiga más cercana, Carolina, por su invaluable amistad y consejos que me fortalecieron en estos últimos años. Finalmente, quiero dedicar este trabajo a Aldair, aquella persona especial que me motivó a estudiar Química, y que gracias a ello, soy la persona que soy ahora.

Johan Sebastián Portilla Pulido

“A hombros de gigantes”

Agradecimientos

En primer lugar, doy gracias a Dios por darme la fuerza y valentía para terminar esta etapa de mi vida.

Agradezco a mi madre por brindarme la confianza, apoyo y demostrarme su aprecio durante toda mi carrera profesional.

A los doctores Jonny Duque y Carolina Méndez, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, quiero agradecer su invaluable apoyo durante mi investigación y carrera profesional.

A Ruth Castillo, por su paciencia, dedicación y consejos durante la realización de mi proyecto de grado y brindarme su amplio conocimiento en biología, entomología y redacción. Agradezco infinitamente el acompañamiento diario.

A los compañeros del laboratorio 110 (Entomología Médica) y 402 (Bioquímica Celular) de Guatiguará por su apoyo en los experimentos y agradables momentos hasta culminar mi trabajo de grado.

A mis amigos más cercanos, Carolina, Nathalia, Alejandra, Andrea, Camilo y Sonia, quienes me apoyaron en mi crecimiento personal durante toda mi carrera profesional y han sido amigos incondicionales conmigo a pesar de las dificultades.

A los voluntarios de los experimentos de repelencia agradezco el tiempo dedicado en cada prueba, sin ellos este proyecto no se hubiese podido realizar.

Los autores desean agradecer al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS) por el financiamiento del proyecto (Diseño de un insecticida para *Aedes aegypti* a partir de la alteración mitocondrial inducida por metabolitos secundarios de plantas medicinales, Proyecto número: 110271250633).

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	17
1. Objetivos	20
1.1. Objetivo general.....	20
1.2. Objetivos específicos	20
2. Marco teórico	21
2.1. <i>Aedes aegypti</i>	21
2.2. Enfermedades transmitidas por <i>Aedes aegypti</i>	23
2.3. Sustancias sintéticas repelentes.....	24
2.4. Aceites esenciales como repelentes	25
2.5. Terpenos y biosíntesis de terpenos.....	26
2.6. Proteína odorante AaegOBP1	31
2.7. Docking molecular.....	33
2.8. Pruebas de repelencia <i>in vivo</i>	35
2.9. Pruebas de citotoxicidad en células	38
2.10. Aspectos éticos.....	39
3. Materiales y métodos	40
3.1. Selección y evaluación de metabolitos secundarios	40
3.2. Análisis <i>in silico</i> : Docking molecular y análisis de toxicidad	41
3.3. Material biológico	43
3.4. Bioensayos de actividad repelente <i>in vivo</i>	43
3.5. Pruebas de citotoxicidad	45
3.6. Análisis estadístico.....	46
4. Resultados	47

4.1. Análisis <i>in silico</i> : Docking molecular y análisis de toxicidad.....	47
4.2. Bioensayos de actividad repelente <i>in vivo</i>	50
4.2.2. Pruebas de perdurabilidad.....	57
4.3. Pruebas de citotoxicidad	58
5. Discusión.....	59
5.1. Análisis <i>in silico</i> : Docking molecular y análisis de citotoxicidad	59
5.2. Bioensayos de actividad repelente	62
5.3. Pruebas de citotoxicidad	65
6. Conclusiones	66
Referencias bibliográficas.....	68

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Valores de energía libre de interacción ΔG (kcal/mol) y número de puentes de hidrogeno de los metabolitos secundarios y las sustancias repelentes DEET e IR3535 con la proteína odorante 3K1E.....	48
Tabla 2. Valores de los parámetros de Lipinski para los metabolitos secundarios nerolidol, α -bisabolol, acetato de geranilo, nerol, y las sustancias repelentes DEET e IR3535. Perfiles de riesgo: 1. Mutagénico 2. Tumorigénico 3. Reproductivo.....	50
Tabla 3. Porcentaje de protección ($\% \pm SD$) de los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol, nerol y α -bisabolol en concentración 0,1%, 10% y 25% (v/v) durante los periodos de prueba 0-2 min, 2-15 min, 15-60 min. Control positivo DEET (25% v/v).....	53
Tabla 4. Composición de las mezclas propuestas	55
Tabla 5. Porcentaje de protección ($\% \pm SD$) de las mezclas de los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol, nerol y α -bisabolol en concentración 5% y 10% (v/v) durante los periodos de prueba 0-2 min, 2-15 min, 15-60 min. Mezcla uno: Nerolidol, acetato de geranilo y α -bisabolol; mezcla dos: Acetato de geranilo y nerolidol; mezcla tres: Nerolidol y α -bisabolol y mezcla cuatro: Acetato de geranilo y α -bisabolol. Control positivo DEET (25% v/v).....	57
Tabla 6. Pruebas de perdurabilidad en piel de los formulados 1 y 2.....	58

Tabla 7. CL₅₀ de los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol y α -bisabolol en la línea

celular *Vero*.....59

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Mecanismo de recepción de odorantes. Adaptado de Guo & Smith, 2017; W. S. Leal, 2013.....	19
Figura 2. Ciclo de vida del mosquito <i>Aedes aegypti</i> (CDC, 2012).....	23
Figura 3. Estructura molecular del DEET (izquierda) e IR3535 (derecha) sustancias repelentes de productos comerciales.....	25
Figura 4. Unidad de Isopreno.....	27
Figura 5. Paso 1 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002	28
Figura 6. Paso 2 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.....	28
Figura 7. Paso 3 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.....	29
Figura 8. Paso 4 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.....	29
Figura 9. Paso 5 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.....	29
Figura 10. Paso 6 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.....	30
Figura 11. Unión de unidades de Isopreno. Adaptado de Maimone, 2002.....	30

Figura 12. Moléculas precursoras de terpenos y lípidos de membrana. Adaptado de Maimone, 2002.....	31
Figura 13. Estructura tridimensional de la proteína AegOBP1 (3K1E). Protein Data Bank (PDB).....	32
Figura 14. Representación sistemática del protocolo para la búsqueda de sustancias con actividad biológica e interés medicinal. Adaptado de Alonso, Bliznyuk, & Gready, 2006.....	35
Figura 15. Metodología “arm in cage” OMS. (D. Barnard, Bernier, Xue, & Debboun, 2006).....	36
Figura 16. Dispositivos para pruebas <i>in vivo</i> , <i>The American Society for Testing and Materials Method</i> (D. Barnard <i>et al.</i> , 2006).....	37
Figura 17. Reducción de la sal MTT en cristales de Formazán (Riss <i>et al.</i> , 2013).....	39
Figura 18. 1) Nerolidol 2) α -bisabolol 3) Acetato de geranilo 4) Nerol 5) Citronelal 6) Geraniol 7) Eucaliptol 8) α -terpineol 9) Linalool 10) (S)-(-)-pineno 11) (-)-(R)-carvona 12) (+)-(S)-carvona 13) (-)-guaiol 14) α -felandreno 15) (-)-(S)-limoneno 16) (+)-(R)-limoneno 17) Estragol 18) (-)-óxido de cariofileno 19) (-)- <i>trans</i> -cariofileno 20) α -humuleno 21) IR3535 (Etil butilacetilaminopropionato) 22) DEET (<i>N,N</i> -Dietil- <i>m</i> -toluamida).....	42
Figura 19. Dispositivos para ensayos de actividad repelente.....	45

- Figura 20.** a) Posicionamiento entre la proteína 3K1E-metabolitos b) DEET c) IR3535 d) Acetato de geranilo e) α -bisabolol f) Nerolidol g) Nerol.....49
- Figura 21.** Comparación de los tiempos de protección para cada uno de los terpenos evaluados (acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol y nerol) a diferentes tiempos de exposición (0-2 min, 2-15 min, 15-60 min).....52
- Figura 22.** Número de picaduras registradas en el intervalo de tiempo de 15 a 60 minutos a las concentraciones de 0,1%, 10% y 25% (v/v) para cada metabolito evaluado (α -bisabolol, nerolidol, acetato de geranilo, nerol).....54
- Figura 23.** Mezclas en concentración 5% y 10% (v/v). **a.** y **b.** Picaduras registradas para las mezclas en los tiempos 0-2 min, 2-15 min, 15-60 min. **c.** y **d.** Picaduras registradas para las mezclas en el intervalo de tiempo 15-60 min.....56

Lista de Apéndices

1. Consentimiento informado: Estudio de manifestaciones semioquímicas de aceites esenciales y extractos SFE de plantas tropicales colombianas frente *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Código 6861-2250-28.

Los apéndices están adjuntos en el CD y puede visualizarlos en base de datos de la biblioteca de la Universidad Industrial de Santander.

Resumen

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE TERPENOS CONTRA LA PICADURA DE HEMBRAS DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae): UN ESTUDIO DE ENFOQUE CON SIMULACIONES *in silico* DE LA PROTEÍNA ODORANTE 3K1E.*

AUTOR: JOHAN SEBASTIÁN PORTILLA PULIDO**

PALABRAS CLAVE: Repelentes, metabolitos secundarios, Proteína de unión a odorantes, Tiempo de protección, *Aedes aegypti*.

DESCRIPCIÓN: Se ha reportado que el principal efecto secundario del uso continuo de repelentes sintéticos como DEET e IR3535 es la irritación cutánea. Por ello, existe un interés creciente en alternativas de origen natural, como Aceites Esenciales (AEs) y compuestos mayoritarios, que evidencien efecto repelente sin contraindicaciones. El objetivo principal de este trabajo fue identificar el efecto repelente frente a *Aedes aegypti* de terpenos derivados de AEs seleccionados mediante análisis *in silico* por su afinidad con la proteína odorante AaegOBP1 (código PDB: 3K1E). Se analizó la interacción proteína-metabolito mediante el valor de energía libre (ΔG) de 20 terpenos utilizando las herramientas bioinformáticas Swissdock y Chimera. Los terpenos con mayor afinidad comparable a las sustancias comerciales fueron seleccionados para evaluar su actividad repelente frente a hembras adultas de *Ae. aegypti* a concentraciones de 0,1%, 10% y 25% (v/v). Se evaluaron diferentes tiempos de protección (0-2; 2-15; 15-60 min), con DEET como control positivo y acetona como control negativo. Se verificó la toxicidad de los terpenos mediante los programas en línea Osiris y Molinspiration y se realizaron ensayos de citotoxicidad en la línea celular *Vero* con el método MTT. Se prepararon dos formulaciones con polietilenglicol 400 para pruebas de perdurabilidad *in vivo*. Cuatro terpenos presentaron capacidad de interacción con la proteína 3K1E comparable con DEET e IR3535, sin posibles efectos tóxicos: Acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol y nerol. Los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol y sus mezclas no evidenciaron citotoxicidad y mostraron porcentajes de protección cercanos al 100% con tiempos mayores a 1 hora en concentraciones 10% y 25%. Las pruebas de perdurabilidad mostraron porcentajes de protección de 100% en un tiempo máximo de tres horas. Los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol y sus mezclas son candidatos a ser componentes de formulaciones de repelentes con tiempos y porcentajes de protección similares al DEET.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez, *Ph. D.* Codirectores: Jonny Edward Duque Luna *Ph. D.*, Ruth Mariela Castillo Morales *MSc.*

Abstract

TITLE: REPELLENT ACTIVITY OF TERPENES AGAINST FEMALE *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae): A FOCUS STUDY WITH *in silico* SIMULATIONS OF ODORANT BINDING PROTEIN 3K1E.*

AUTHOR: JOHAN SEBASTIÁN PORTILLA PULIDO**

KEY WORDS: Repellents, secondary metabolites, Odorant Binding Protein OBP, Protection time, *Aedes aegypti*.

DESCRIPTION: DEET and IR3535 synthetic repellents had reported skin irritation and respiratory toxicity as the main adverse effects due to excessive use. Therefore, there is a growing interest in alternatives of natural origin, such as Essential Oils (AEs) and major compounds, which show a repellent effect without contraindications. The main objective of this work was to identify the repellent effect against *Aedes aegypti* of terpenes derived from EOs selected through *in silico* analysis for their affinity to AegOBP1 odorant binding protein (PDB Code: 3K1E). The protein-metabolite interaction of 20 terpenes was analyzed through Gibb's free energy (ΔG) using Swissdock and UCSF Chimera Software. Terpenes with the highest affinity compared to commercial repellents were selected to evaluate their repellent activity in concentration 0.1%, 10%, and 25% (v/v) against adult females of *Aedes aegypti*. Different periods of time (0-2 min, 2-15 min, 15-60 min) were evaluated with DEET as positive control and acetone as negative control. The toxicity of terpenes was verified through Osiris and Molinspiration Cheminformatics Software. Additionally, *in vitro* cytotoxicity assays in *Vero* cells were realized through MTT cellular viability method. Two formulations were prepared with polyethylene glycol (PEG 400) to evaluate skin long-lasting *in vivo* assay. Four terpenes showed interaction capacity comparable with DEET and IR3535: Geranyl acetate, nerolidol, bisabolol, and nerol. Geranyl acetate, nerolidol and, their mixtures showed no *in vitro* cytotoxicity and exhibited protection percentages near to 100% with greater times than one hour in concentration 10% and 25% (v/v). Long-lasting assays showed three hours as maximum protection time with 100% protection percentage. The metabolites geranyl acetate, nerolidol, and their mixtures are candidates to repellent formulations with times and protection percentages similar to DEET.

*Bachelor Thesis

**Science Faculty, Chemistry Department. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez, *Ph. D.*
Co-directors: Jonny Edward Duque Luna *Ph. D.*, Ruth Mariela Castillo Morales *MSc.*

Introducción

A nivel mundial el zancudo *Aedes aegypti* es el principal vector de arbovirosis como Dengue, Chikungunya y Zika. Estas enfermedades afectan principalmente a la población humana ubicada en zonas tropicales, reportándose hasta 2,7 millones de casos anualmente (Colón-González, Peres, Steiner São Bernardo, Hunter, & Lake, 2017; Murray, Quam, & Wilder-Smith, 2013; Yactayo, Staples, Millot, Cibrelus, & Ramon-Pardo, 2016). La principal estrategia de prevención contra estas enfermedades consiste en el uso de métodos de protección personal que buscan evitar la picadura del vector mediante barreras físicas como prendas de manga larga, ropa impregnada con sustancias de origen sintético como permetrina, mosquiteros y el uso de repelentes tópicos que contengan sustancias sintéticas como el DEET o IR3535 (Cisak, Wójcik-Fatla, Zajac, & Dutkiewicz, 2012; Diaz, 2016; Orsborne *et al.*, 2016). La efectividad de los repelentes tópicos contrasta con el reporte de efectos adversos como toxicidad e irritabilidad en niños y adultos mayores (Department of Health Toxicology Unit, 2002; Tavares *et al.*, 2018). Por ello, la búsqueda de alternativas de origen natural se ha enfocado en el uso de aceites esenciales (AEs) de plantas de los géneros *Citronella*, *Citrus* y *Eucalyptus* que han sido reconocidos culturalmente por su efecto repelente (Diaz, 2016; Maia & Moore, 2011).

El mecanismo de acción de los repelentes se basa en la recepción de odorantes en insectos. Este proceso ha sido ampliamente descrito en *Drosophila melanogaster* (Guo & Smith, 2017; Xu, Atkinson, Jones, & Smith, 2005). La recepción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) provenientes de plantas y animales son captados a través de las sensilas tricoideas que son quimiorreceptores especializados presentes en las antenas. Estos COVs pasan a través de las sensilas para llegar a la linfa sensilar (medio hidrofílico con un pH

cercano a 7), donde son transportados mediante proteínas de unión a odorantes (OBPs). Estas OBPs son estructuralmente similares a una caja o bolsillo capaces de albergar en su interior moléculas a través de interacciones de tipo hidrofóbico e hidrofílico (Bohbot & Pitts, 2015; Leal, 2013; Leite *et al.*, 2009).

En *Ae. aegypti* la principal proteína odorante se conoce como AegOBP1 (código PDB: 3K1E), presente en antenas y palpos maxilares. Esta proteína está conformada por 125 aminoácidos, destacándose tres que están presentes en el bolsillo de unión (binding pocket): Arginina 23 (Arg23), tirosina 54 (Tyr54) e isoleucina 125 (Ile125) del extremo carboxiterminal (Leite *et al.*, 2009; Zhou, He, Pickett, & Field, 2008). Estos aminoácidos interactúan con las moléculas odorantes, facilitando su transporte a través de la linfa sensorial hasta llegar a la membrana celular de dendritas de neuronas receptoras olfativas (NROs), donde se encuentran los receptores de odorantes (ROs). Los ROs son proteínas especializadas formadas por heterodímeros receptor-correceptor que permiten el paso de iones a través de la membrana de la neurona (Benton, 2006; Xu, Choo, De La Rosa, & Leal, 2014). Las interacciones OBPs-ROs tienen lugar en un medio con pH bajo que permite el cambio conformacional de las OBPs y la posterior liberación de moléculas en los receptores. El paso de iones a través de los ROs permite la transformación de una señal química proveniente del odorante en una señal eléctrica (Guo & Smith, 2017; Xu *et al.*, 2014). Para moléculas con actividad biológica repelente, las señales eléctricas disminuyen causando pérdida temporal de la capacidad sensorial del mosquito (*Figura 1*).

Los estudios computacionales y simulaciones *in silico* permiten la predicción de la interacción entre diferentes compuestos, obteniendo la identificación de sustancias con alta probabilidad de interacción con residuos de aminoácidos responsables de funciones

biológicas específicas. Esta información permite diseñar diferentes moléculas que tengan como blanco estructuras biológicas como proteínas y enzimas de difícil extracción o purificación (Alonso *et al.*, 2006). A pesar de la escasez de estudios computacionales enfocados en la búsqueda de moléculas con posible efecto repelente frente *Ae. aegypti*, se observa que los pocos estudios se apoyan en el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y moleculares para predecir su actividad biológica. En la presente investigación se buscó evaluar el efecto repelente de diferentes metabolitos secundarios (terpenos) en *Ae. aegypti*, mediante simulaciones computacionales *in silico* validadas con pruebas de repelencia *in vivo* y de citotoxicidad *in vitro*.

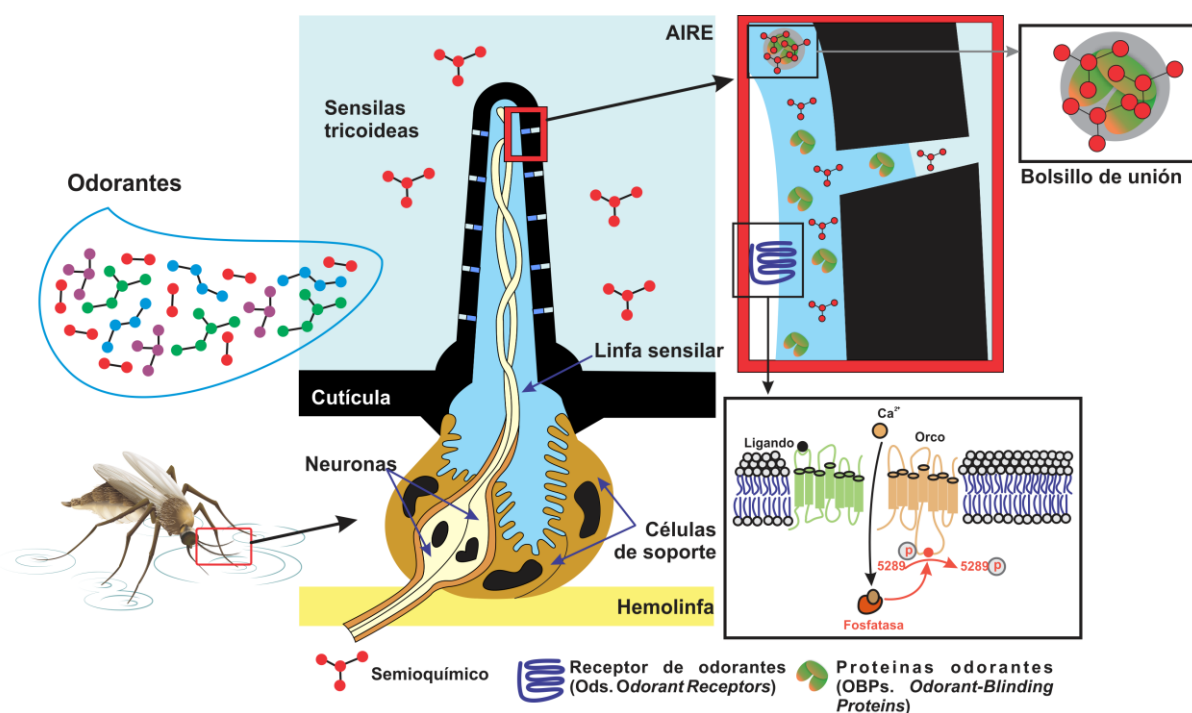


Figura 1. Mecanismo de recepción de odorantes. Adaptado de Guo & Smith, 2017; Leal, 2013.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Identificar metabolitos secundarios (terpenos) con efecto repelente contra la picadura de hembras de *Aedes aegypti*.

1.2. Objetivos específicos

- Identificar metabolitos secundarios (terpenos) mediante análisis *in silico* con capacidad de interacción con la proteína odorante 3K1E de *Aedes aegypti*.
- Confirmar mediante pruebas *in vivo* la capacidad repelente de los metabolitos con posible interacción con la proteína odorante 3K1E.
- Evaluar efectos de sinergia de los metabolitos con mejor capacidad repelente en pruebas *in vivo*.
- Evaluar la actividad citotóxica en cultivo de células normales de la mezcla de metabolitos con mayor capacidad repelente.

2. Marco teórico

2.1. *Aedes aegypti*

Ae. aegypti pertenece a la familia Culicidae del orden Diptera, principal vector de enfermedades como Dengue, Chikungunya y Zika (Centers for Disease Control and Prevention CDC, 2016). Morfológicamente, los adultos del género *Aedes* se distinguen de los anofelinos y otros zancudos por tener palpos más cortos y por adoptar una posición más horizontal sobre la superficie donde reposan. Se diferencian de la mayoría de los otros culícidos por la terminación aguda de su abdomen y por la ausencia de cerdas espiraculares. *Ae. aegypti* es un zancudo oscuro con bandas blancas basales en los segmentos tarsales, en el mesonoto posee un diseño característico en forma de lira que puede desaparecer a través del tiempo (Bar & Andrew, 2013; Thirion, 2003; Rickards, 1960).

Las escamas blancas del clípeo y las de los palpos se conservan permitiendo la identificación de la especie. Como en otras especies de culícidos, el macho se distingue de la hembra por sus antenas plumosas y palpos más largos. El cuerpo del adulto es pequeño, menor de 5 mm de longitud, antenas con numerosos artejos, alas delgadas con venas en diferente proporción ornamentadas por escamas; la proboscis de la hembra está adaptada para chupar sangre. Tienen definida la región cefálica, torácica y abdominal, poseen exoesqueleto de quitina con escleritos (Balta León, 1997; Rueda, 2004).

El mosquito presenta un ciclo de vida que va desde el huevo hasta la fase adulta (*Figura 2*). Este proceso toma entre 8-10 días, variando levemente de acuerdo con las condiciones medioambientales (CDC, 2012). Los huevos de *Ae. aegypti* son cilíndricos, alargados y de

un tamaño aproximado entre 24-35 μm y son depositados por la hembra en diferentes tipos de contenedores con agua limpia estancada como botellas, llantas, charcos y piscinas no tratadas (Farnesi, Menna-Barreto, Martins, Valle, & Rezende, 2015). Una vez se encuentren en condiciones ideales, la larva emerge en un día, de lo contrario el huevo puede permanecer en estado de latencia durante varios meses (Steinwascher, 1984).

El estadio larvario se caracteriza por presentar varias etapas de crecimiento de L1 a L4 que se desarrollan únicamente en un medio acuoso para sobrevivir. Aunque pueden ser observadas a simple vista, son sensibles a la luz por lo que permanecen en movimiento constante. Además, se alimentan de detritus y materia orgánica (Rickards, 1960; Rueda, 2004).

Al cabo de 4-5 días, la larva L4 pasa al estadio de pupa, cuya forma es redondeada y similar a una crisálida, en este estado no se alimenta. Esta fase constituye el periodo de preparación morfológica y fisiológica para emerger después de 2-3 días como un individuo adulto (Thirion, 2003). Estos últimos son de vida libre y pueden llegar a vivir hasta dos meses. Mientras que los machos se alimentan de exudados de plantas, las hembras se alimentan de sangre, necesaria para la producción de huevos. Una vez la hembra se ha alimentado y apareado con un macho, realiza la oviposición en lugares húmedos y con agua limpia estancada (Rickards, 1960).

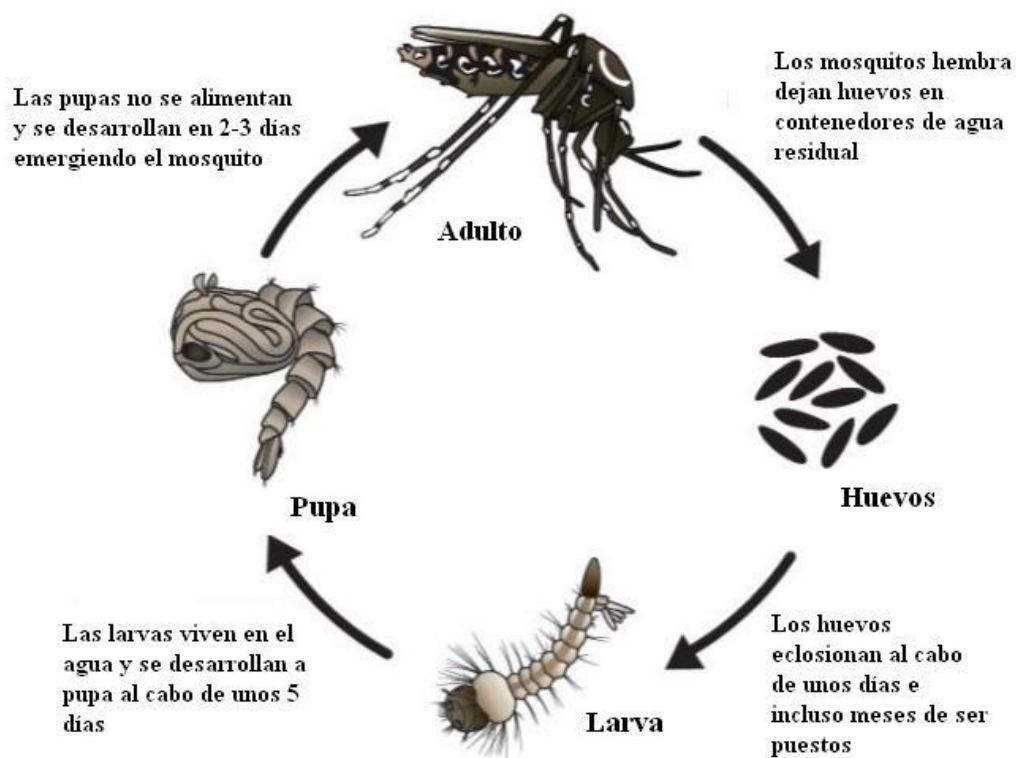


Figura 2. Ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti* (CDC, 2012).

2.2. Enfermedades transmitidas por *Aedes aegypti*

Entre las enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti*, se encuentra el Dengue, producida por el arbovirus DENV serotipos I, II, III y IV. Esta es una enfermedad que afecta anualmente a más de 1,6 millones de personas en América Latina y el Caribe. Debido a que presenta un amplio cuadro clínico, es difícil de reconocer y puede presentar complicaciones (Dengue grave) representadas en trombocitopenia (disminución de las plaquetas en sangre) y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos cutáneos produciendo hemorragias (Murray *et al.*, 2013). Actualmente, no existe una vacuna o cura a esta enfermedad viral, pero con el tratamiento adecuado de los síntomas se reducen los riesgos de muerte. Menos del 2,5% de los casos presentados a nivel mundial han causado la muerte de los pacientes (World Health Organization, 2017).

Desde el año 2013, *Ae. aegypti* también se considera como principal transmisor en las Américas de enfermedades reemergentes como el Zika y Chikungunya, producidas por arbovirus y con un cuadro epidemiológico similar al Dengue. A pesar de la gravedad de las patologías asociadas a cada una de ellas, no tienen vacuna y su tratamiento es en algunos casos insuficiente. Anualmente se reportan más de 1,1 millones de casos por Chikungunya y 220 mil casos por Zika en América Latina (Colón-González *et al.*, 2017; Yactayo *et al.*, 2016).

2.3. Sustancias sintéticas repelentes

El uso de los métodos de protección personal como repelentes ha demostrado ser efectivo para la prevención de la picadura del vector *Ae. aegypti*. Tales repelentes se han utilizado en ropa impregnada para proteger trabajadores, personal militar (Kitchen, Lawrence, & Coleman, 2009), estudiantes (Orsborne *et al.*, 2016; Wilder-Smith *et al.*, 2012) y gente del común de la picadura no solo del mosquito, sino de otros insectos (Faulde, Uedelhoven, & Robbins, 2003; Faulde & Uedelhoven, 2006; Phasomkusolsil & Soonwera, 2010; Vaughn & Meshnick, 2011). Para el caso de ropa impregnada se ha observado efectividad incluso después de lavados continuos ya que son fabricadas con materiales textiles que permiten retener por mayor tiempo el ingrediente activo que causa el efecto repelente (Pennetier *et al.*, 2010).

En la industria, la implementación de sustancias sintéticas como el DEET (*N,N*-dietil-*m*-toluamida) e IR3535 (Etil butilacetilaminopropionato) (Cockcroft, Cosgrove, & Wood, 1998; Thavara *et al.*, 2001) (*Figura 3*) brindan un tiempo prolongado de repelencia contra el vector. Usualmente, estas sustancias están presentes en los productos comerciales como

ingredientes activos en concentraciones entre 15-40% en volumen (Cockcroft *et al.*, 1998; Diaz, 2016; Tavares *et al.*, 2018; Tavassoli *et al.*, 2011).

A pesar de su efectividad como repelente, se han reportado efectos adversos como irritación cutánea y de mucosas de la vía respiratoria de estas sustancias cuando están presentes en altas concentraciones. Además, se han reportado otros efectos no relacionados con la salud como son el daño de algunos materiales como fibras textiles, cuero y plástico (Jordan, Schulze, & Dolan, 2012; Nerio, Olivero-Verbel, & Stashenko, 2010; Tavares *et al.*, 2018).



Figura 3. Estructura molecular del DEET (izquierda) e IR3535 (derecha) sustancias repelentes de productos comerciales.

2.4. Aceites esenciales como repelentes

Diversas sustancias derivadas de plantas han sido extraídas y caracterizadas con el fin de utilizarlas en métodos de prevención y control contra *Ae. aegypti* (Andersson, 2010; Pal, Kumar, & Tewari, 2011; Trongtokit, Rongsriyam, Komalamisra, & Apiwathnasorn, 2005). Los AEs extraídos de familias de plantas como *Lamiaceae* (sustancias con olor mentolado), *Poaceae* (gramíneas con olor aromático) y *Pinaceae* (familia de los pinos y cedros) son comúnmente utilizados como repelentes en diferentes partes del mundo. Además, características como olor agradable de estos aceites han permitido ser empleadas en la

industria alimentaria como saborizante y perfumería. Esto demuestra que al ser implementados en productos de uso diario son alternativas más seguras que el uso del DEET evitando efectos adversos (Gillij, Gleiser, & Zygadlo, 2008; Gleiser, Bonino, & Zygadlo, 2011; Maia & Moore, 2011; Trongtokit *et al.*, 2005).

Muchos de los repelentes comerciales actuales contienen como ingredientes activos AEs que reportan períodos de protección entre 60-120 minutos. Dichas sustancias, aunque útiles, presentan un tiempo de perdurabilidad reducido debido a su alta volatilidad. Por esta razón, se han implementado sustancias adicionales en formulaciones como vehículos y excipientes que mejoren el tiempo de acción y además no reaccionen entre sí (Kongkaew, Sakunrag, Chaiyakunapruk, & Tawatsin, 2011; Leyva *et al.*, 2012; Oyedele *et al.*, 2002; Pavela & Benelli, 2016; Suwansirisilp *et al.*, 2013).

2.5. Terpenos y biosíntesis de terpenos

Los terpenos son compuestos químicos mayoritarios en los AEs formados principalmente por carbono e hidrógeno representados por unidades de isopreno (C_5H_8) (*Figura 4*), una molécula precursora de lípidos de membrana, entre ellos el colesterol. Pueden ser clasificados acordes al número de unidades de isopreno en la molécula: Monoterpenos (dos unidades), sesquiterpenos (tres unidades), diterpenos (cuatro unidades), entre otros. Con base al número de anillos carbonados (cicloalcanos o cicloalquenos) en la estructura del terpeno, pueden ser clasificados como acíclico, monocíclico y bicíclico. Además, cada uno de los subgrupos mencionados puede presentar grupos funcionales como alcoholes, cetonas, éter o simplemente cadenas carbonadas (Dragicevic & Maibach, 2015; Pandit, Aquil, & Sultana, 2006; Santos, Silva, & Barbosa, 2010).

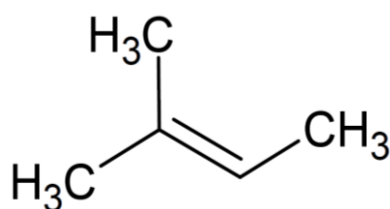


Figura 4. Unidad de Isopreno.

En plantas, la biosíntesis de terpenos se lleva a cabo en el citoplasma de las células y en el interior de los cloroplastos. En general, se divide en dos pasos: La formación de la unidad activada de cinco carbonos (isopreno) y la condensación de varias unidades activadas (Pavela & Benelli, 2016)

La formación de la unidad activada de cinco carbonos (isopreno activado) se da a partir del acetil-coA a través del ácido mevalónico (MVA). Tres moléculas de acetil-coA se unen formando MVA como intermediario que es pirofosforilado (adición de dos grupos fosfato) usando dos moléculas de ATP formando ácido mevalónico pirofosfato (MVA-PP). Finalmente, la descarboxilación y deshidratación (salida de CO₂ y H₂O) del MVA-PP resulta en la formación de la unidad activada de cinco carbonos, Isopentenil pirofosfato (IPP), que isomeriza en dimetilalil Pirofosfato (DMAPP) (Maimone, 2002; Pavela & Benelli, 2016). A continuación, se presenta de manera detallada cada paso:

- a) Una condensación de Claisen (reacción entre dos ésteres o tioésteres) une dos moléculas de acetil-CoA, este proceso es catalizado por la enzima acetil-CoA acetil transferasa, formando acetoacetil-CoA (*Figura 5*).

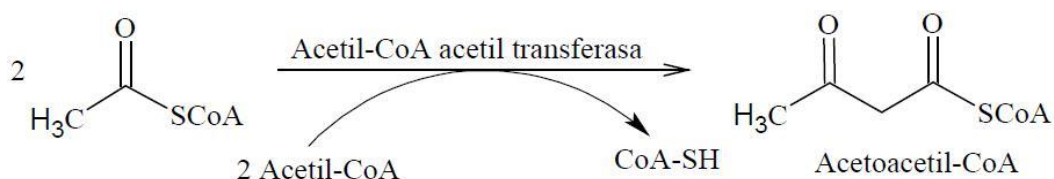


Figura 5. Paso 1 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.

- b) Con la formación de acetoacetyl-CoA se favorece la formación de un grupo hidroxilo en la estructura, posteriormente, la unión de otra molécula de acetyl-CoA forma β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), este proceso es catalizado por la enzima HMG-CoA sintetasa (*Figura 6*).

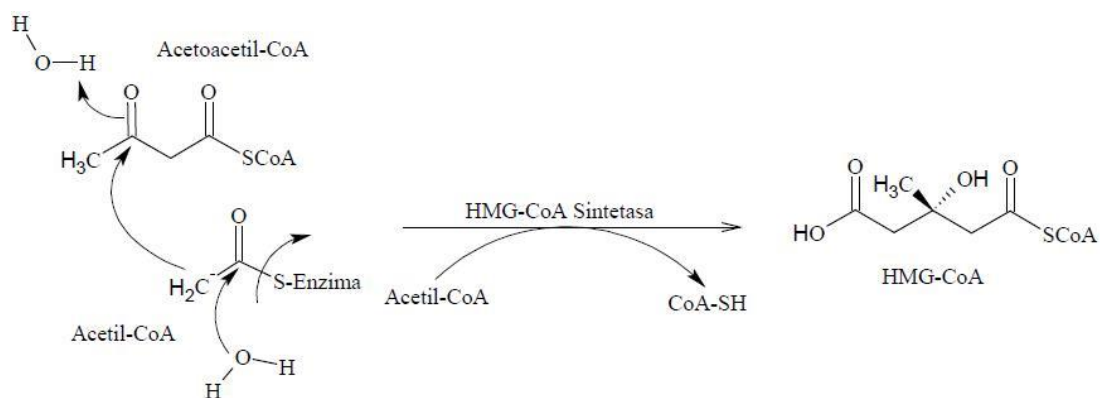


Figura 6. Paso 2 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.

- c) El grupo funcional cetona del HMG-CoA se reduce y se elimina una molécula de Coenzima A (CoA-SH), formando MVA, este proceso es catalizado por la enzima HMG-CoA reductasa. En este paso se emplean dos moléculas de NADPH que proporciona la capacidad reductora de la enzima (*Figura 7*).

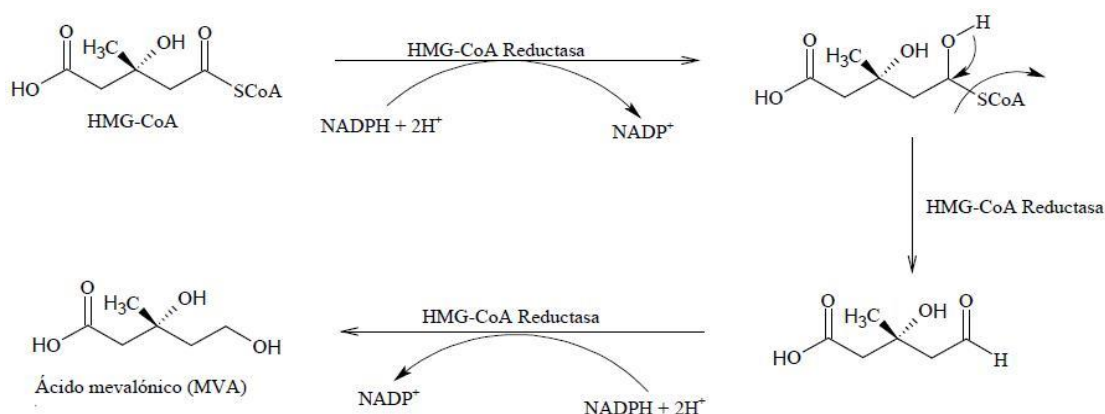


Figura 7. Paso 3 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.

- d) Las enzimas MVA quinasa y fosfomevalonato quinasa introducen dos grupos fosfato en el ácido mevalónico (MVA), formando ácido mevalónico pirofosfato (MVA-PP). En este proceso se emplean dos moléculas de ATP (*Figura 8*).

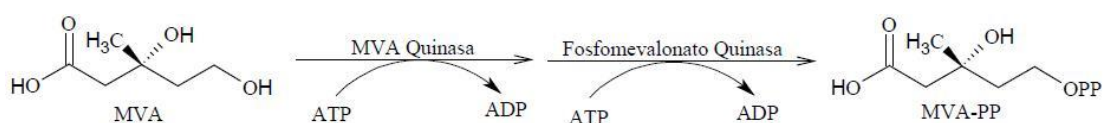


Figura 8. Paso 4 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.

- e) Posteriormente, se elimina dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) del MVA-PP por acción de la enzima difosfomevalonato decarboxilasa. En este proceso se emplea una molécula de ATP formando isopentenil pirofosfato (IPP) (*Figura 9*).

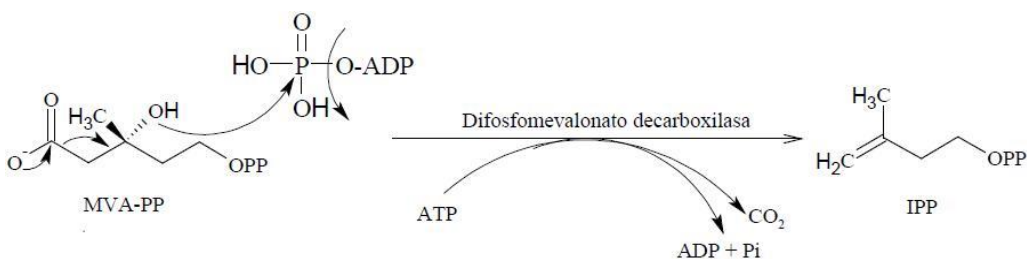


Figura 9. Paso 5 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.

f) Finalmente, la acción de una enzima isomerasa favorece la formación de la unidad activada de cinco carbonos dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (*Figura 10*).

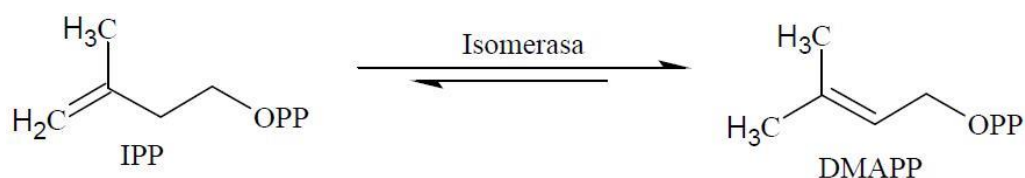


Figura 10. Paso 6 Biosíntesis de terpenos. Adaptado de Maimone, 2002.

La segunda parte de la síntesis comprende la condensación de varias unidades activadas de DMAPP sin necesidad de enzimas. Cabe destacar que la pérdida estereoespecífica de un protón en esta estructura conduce a la formación de terpenos en sus isómeros *cis-/trans-* e isómeros ópticos (*R*)-(*S*). (*Figura 11*).

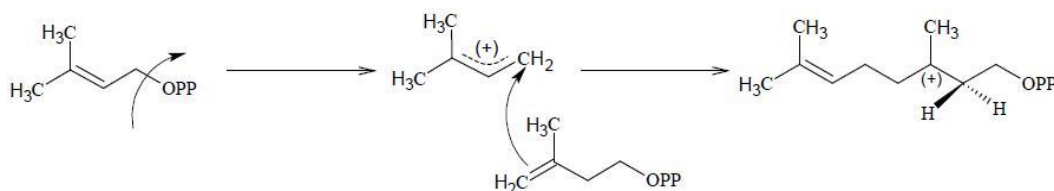


Figura 11. Unión de unidades de Isopreno. Adaptado de Maimone, 2002.

La unión de varias unidades activadas de isopreno lleva a la formación de moléculas precursoras de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y esteroides (*Figura 12*).

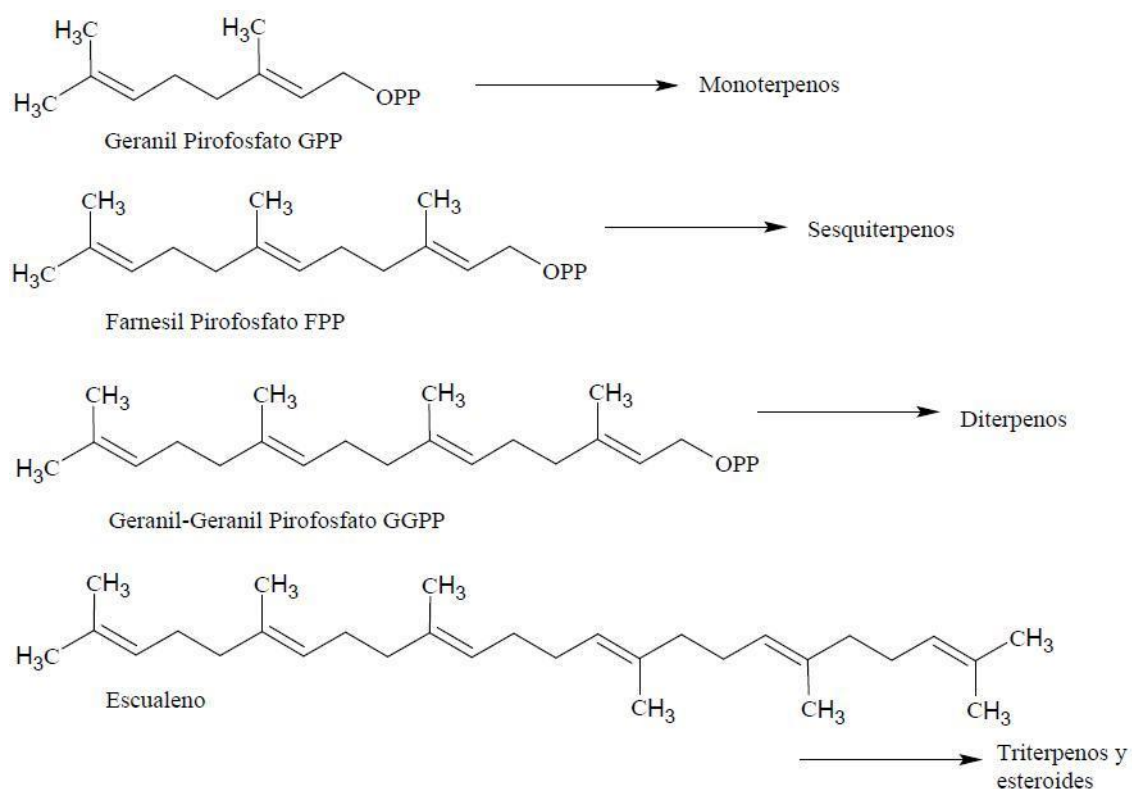


Figura 12. Moléculas precursoras de terpenos y lípidos de membrana. Adaptado de Maimone, 2002.

2.6. Proteína odorante *Ae*gOBP1

Los zancudos usan señales olfativas para detectar o localizar la conveniencia a sitios de oviposición, reproducción y alimentación mediante mecanorreceptores ubicados en antenas y palpos maxilares. Adicionalmente, detectan olores mediante la quimio-recepción de sustancias volátiles que entran en contacto con proteínas odorantes presentes en dendritas ciliadas especializadas en la recepción de sustancias (Leite *et al.*, 2009; Yin, Choo, Duan, & Leal, 2015). La proteína odorante de *Ae. aegypti* fue caracterizada inicialmente bajo el nombre *Ae*gOBP1 y posteriormente conocida como 3K1E en bases de datos especializadas (Figura 13).

La proteína contiene dos subunidades idénticas cada una con una estructura de 125 aminoácidos y una estructura secundaria de 6 hélices alfa, grupo espacial P2₁ (la proteína cristaliza en una celda primitiva, con un eje helicoidal de 180° y una traslación de ½ unidades en el eje de referencia). Adicionalmente, tiene un binding pocket o bolsillo de unión en el cual los compuestos odorantes son capaces de interactuar mediante interacciones débiles como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones de tipo hidrofóbicas. El sitio de unión de esta proteína odorante está conformada por tres aminoácidos: Arginina (posición 23), tirosina (posición 54) e isoleucina (posición 125) en el extremo carboxiterminal. De acuerdo con varios estudios, esta proteína es la responsable de interactuar con sustancias volátiles (Gopal & Kannabiran, 2013; Leite *et al.*, 2009; Northey *et al.*, 2016).

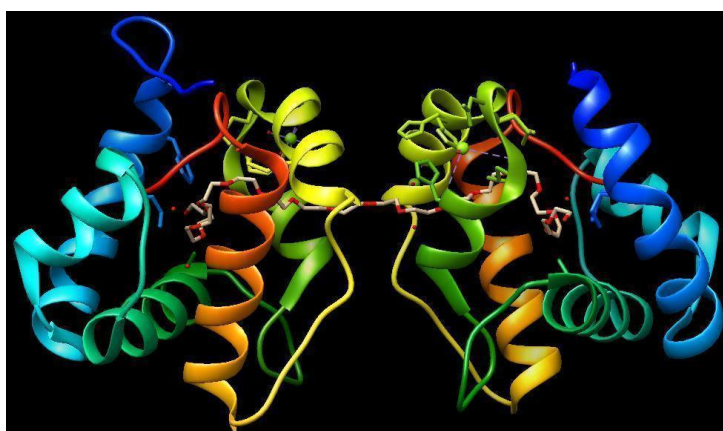


Figura 13. Estructura tridimensional de la proteína AegOBP1 (3K1E). Protein Data Bank (PDB).

De esta manera, el principal fundamento de las sustancias repelentes se basa en la interrupción o bloqueo del olfato del mosquito, es decir, sustancias que sean capaces de unirse a las proteínas odorantes OBPs para evitar que el mosquito se acerque a las zonas donde dicha sustancia repelente se encuentre (Bezerra-Silva *et al.*, 2016; Leal & Leal, 2015).

2.7. Docking molecular

El descubrimiento de dianas farmacológicas y medicamentos desde el punto de vista genómico y proteómico tomó sus inicios desde la invención de métodos computacionales que permitieron predecir las interacciones de biomoléculas de interés con diferentes tipos de compuestos. Este procedimiento se lleva a cabo mediante cálculos con base en las teorías de la mecánica cuántica y la termodinámica. De esta manera, el docking molecular, como procedimiento computacional, emplea bases de datos de la caracterización estructural por difracción de rayos X y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de biomoléculas de interés. Sin embargo, algunas no han sido determinadas completamente, impidiendo su estudio (Alonso *et al.*, 2006).

Adicionalmente, se utilizan algoritmos matemáticos que permiten la predicción de interacciones moleculares. Existen diversos Software de docking molecular como DOCK, AutoDock, FlexX, GOLD, GLIDE y SwissDock, este último emplea EADock DSS algorithm (Grosdidier, Zoete, & Michielin, 2011) que calcula modos de unión BMs (Binding Modes) proteína-ligando con el fin de encontrar una región o caja definida (local docking) de mayor afinidad. Posteriormente, identifica los valores de energía libre de interacción ΔG favorable en las cuales se tienen en cuenta parámetros como interacciones de tipo hidrofóbico, hidrofílico y Van der Waals.

Esta serie de parámetros se denomina Force Field (campo de fuerza) y utiliza la energía total de sistemas atómicos complejos a partir de fuerzas y propiedades como distancias de enlace, energía de solvatación, entalpía ΔH , entropía ΔS , energía cinética molecular,

energía potencial vibracional y rotacional, entre otras, que permiten la precisión en el cálculo de los BMs (Wang *et al.*, 2015; Warshel & Lifson, 1970).

Estas herramientas fueron creadas inicialmente con el propósito de desarrollar nuevos medicamentos; sin embargo, se han utilizado en otras áreas interdisciplinarias, por ejemplo, el uso de nuevas moléculas con posible actividad repelente contra mosquitos para disminuir la capacidad sensorial de los mismos. Este análisis de interacciones y cálculos de energía libre con proteínas de transporte en el sistema olfativo puede contribuir a encontrar nuevos compuestos que eviten la picadura del mosquito (Andrade-Ochoa *et al.*, 2018; Oliferenko *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008).

De manera general, el docking molecular es una herramienta que permite la selección previa de moléculas mediante interacciones con biomoléculas con base en predicciones optimizadas por cálculos computacionales complejos (*Figura 14*). Adicionalmente, es importante en diversas áreas de estudio permitiendo ahorrar tiempo y costos de experimentación brindando información detallada de funcionalidad de compuestos de interés (Alonso *et al.*, 2006; Grosdidier *et al.*, 2011).

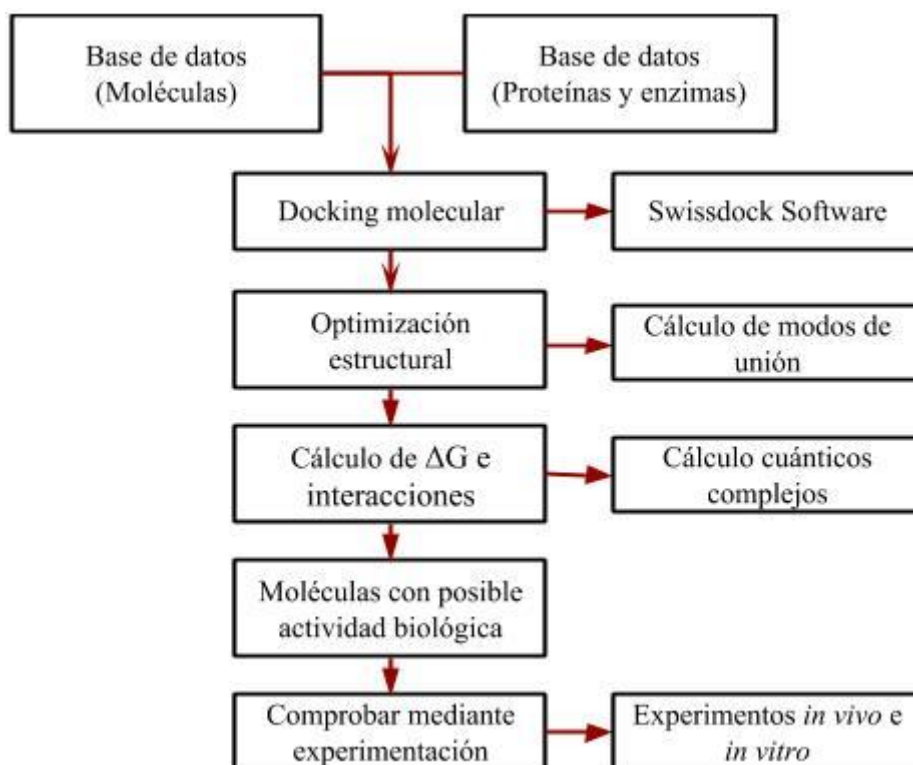


Figura 14. Representación sistemática del protocolo para la búsqueda de sustancias con actividad biológica e interés medicinal. Adaptado de Alonso *et al.*, 2006.

2.8. Pruebas de repelencia *in vivo*

Las pruebas de repelencia en laboratorio o campo tienen como finalidad evaluar la capacidad repelente y la perdurabilidad de una sustancia de origen sintético o natural contra la picadura de diferentes especies de mosquito (Phasomkusolsil & Soonwera, 2010; Vaughn & Meshnick, 2011). Existen diversos métodos para evaluar actividad repelente *in vivo*; sin embargo, los más utilizados son los procedimientos descritos según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y *The American Society for Testing and Materials Method* (E951-94 Año 2000) (Barnard *et al.*, 2006).

La metodología descrita por la OMS utiliza una jaula en la cual se contienen aproximadamente 200-250 hembras de mosquito (*Figura 15*). Durante los experimentos se emplea como control positivo la sustancia DEET o IR3535 (repelentes sintéticos comúnmente empleados) y los brazos de personas voluntarias. Las manos de los voluntarios son cubiertas con guantes de nitrilo o látex para evitar picaduras en dicha zona.

Adicionalmente, sobre un área aproximada de 25 cm² de cada antebrazo se aplica 1 mL de solución de sustancia y 1 mL de control negativo (solvente de la solución, alcohol o acetona). Si se desconoce la toxicidad de la sustancia, esta es aplicada con un algodón sobre una tela suave como manga para la persona voluntaria, evitando exposición directa. Las picaduras y aterrizajes en ambos brazos son contabilizadas en diferentes intervalos de tiempo con el fin de calcular el porcentaje de protección. La metodología descrita anteriormente puede estar sujeta a ligeros cambios según el interés de la investigación.



Figura 15. Metodología “arm in cage” OMS. (Barnard *et al.*, 2006)

El procedimiento descrito según *The American Society for Testing and Materials Method* (ASTM, E951-94 Año 2000) es una modificación del método previamente descrito, éste

utiliza un módulo de acrílico (*Figura 16*) que minimiza el área de exposición frente a mosquitos y posibles efectos adversos de las sustancias. Además, este módulo permite evaluar más de una especie de mosquito simultáneamente utilizando diferentes compartimentos, permitiendo reducir la cantidad de réplicas y mosquitos empleados en pruebas *in vivo*. De igual forma, se emplea como control positivo DEET o IR3535 y alcohol o acetona como control negativo. La cantidad de mosquitos oscila entre 5-10 hembras según el tamaño de los compartimientos. El procedimiento para calcular el porcentaje de protección y repelencia no cambia respecto al previamente descrito (Barnard, 2005).



Figura 16. Dispositivos para pruebas *in vivo*, *The American Society for Testing and Materials* Method (Barnard *et al.*, 2006).

Finalmente, factores externos, difícilmente controlables, influyen en la interpretación de ensayos de repelencia disminuyendo la efectividad como repelente. Estos factores están asociados a la absorción o penetración a través de la piel de las sustancias empleadas, la rápida volatilización, la abrasión (contacto con otras superficies y ropa) y la solvatación de la sustancia con el sudor. La búsqueda de sustancias con efecto repelente tiene como uno

de sus propósitos su amplio uso sobre diferentes personas presentando variaciones mínimas (Barnard *et al.*, 2006).

2.9. Pruebas de citotoxicidad en células

Las pruebas de viabilidad celular o citotoxicidad de uno o más compuestos son empleadas para evaluar la proliferación en diferentes líneas celulares. El método MTT desarrollado por Mosmann en 1983 se basa en la reducción de la sal de bromuro tetrazolio por parte de las células metabólicamente activas. El mecanismo de reducción de la sal de bromuro tetrazolio (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)) ocurre a través del NADH (poder reductor) y las deshidrogenasas de las células vivas que forman cristales de formazan de color violeta (*Figura 17*). Estos cristales solubles en DMSO precipitan en la superficie celular y pueden ser cuantificados en un espectrofotómetro a 570 nm. La señal generada es dependiente y proporcional a la concentración de cristales de formazán, periodo de incubación y células con actividad metabólica.

Este método fue desarrollado como alternativa a pruebas que empleaban sustancias marcadas con isótopos radiactivos como tritio-timidina $^3\text{[H]}$ -timidina y yodo-deoxiuridina $^{125}\text{[I]}$ -deoxiuridina que tienen la capacidad de incorporarse en el ADN. A pesar de su efectividad en la medición de la viabilidad celular, resultaba ser tedioso ya que eran necesarios diferentes pasos, disminuyendo su reproducibilidad.

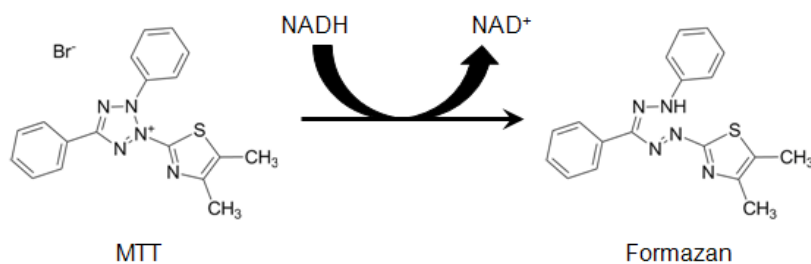


Figura 17. Reducción de la sal MTT en cristales de Formazán. (Riss *et al.*, 2013).

La línea celular *Vero* (células normales epiteliales de riñón de mono verde africano) son de interés en esta investigación pues permite estudiar la citotoxicidad de sustancias que tienen como finalidad ser utilizadas por un consumidor final (Pillai, Mahmud, & Perumal, 2012). De este modo, las sustancias con potencial efecto repelente *in vivo* y menor citotoxicidad *in vitro* pueden ser potenciales candidatos en formulaciones de productos comerciales.

2.10. Aspectos éticos

Para el desarrollo de este proyecto de investigación se trabajó con concentraciones bajas de metabolitos, con soluciones tamponadas no tóxicas y con volúmenes de ensayo pequeños. Siendo responsables con el medio ambiente, todo residuo o desecho generado en este proyecto fue debidamente tratado de acuerdo con la reglamentación institucional de etiquetado y embalaje para que pueda ser dispuesto al PGIR (Plan de Gestión Integral de Residuos en la Universidad), órgano institucional que se encarga de velar por la aplicación de estrategias preventivas y cumpliendo con las normas legales ambientales para el manejo

adecuado de los residuos peligrosos (Gestión ambiental, Universidad Industrial de Santander).

Ensayos con mosquitos: De acuerdo con los principios establecidos en las normas de Buenas Prácticas Clínicas (BPC), esta investigación corresponde a estudio no clínico y seguirá las orientaciones del numeral 7.3.5 de las normas BPC. Aquí se realizarán ensayos de repelencia en humanos de los metabolitos secundarios o mezclas de ellos, con previo consentimiento informado. Adicionalmente, en la resolución 008430 de octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia, acorde al consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética en Investigación Científica (CEINCI) Acta No. 3/2013, esta investigación se consideró como investigación sin riesgo de acuerdo con el artículo 11 de esta última resolución, dado que no se hará una modificación genética, bioquímica, celular, fisiológica o molecular en los mosquitos o en los voluntarios.

3. Materiales y métodos

3.1. Selección y evaluación de metabolitos secundarios

Se realizó una revisión bibliográfica de artículos con reportes de actividad biológica de diferentes AEs frente a mosquitos de importancia médica. Se seleccionaron aquellos artículos con reporte de posible actividad repelente, de los cuales se seleccionaron AEs cuyos compuestos mayoritarios fueran terpenos y terpenoides (Gillij *et al.*, 2008; Ríos, Stashenko, & Duque, 2017; Vera *et al.*, 2014). Los compuestos escogidos fueron adquiridos comercialmente de Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA).

3.2. Análisis *in silico*: Docking molecular y análisis de toxicidad

El docking molecular se llevó a cabo en la plataforma SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>), basada en el algoritmo EADock DSS (Grosdidier *et al.*, 2011). La estructura de la proteína odorante AegOBP1 de *Ae. aegypti* se obtuvo de la Protein Data Bank (PDB) bajo el código 3K1E. Las estructuras químicas de los 20 metabolitos analizados y los compuestos referencia (DEET e IR3535) (*Figura 18*) fueron obtenidas a través de la plataforma ZINC AC, especializada en estructura molecular para docking. Se empleó el Software UCSF Chimera para optimizar los parámetros de energía libre ΔG (kcal/mol) calculada mediante la adición de la superficie de potencial proteína-metabolito, puentes de hidrógeno, eliminación de iones metálicos y moléculas de solvente. Posteriormente, se verificó la afinidad de cada metabolito con la proteína odorante 3K1E mediante la confirmación de los potenciales sitios de unión.

Los metabolitos con menor valor de energía libre ΔG (kcal/mol) (mayor afinidad proteína-metabolito) se compararon con los valores obtenidos para repelentes comerciales DEET e IR3535 y se analizó su citotoxicidad a través de los programas Osiris y Molinspiration Cheminformatics. Se emplearon los parámetros de Lipinski como cuantificadores de propiedades biológicas: Logaritmo del coeficiente de partición solubilidad en lípidos y en soluciones acuosas (LogP), logaritmo de la solubilidad en soluciones acuosas (LogS) y análisis de riesgos de tipo mutagénico, tumorogénico y reproductivo. Aquellos metabolitos con mejor interacción con la proteína y que no reportaron riesgos citotóxicos *in silico* fueron empleados para pruebas de repelencia *in vivo*.

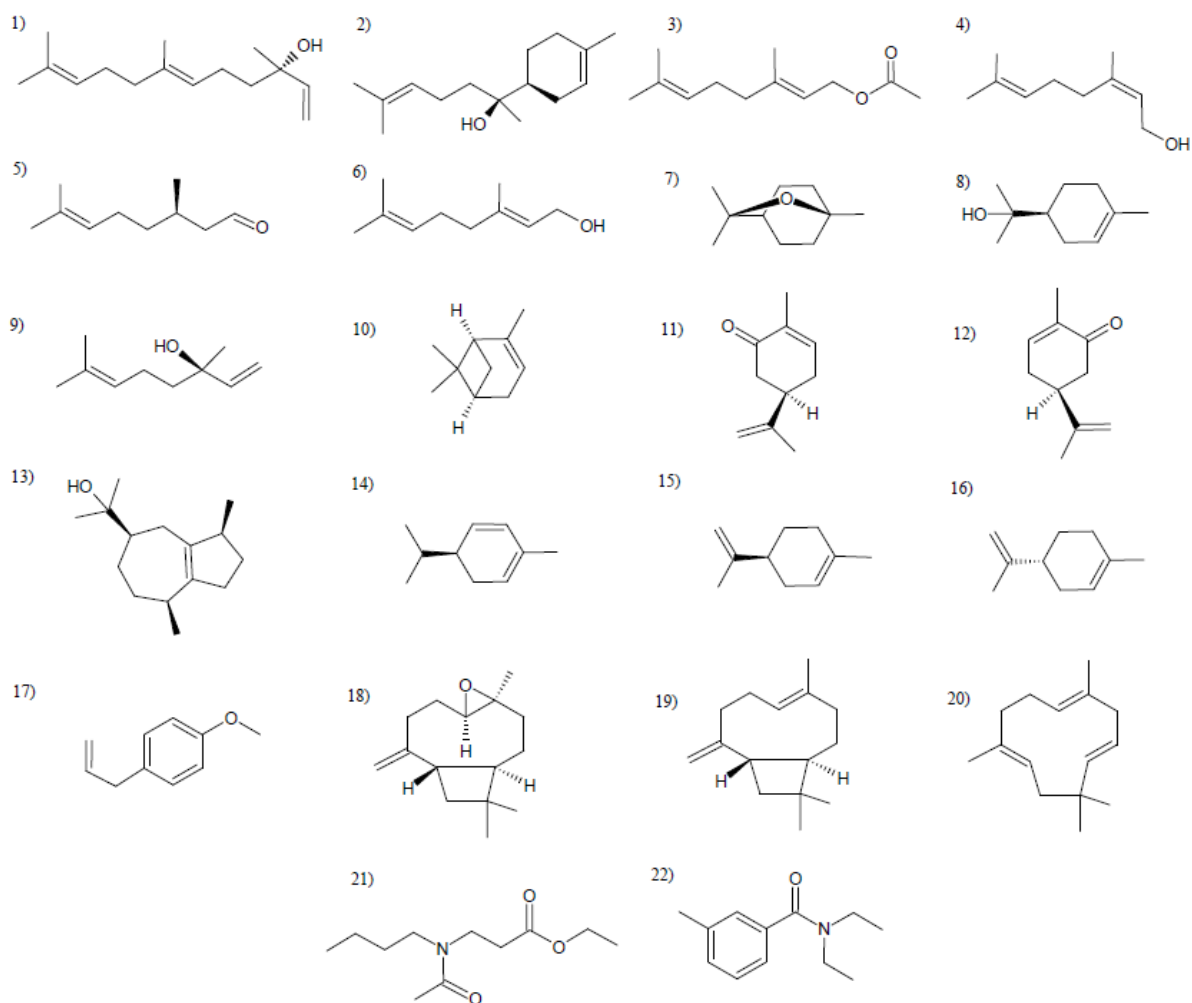


Figura 18. 1) Nerolidol 2) α -bisabolol 3) Acetato de geranilo 4) Nerol 5) Citronelal 6) Geraniol 7) Eucaliptol 8) α -terpineol 9) Linalool 10) (*S*)-(-)-pineno 11) (-)-(*R*)-carvona 12) (+)-(*S*)-carvona 13) (-)-guaiol 14) α -felandreno 15) (-)-(*S*)-limoneno 16) (+)-(*R*)-limoneno 17) Estragol 18) (-)-óxido de cariofileno 19) (-)-*trans*-cariofileno 20) α -humuleno 21) IR3535 (Etil butilacetilaminopropionato) 22) DEET (*N,N*-Dietil-*m*-toluamida).

3.3. Material biológico

Los ensayos de bioactividad se llevaron a cabo con una colonia de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller, dispuesta en jaulas de seguridad a una temperatura de 25 ± 5 °C, humedad relativa de 70 ± 5 % y fotoperiodo 12:12. Los machos fueron continuamente alimentados con una solución de miel (carbohidratos) al 10% (v/v). A las hembras se les suministró alimentación sanguínea periódicamente para la obtención de huevos con ratas albinas tipo Wistar (WI IOPS AF/Han strain) facilitadas por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, cumpliendo las disposiciones de la Ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Las larvas eclosionadas fueron almacenadas en recipientes de plástico y alimentadas con 0,5 g de alimento para peces Tetramin Tropical Flakes® tres veces por semana.

3.4. Bioensayos de actividad repelente *in vivo*

Para los bioensayos de actividad repelente, se emplearon los brazos de voluntarios (hombres y mujeres) entre 18 y 35 años, acorde al consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética en Investigación Científica (CEINCI) Acta No. 3/2013. Inicialmente se marcó un área aproximada de 4 cm² en las muñecas, en la cual se impregnó 50 µL de cada metabolito a concentraciones de 0,1%, 10% y 25% (v/v) disueltos en acetona. Una vez aplicados los tratamientos, se dio un tiempo prudente de cinco minutos para permitir la evaporación del solvente y observar posibles reacciones alérgicas de la sustancia. El brazo derecho fue empleado para los tratamientos con los terpenos y el brazo izquierdo como control negativo (50 µL de acetona al 99% en volumen). La sustancia repelente DEET fue utilizada como control positivo en concentración 25% (v/v).

Los bioensayos se realizaron acorde a la metodología propuesta por *The American Society for Testing and Materials* (2000) y el protocolo ASTM-E951-94 (Barnard *et al.*, 2006) con algunas modificaciones. Se seleccionaron 20 hembras de *Ae. aegypti* entre 5-10 días de emergidas, nulíparas y copuladas, las cuales fueron dispuestas en dispositivos de acrílico rectangulares (18 x 4 x 5 cm) (Design 2013, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Bucaramanga, Santander, Colombia, *Figura 19*, Castillo, Stashenko, & Duque, 2017). Cada dispositivo presenta una abertura de 29 mm de diámetro en su extremo inferior, de tal manera que solo una sección del antebrazo del voluntario queda expuesta a los mosquitos.

Cada ensayo se realizó por triplicado empleando voluntarios en días diferentes. Se contabilizaron las picaduras en los periodos 0-2 minutos, 2-15 minutos y 15-60 minutos. Para estimar el porcentaje de protección. Se tuvo en cuenta la ecuación de Phasomkusolsil & Soonwera, 2010 modificada para cada intervalo de tiempo:

$$\% \text{Protección} = \frac{N_c - N_t}{N_c} * 100\%$$

N_c = Número de picaduras en el brazo control; N_t = Número de picaduras en el brazo tratado.

Los metabolitos cuyos valores de porcentajes de protección fueron cercanos a los valores obtenidos con el repelente comercial DEET se emplearon para realizar mezclas en relación 1:1 y evaluar su actividad repelente *in vivo*. Posteriormente, la mezcla o metabolitos con mayor porcentaje de protección *in vivo* durante el periodo de prueba (1 hora) y menor

citotoxicidad *in vitro* se emplearon para la preparación de una formulación. Las sustancias se disolvieron en proporciones de 10% y 15% en polietilenglicol 400 (PEG 400), 10% de agua mili-Q y 65-70% etanol. Se contó el número de picaduras en pruebas *in vivo* en periodos de 15 minutos cada hora hasta presentar la primera picadura en el brazo del tratamiento. Posteriormente se calculó el porcentaje de protección. Para cada formulado el control negativo empleado corresponde a las cantidades descritas de PEG 400, agua mili-Q y etanol.



Figura 19. Dispositivos para ensayos de actividad repelente.

3.5. Pruebas de citotoxicidad

Se empleó la línea celular *Vero* (células normales epiteliales de riñón de mono verde africano), cultivadas en medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) con 7% de suero fetal bovino a pH de 7,2. Las células fueron separadas de las cajas de cultivo utilizando una solución de tripsina-EDTA.

Las células se dispusieron sobre una placa de 96 pozos (1×10^4 células/pozo) e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 durante 24 horas para total adherencia en la placa. Las células en condiciones metabólicas óptimas se trataron con los metabolitos que presentaron los mejores porcentajes de protección en el periodo de prueba de 1 hora a una concentración $200 \mu\text{M}$ durante 24 horas.

Se determinó la viabilidad celular por el método MTT de acuerdo con lo descrito por Mosmann (1983) y Riss *et al.* (2013): se descartó el sobrenadante y se adicionó $200 \mu\text{L}$ de MTT ($500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) y se incubaron durante tres horas. Posteriormente, se retiró la solución de MTT y se adicionó $200 \mu\text{L}$ de dimetil sulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales formados. La lectura de absorbancia se realizó en un lector de microplaca a 570 nm utilizando como blanco DMSO. Las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) formando cristales de formazan solubles en DMSO. Se calculó el valor de CL_{50} comparando la viabilidad celular entre las células tratadas y no tratadas para cada uno de los compuestos evaluados.

3.6. Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk y Lillieford. Cuando estos datos presentaron distribución normal, se les aplicó pruebas de comparación de medias de una vía ANOVA y posteriormente, una prueba Tukey. Si la distribución no fue normal, se aplicaron pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis). Las

comparaciones se consideraron estadísticamente significativas si $p < 0,05$. El software empleado en todos los análisis fue Statistic V11 (Statsoft).

4. Resultados

4.1. Análisis *in silico*: Docking molecular y análisis de toxicidad

Se seleccionaron 20 metabolitos derivados de AEs de plantas con potencial acción repelente reportados en artículos científicos (Gillij *et al.*, 2008; Ríos *et al.*, 2017; Vera *et al.*, 2014) para analizar su interacción con la proteína odorante 3K1E (*Tabla 1*). Cuatro metabolitos presentaron la mejor interacción, representada por valores bajos de energía libre ΔG (kcal/mol): Nerolidol (-8.252 kcal/mol), α -bisabolol (-8,184 kcal/mol), acetato de geranilo (-7,975 kcal/mol) y nerol (-7,402 kcal/mol). Cuando se observa la cantidad de posibles interacciones generadas por puentes de hidrógeno de cada interacción proteína-metabolito, se muestra una correspondencia entre menores valores de energía libre ΔG y ausencia de este tipo de enlaces, indicando que posiblemente se den interacciones de tipo hidrofóbico y de Van der Waals.

Se verificó la interacción de los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol, nerol y de los compuestos de referencia (DEET – IR3535) con la proteína 3K1E. Las imágenes obtenidas por el visualizador UCSF Chimera muestran interacciones en el sitio de unión o binding pocket con los aminoácidos Arg23, Tyr54 e Ile125 (*Figura 20*).

Al comparar los valores correspondientes a los parámetros de Lipinski, los valores del coeficiente de partición LogP mostraron valores superiores al valor de referencia DEET

(2,521) para los metabolitos evaluados. Para el logaritmo de la solubilidad en soluciones acuosas LogS, los valores de los metabolitos fueron menores al valor de referencia DEET (-2,203) e IR3535 (-1,402). Cuando se verificó el tipo de toxicidad de las sustancias, los metabolitos no mostraron riesgos de tipo mutagénico, tumorigénico o reproductivo (*Tabla 2*).

Tabla 1.

Valores de energía libre de interacción ΔG (kcal/mol) y número de puentes de hidrogeno de los metabolitos secundarios y las sustancias repelentes DEET e IR3535 con la proteína odorante 3K1E.

	Molécula	ΔG (kcal/mol)	Número de puentes de hidrógeno
Control	IR3535	-8,233	24
	DEET	-7,507	10
Positivo	Nerolidol	-8,252	69
	α -bisabolol	-8,184	33
	Acetato de geranilo	-7,975	5
	Nerol	-7,402	116
	Citronelal	-7,294	14
	Geraniol	-7,269	45
	Eucaliptol	-7,242	0
	α -terpineol	-7,213	104
	Linalool	-7,207	49
	(-)-(<i>S</i>)-pineno	-7,202	0
	(-)-guaiol	-7,095	293
	(-)-(<i>R</i>)-carvona	-7,081	23
	α -felandreno	-7,069	0
	(+)-(<i>S</i>)-carvona	-7,041	19
	(-)-(<i>S</i>)-limoneno	-7,040	0
	(+)-(<i>R</i>)-limoneno	-7,039	0
	Estragol	-6,917	113
	(-)-óxido de cariofileno	-6,920	0
	(-)- <i>trans</i> -cariofileno	-6,707	0
	α -humuleno	-6,524	0

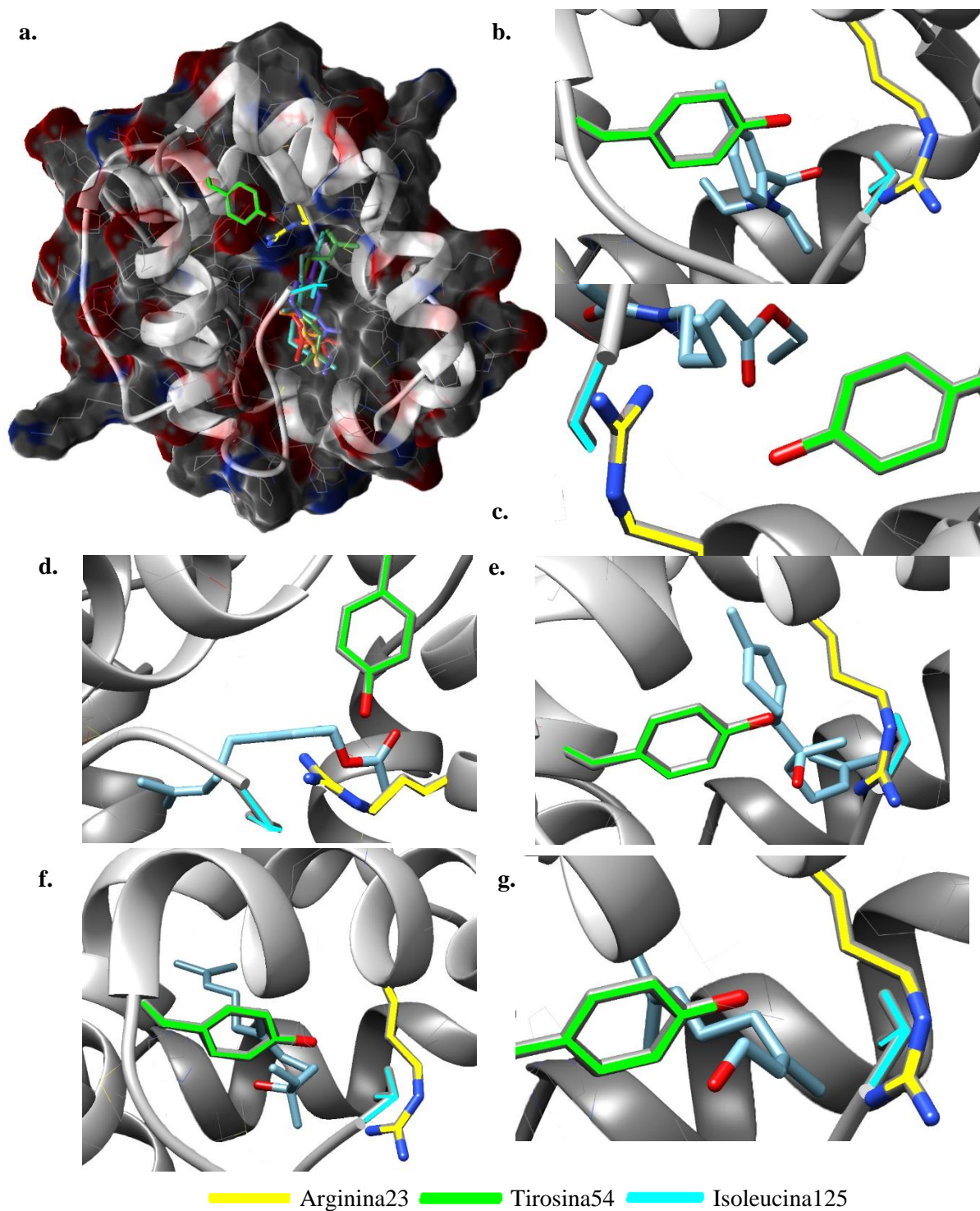


Figura 20. a) Posicionamiento entre la proteína 3K1E-metabolitos b) DEET c) IR3535 d) Acetato de geranilo e) α -bisabolol f) Nerolidol g) Nerol.

Tabla 2.

Valores de los parámetros de Lipinski para los metabolitos secundarios nerolidol, α -bisabolol, acetato de geranilo, nerol, y las sustancias repelentes DEET e IR3535. Perfiles de riesgo: 1. Mutagénico 2. Tumorogénico 3. Reproductivo.

Molécula	Parámetros de Lipinski			Perfil de riesgo		
	LogP	LogS	Peso molecular (g/mol)	1	2	3
IR3535	1,655	-1,402	222,86	NO	NO	NO
DEET	2,521	-2,203	191,27	SI	SI	SI
Acetato de geranilo	3,970	-2,299	196,29	NO	NO	NO
Nerol	3,485	-1,889	154,25	NO	NO	NO
Nerolidol	5,403	-3,125	222,37	NO	NO	NO
α -bisabolol	4,471	-3,162	222,37	NO	NO	NO

4.2. Bioensayos de actividad repelente *in vivo*

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos por las herramientas bioinformáticas, se realizaron pruebas *in vivo* de repelencia frente a la picadura de hembras de *Ae. aegypti* para determinar porcentajes de protección y perdurabilidad. Los mayores porcentajes de protección se obtuvieron en el intervalo de tiempo de 0-2 min (100%) a concentraciones de 10 y 25% (v/v). Para el intervalo de tiempo de 1 hora, se obtuvieron porcentajes de protección mayores a 90% con los terpenos acetato de geranilo, nerolidol y α -bisabolol a concentraciones del 10% y 25% (v/v). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los metabolitos evaluados y el control positivo (DEET) ($p > 0,05$ Tukey) (Tabla 3).

En todos los casos los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol y nerol mostraron un porcentaje de protección superior al 70% en concentración 10% y 25% (v/v) para cada uno de los tiempos de protección (0-2 min, 2-15 min y 15-60 min). Se

encontraron diferencias estadísticamente significativas frente al control (acetona) ($p < 0,05$ Tukey) en todos los periodos de prueba (0-2 min, 2-15 min, 15-60 min) (*Figura 21*).

Los cuatro metabolitos en concentración 0,1% (v/v) presentaron mayor cantidad de picaduras desde los primeros minutos de prueba (0-2 min). El metabolito nerol presentó el mayor número de picaduras durante el periodo 15-60 min en las tres concentraciones, mientras que el nerolidol no presentó ninguna picadura en concentraciones 10% y 25% (v/v) (*Figura 21*). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los cuatro metabolitos en cada uno de los tiempos evaluados en comparación con el control (acetona) ($p < 0,05$ Tukey). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los cuatro metabolitos en cada uno de los tiempos evaluados respecto al DEET ($p > 0,05$ Tukey) (*Figura 21*).

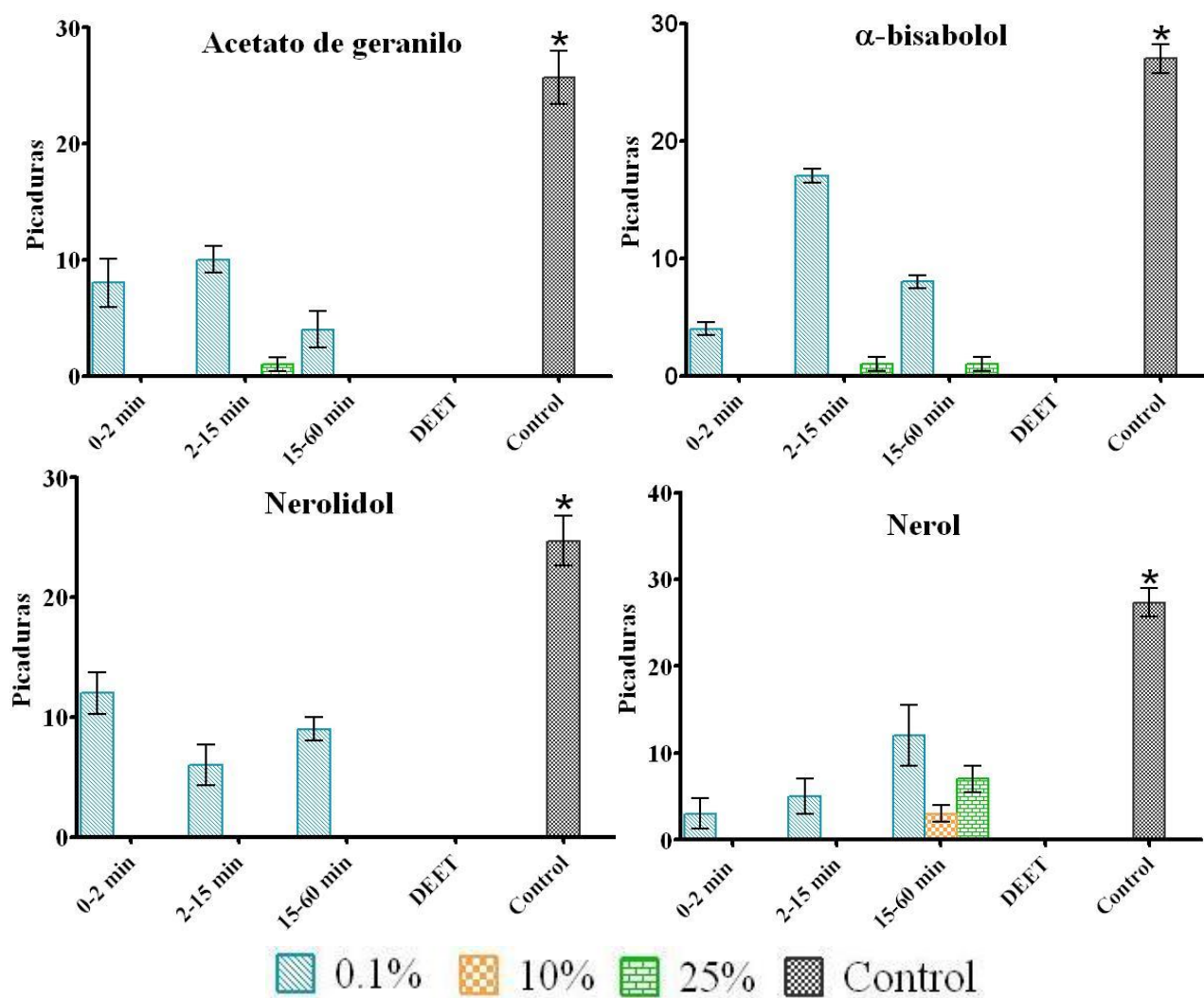


Figura 21. Comparación de los tiempos de protección para cada uno de los terpenos evaluados (acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol y nerol) a diferentes tiempos de exposición (0-2 min, 2-15 min, 15-60 min). (*) Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el control (acetona) y las picaduras presentes para cada tiempo de exposición ($p < 0,05$ Tukey).

Tabla 3.

Porcentaje de protección (% \pm SD) de los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol, nerol y α -bisabolol en concentración 0,1%, 10% y 25% (v/v) durante los periodos de prueba 0-2 min, 2-15 min, 15-60 min. Control positivo DEET (25% v/v).

Porcentaje de protección (% \pm SD)				
Concentración (%v/v)	Molécula	Intervalos de tiempo (min)		
		0-2 min	2-15 min	15-60 min
25%	Acetato de geranilo	100 \pm 0,0	96 \pm 0,4	97 \pm 0,3
	α -bisabolol	100 \pm 0,0	90 \pm 0,4	91 \pm 0,4
	Nerolidol	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
	Nerol	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	72 \pm 1,4
10%	Acetato de geranilo	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
	α -bisabolol	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
	Nerolidol	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
	Nerol	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	90 \pm 0,7
0.1%	Acetato de geranilo	0,0 \pm 2,1	0,0 \pm 1,6	0,0 \pm 1,7
	α -bisabolol	56 \pm 0,6	12 \pm 2,4	3 \pm 2,0
	Nerolidol	0,0 \pm 1,7	0,0 \pm 1,9	0,0 \pm 1,6
	Nerol	57 \pm 1,7	58 \pm 1,8	28 \pm 2,6
Control positivo (25%)	DEET	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0

Se evaluó la efectividad repelente de cada terpeno mediante la comparación del número de picaduras registradas durante el intervalo de tiempo de 15-60 min en cada una de las concentraciones evaluadas. Al usar la concentración de 0.1% (v/v) se observó el mayor número de picaduras en todos los metabolitos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada sustancia y el control (acetona) ($p > 0,05$ Tukey). A las concentraciones de 10% y 25% (v/v) los metabolitos α -bisabolol, nerolidol y acetato de geranilo presentaron diferencias estadísticamente significativas con su respectivo control (acetona) ($p < 0,05$ Tukey). El único metabolito que no presentó diferencias estadísticas significativas frente al control (acetona) fue nerol ($p > 0,05$ Tukey) al perder efectividad durante los últimos minutos de prueba (*Figura 22*). Los metabolitos acetato de

geranilo, nerolidol y α -bisabolol en concentración 10% y 25% (v/v) no presentaron diferencias estadísticamente significativas frente al DEET ($p > 0.05$ Tukey).

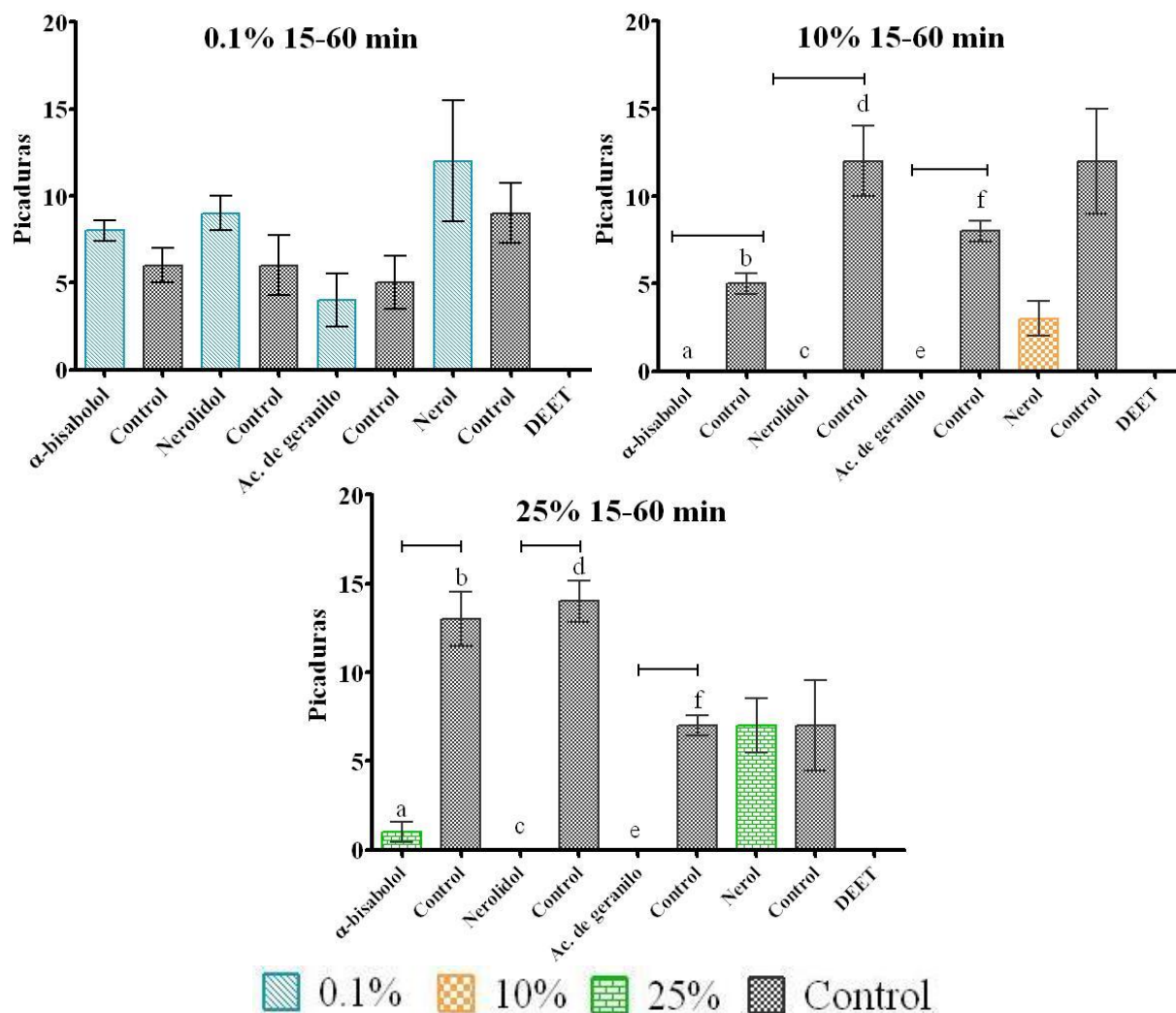


Figura 22. Número de picaduras registradas en el intervalo de tiempo de 15 a 60 minutos a las concentraciones de 0,1, 10 y 25% (v/v) para cada metabolito evaluado (α -bisabolol, nerolidol, acetato de geranilo, nerol) ^{(a,b), (c,d), (e,f)} Diferencias estadísticamente significativas entre el número de picaduras para cada tratamiento y su respectivo control (acetona) ($p < 0,05$ Tukey).

4.2.1. Evaluación de la mezcla de metabolitos: Se elaboraron cuatro mezclas con los metabolitos que presentaron mejores porcentajes de protección *in vivo* en proporciones 1:1 (Tabla 4).

Tabla 4.

Composición de las mezclas propuestas

Mezcla	Composición
Mezcla 1	Nerolidol, acetato de geranilo y α -bisabolol
Mezcla 2	Acetato de geranilo y nerolidol
Mezcla 3	Nerolidol y α -bisabolol
Mezcla 4	Acetato de geranilo y α -bisabolol

Se obtuvo un porcentaje de protección del 100% para las mezclas uno y dos en concentración 5% y 10% sin presentar picaduras durante el periodo de prueba de 1 hora. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control (acetona) ($p < 0,05$ Tukey) en los periodos 0-2 min, 2-15 min, 15-60 min. Las mezclas tres y cuatro en concentración 5% y 10% (v/v) respectivamente, presentaron porcentajes de protección mayores a 81% en los periodos de prueba (0-2 min, 2-15 min, 15-60 min) (Tabla 5). La mezcla cuatro no presentó diferencias estadísticamente significativas frente al control (acetona) ($p > 0,05$ Tukey). Las mezclas uno, dos y tres en concentración 5% y 10% (v/v), no presentaron diferencias estadísticamente significativas frente al DEET ($p > 0,05$ Tukey) (Figura 23).

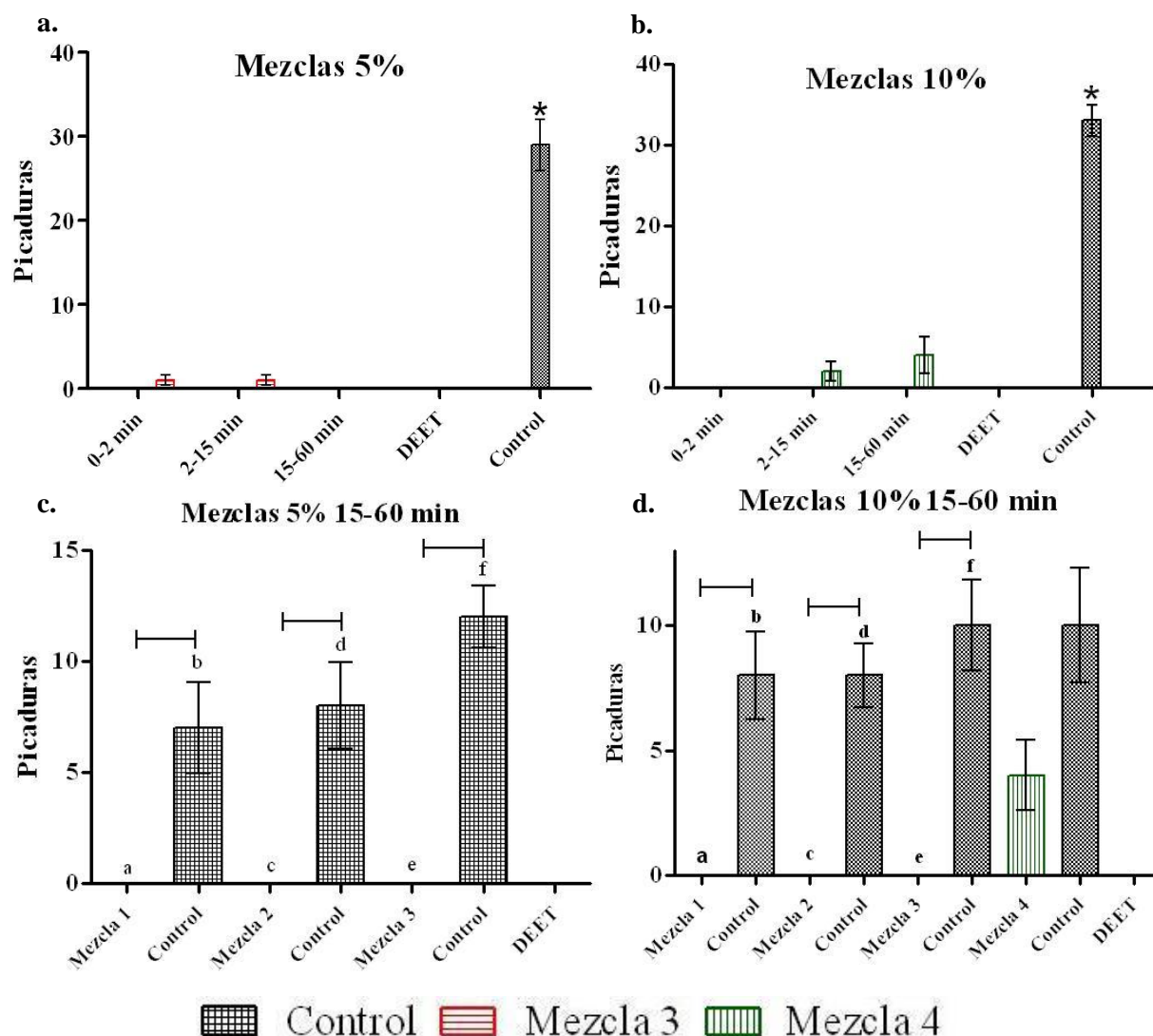


Figura 23. Mezclas en concentración 5% y 10% (v/v). **a.** y **b.** Picaduras registradas para las mezclas en los tiempos 0-2 min, 2-15 min, 15-60 min. (*) Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento y el control (acetona) ($p < 0,05$ Tukey). **c.** y **d.** Picaduras registradas para las mezclas en el intervalo de tiempo 15-60 min, (a,b), (c,d), (e,f) Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las picaduras presentes para cada tratamiento y su respectivo control (acetona) ($p < 0,05$ Tukey).

Tabla 5.

Porcentaje de protección (% \pm SD) de las mezclas de los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol, nerol y α -bisabolol en concentración 5% y 10% (v/v) durante los periodos de prueba 0-2 min, 2-15 min, 15-60 min. Mezcla uno: Nerolidol, acetato de geranilo y α -bisabolol; mezcla dos: Acetato de geranilo y nerolidol; mezcla tres: Nerolidol y α -bisabolol y mezcla cuatro: Acetato de geranilo y α -bisabolol. Control positivo DEET (25% v/v).

Porcentaje de protección (% \pm SD)				
Concentración (%v/v)	Mezcla	Intervalos de tiempo (min)		
		0-2 min	2-15 min	15-60 min
10% cada metabolito	Mezcla 1	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
	Mezcla 2	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
	Mezcla 3	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
	Mezcla 4	100 \pm 0,0	90 \pm 0,8	81 \pm 1,4
5% cada metabolito	Mezcla 1	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
	Mezcla 2	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
	Mezcla 3	94 \pm 0,4	90 \pm 0,5	86 \pm 0,6
Control positivo (25%)	DEET	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0

4.2.2. Pruebas de perdurabilidad: Se elaboraron dos formulados con la mezcla que presentó mayor porcentaje de repelencia *in vivo* y menor toxicidad *in vitro*. Formulado 1: Acetato de geranilo 5% (v/v), nerolidol 5% (v/v), PEG 400 10%, agua mili-Q 10% y etanol 70%. Formulado 2: Acetato de geranilo 5%, nerolidol 5%, PEG 400 15% y etanol 65%. Para el formulado 1 y 2 se obtuvo un porcentaje de protección del 100% durante un periodo máximo de 2 y 3 horas, respectivamente. El control positivo (DEET 25% v/v) presentó un periodo máximo de protección de 8 horas (Tabla 6). Al comparar estadísticamente los resultados de los formulados frente a los controles, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en los periodos que obtuvieron un porcentaje de

protección del 100% (2 y 3 horas) ($p > 0,05$ Tukey) con el control positivo (DEET), pero si frente al control negativo (PEG 400, agua mili-Q y etanol) ($p < 0,05$ Tukey).

Tabla 6.

Porcentaje de protección en pruebas de perdurabilidad de los formulados 1 y 2. Control positivo (DEET), control negativo (PEG 400, agua mili-Q y etanol).

Sustancia	Porcentaje de protección (% \pm SD)	Control (% \pm SD)	Máximo periodo de protección (horas)
Formulado 1	100 \pm 0,0	0,0 \pm 1,2	2
Formulado 2	100 \pm 0,0	0,0 \pm 1,4	3
DEET	100 \pm 0,0	0,0 \pm 2,1	8

4.3. Pruebas de citotoxicidad

Para confirmar la baja toxicidad de los terpenos acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol y mezclas, se realizaron ensayos de viabilidad celular *in vitro*. La concentración utilizada (200 μ M) correspondió a la concentración máxima de referencia que pueda tener efecto citotóxico en células normales *Vero*. Los metabolitos acetato de geranilo y nerolidol presentaron una concentración letal (CL_{50}) mayor a 200 μ M. El metabolito α -bisabolol presentó una CL_{50} de 138 μ M siendo el más citotóxico frente a la línea celular *Vero*. La mezcla de los metabolitos acetato de geranilo y nerolidol no presentó citotoxicidad con un valor de CL_{50} mayor a 200 μ M de cada metabolito (*Tabla 7*).

Tabla 7.

CL₅₀ de los metabolitos Acetato de geranilo, nerolidol y α -bisabolol en la línea celular Vero.

Terpeno	CL₅₀ (μM)
Acetato de geranilo	>200
Nerolidol	>200
α -bisabolol	138
Acetato de geranilo + Nerolidol	>200

5. Discusión

5.1. Análisis *in silico*: Docking molecular y análisis de citotoxicidad

Se empleó el parámetro fisicoquímico de energía libre de Gibbs ΔG para analizar la capacidad de unión o afinidad de metabolitos con la proteína odorante 3K1E. Menores valores de energía libre indican una mayor interacción proteína-metabolito y, por tanto, mayor efectividad en el transporte de moléculas a través de la linfa sensilar (Bohbot & Pitts, 2015; Northey *et al.*, 2016). El valor de energía libre calculado se relaciona con el tipo de interacciones presentes (Devillers *et al.*, 2014; Gopal & Kannabiran, 2013), las interacciones de tipo enlace de hidrógeno contribuyen al valor de energía libre en mayor proporción cuando las moléculas de los metabolitos tienen grupos funcionales hidrofílicos como hidroxilo y carbonilo. Sin embargo, estructuralmente los terpenos, al ser derivados de lípidos de membrana, poseen cadenas de hidrocarburos cíclicos o acíclicos con capacidad de formar interacciones de tipo hidrofóbico y de Van der Waals. Además, algunos terpenos con enlaces dobles conjugados o anillos aromáticos pueden formar interacciones a través de nubes electrónicas tipo π con las cadenas laterales de los aminoácidos en la proteína 3K1E (Bohbot & Pitts, 2015; Leal, 2013).

La estructura química de los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol, nerol y las sustancias repelentes DEET e IR3535 tienen propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas que hacen difícil su solubilización a través de medios hidrofílicos como la linfa sensilar, impidiendo su movimiento a través de ella (Pelosi, Iovinella, Felicioli, & Dani, 2014). La proteína 3K1E posee una superficie de energía potencial hidrofílica debido a la presencia de aminoácidos polares y cargados (positiva o negativamente) con átomos de oxígeno y nitrógeno en sus cadenas laterales (*Figura 20*) (Leite *et al.*, 2009). Esta característica permite que su interacción con compuestos poco solubles sea más efectiva, logrando su solvatación en la linfa sensilar y facilitando su posterior transporte (Leal & Leal, 2015; Yin *et al.*, 2015).

Se confirmaron las propiedades hidrofóbicas y baja solubilidad de los metabolitos y sustancias repelentes (DEET e IR3535) en medios acuosos como la linfa sensilar a través de los valores de LogP y LogS (*Tabla 2*). Además, se verificó la interacción efectiva al sitio de unión de la proteína odorante 3K1E (*Figura 20*) por medio de los valores de energía libre de Gibb's (ΔG) y el visualizador UCSF Chimera. Las características anteriores permitieron el transporte efectivo de moléculas a través del sistema olfativo del mosquito lo que disminuyó la capacidad sensorial y se evitaron picaduras, como se observó en las pruebas *in vivo*.

Los resultados obtenidos en las pruebas *in vivo* comprobaron que los metabolitos con mayor afinidad (menor ΔG) con la proteína 3K1E obtuvieron mejores valores en el porcentaje de protección durante una hora en las concentraciones 10% y 25% (v/v). Los compuestos que presentaron menores valores de energía libre se posicionan en el sitio de unión o binding pocket de la proteína 3K1E, cuya función es atrapar e interactuar con

compuestos orgánicos volátiles (Gopal & Kannabiran, 2013; Northey *et al.*, 2016). La ubicación de los metabolitos en el binding pocket se asoció a los aminoácidos Arg23, Tyr54 e Ile125, previamente reportados como posibles sitios de unión de las sustancias repelentes comerciales DEET e IR3535. Este hecho confirma que los cuatro terpenos evaluados presentan una interacción eficaz con la proteína, con posible actividad biológica (Oliferenko *et al.*, 2013).

Los terpenos al ser derivados de moléculas precursoras de lípidos presentan dificultad para atravesar membranas celulares (Andrade-Ochoa *et al.*, 2018; Ludwiczuk, Skalicka-Woźniak, & Georgiev, 2016; Pandit *et al.*, 2006). Se analizaron las propiedades fisicoquímicas de LogP y LogS (*Tabla 2*), a mayor valor de LogP y menor valor de LogS indica afinidad de los metabolitos hacia lípidos de membrana. Lo anterior se confirmó ya que los terpenos presentaron valores de LogP mayores a 2,521 y valores de LogS menores a -1,402 respecto al DEET e IR3535 (*Tabla 2*). Este hecho comprobó que los metabolitos presentan una menor capacidad de permeación a través de membranas celulares en comparación con las sustancias repelentes DEET e IR3535. Por otro lado, las moléculas repelentes (DEET e IR3535) poseen mayor cantidad de heteroátomos como nitrógeno y oxígeno en su estructura, facilitando su entrada a través de membranas mediante mecanismos como transporte pasivo y difusión facilitada (Wang & Gu, 2007; Zhang, Grice, Wang, & Roberts, 2009).

Con relación a los riesgos citotóxicos de los cuatro metabolitos, no se han encontrado reportes de riesgos mutagénicos, tumorigénicos y reproductivos. Aunque no se han demostrado completamente este tipo de efectos en los repelentes comerciales y se desconoce si efectos adversos pueden presentarse a largo plazo, algunos productos comerciales advierten su uso en mujeres embarazadas y niños entre 0-2 años. Vale la pena

resaltar que el DEET (repelente de mayor uso comercial) presentó todos los riesgos evaluados *in silico* (Cockcroft *et al.*, 1998; Department of Health Toxicology Unit, 2002; Thavara *et al.*, 2001).

Diferentes estudios computacionales han sido verificados a través de experimentos *in vivo* e *in vitro* para relacionar la actividad biológica de moléculas en *Ae. aegypti* y otras especies de mosquitos (Andrade-Ochoa *et al.*, 2018; Natarajan, Basak, Mills, Kraker, & Hawkins, 2008).

En este estudio, los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol y α -bisabolol, presentaron interacción en el sitio de unión de la proteína 3K1E; además, evidenciaron efecto repelente comparable con DEET, lo cual verificó su actividad biológica. Algunos de los metabolitos analizados por docking molecular tales como citronelal, limoneno y carvona, están presentes en algunos AEs como componentes mayoritarios y han mostrado porcentajes de repelencia cercanos al 100% (Gillij *et al.*, 2008; Hsu, Yen, & Wang, 2013) corroborando la veracidad de las herramientas computacionales.

5.2. Bioensayos de actividad repelente

Los AEs están compuestos por una gran cantidad de metabolitos que pueden ejercer un efecto sinérgico (incremento de la efectividad) o antagónico (disminución de la efectividad) al ser evaluados frente a *Ae. aegypti*. Diferentes estudios realizados con AEs que contienen múltiples proporciones de los metabolitos estudiados muestran pérdida de efectividad con el paso del tiempo (Gillij *et al.*, 2008; Gleiser *et al.*, 2011). Al respecto, Castillo *et al.*, 2017 reportan una baja actividad repelente de *Swinglea glutinosa* (nerolidol 19%), *Cymbopogon*

citratus (acetato de geranilo 1%) y *Cymbopogon flexosus* (acetato de geranilo 10%). Sin embargo, la evaluación individual del efecto repelente de terpenos puede mejorar los tiempos de protección contra la picadura de mosquitos, tal como se evidencia en los resultados aquí presentados (*Figuras 21-23*).

Otros autores han reportado la relación entre estructura y actividad biológica de los terpenos (Oliferenko *et al.*, 2013; Paluch, Bartholomay, & Coats, 2010), estableciendo que las propiedades presión de vapor y peso molecular contribuyen en su persistencia en la piel a través del tiempo y que estas influyen en el bloqueo de la capacidad olfativa del mosquito. Los valores de protección observados en la concentración 0,1% (v/v) en los diferentes tiempos de prueba pueden estar relacionados con la cantidad mínima necesaria de metabolito para inhibir el sistema olfativo del mosquito, perdiendo efectividad inclusive en los primeros minutos (Northey *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2015). Además, podría explicar la pérdida de efectividad del nerol en concentraciones de 10% y 25% (v/v) durante los últimos minutos de prueba (15-60 min). Los monoterpenos tienen mayor presión de vapor y menor peso molecular que los sesquiterpenos; por tanto, podrían tener menor efectividad como repelente a través del tiempo pues se volatilizan fácilmente (Gillij *et al.*, 2008; Paluch *et al.*, 2010). Esto fue confirmado debido a que el sesquiterpeno nerolidol presentó un porcentaje de protección del 100% durante el periodo de prueba (1 hora) en concentraciones 10% y 25% (v/v), mientras que el monoterpeno nerol perdió efectividad como repelente y se volatilizó en los últimos minutos (15-60 min) (*Tabla 5*).

En los metabolitos como nerolidol y α -bisabolol, la presencia de átomos de oxígeno en grupos funcionales hidroxilo, pueden jugar un rol importante en la actividad biológica al formar interacciones intermoleculares como puentes de hidrógeno, disminuyendo la volatilización (Wang *et al.*, 2008) y aumentando su perdurabilidad. Este hecho se

evidenció especialmente a concentraciones de 10% y 25% (v/v) de los metabolitos. Muchos estudios en donde se evalúa el efecto repelente de AEs contra géneros de mosquitos como *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* (Amer & Mehlhorn, 2006; Costa, Naspi, Lucia, Masuh, & Barrera, 2017; Michaelakis *et al.*, 2014) afirman que compuestos con ausencia de grupos funcionales oxigenados, impiden la formación de interacciones como puentes de hidrógeno entre moléculas. Esta característica causa la rápida volatilización de los componentes de los AEs, de manera que la combinación de diferentes tipos de terpenos podría causar la disminución de la acción repelente, como se observó en las mezclas tres y cuatro en concentración 5% y 10% (v/v), respectivamente (*Tabla 5*).

Las moléculas vehículo como PEG 400 son materiales con potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica y alimenticia. Estos vehículos proporcionan disminución de la difusión a través de la piel y liberación controlada de moléculas volátiles mediante interacciones vehículo-molécula activa de tipo hidrofóbicas e hidrofílicas (Nogueira Barradas, Perdiz Senna, Ricci Júnior, & Regina Elias Mansur, 2016). Al respecto, varios estudios han demostrado el incremento del periodo de protección y la disminución de la permeabilidad empleando vehículos que eviten la rápida volatilización de moléculas con efecto repelente (Balaji *et al.*, 2017; Solomon, Sahle, Gebre-Mariam, Asres, & Neubert, 2012). De esta manera, y considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, es posible emplear una menor concentración de moléculas activas que evidencien un efecto similar al DEET. Por ejemplo, el uso de formulados con moléculas derivadas de AEs con PEG 400 incrementó el periodo de protección hasta 3 horas (*Tabla 6*), con una menor concentración y menor toxicidad que el DEET.

5.3. Pruebas de citotoxicidad

Investigaciones realizadas con AEs y sus componentes mayoritarios han demostrado baja citotoxicidad en animales y células normales, fibroblastos, células *Vero* y hepatocitos, incluso cuando sus propiedades químicas estructurales facilitan la permeabilidad a través de membranas celulares (Costa *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2010).

Los ensayos de viabilidad celular MTT realizados en esta investigación, mostraron baja citotoxicidad de los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol y su mezcla en la línea celular *Vero*. Estos experimentos permitieron identificar metabolitos sin efectos tóxicos para ser utilizados en formulaciones. La mezcla de los metabolitos acetato de geranilo y nerolidol no evidenció citotoxicidad (*Tabla 7*) y presentó un periodo de protección máximo de 3 horas (*Tabla 6*), este hecho comprueba que la mezcla es un potencial candidato como reemplazo al DEET en formulaciones de repelentes comerciales.

Los metabolitos nerolidol y α -bisabolol, empleados en industria alimenticia y cosmética, no han mostrado efectos adversos en estudios toxicológicos y dermatológicos sobre animales y personas (Belsito *et al.*, 2012), tal y como se corroboró en el presente estudio (*Tabla 7*). Estudios enfocados en determinar la toxicidad del sesquiterpeno α -bisabolol y algunos AEs que lo contienen, muestran valores de concentración inhibitoria (CI₅₀) menores a 42 μ M en células epiteliales humanas bajo el método de viabilidad celular MTT (Van Zyl, Seatlholo, Van Vuuren, & Viljoen, 2006). Sin embargo, los datos obtenidos por medio de ensayos de citotoxicidad *in vitro* dependen del método de viabilidad celular y la línea celular usada, ya que se ha confirmado inocuidad de AEs con α -bisabolol como compuesto mayoritario (Kamatou & Viljoen, 2010). Los metabolitos acetato de geranilo,

nerolidol y α -bisabolol obtuvieron baja capacidad citotóxica mediante los parámetros de Lipinski, corroborada por el valor de CL_{50} obtenida *in vitro* con cultivo de células *Vero*. Por lo tanto, los hace potenciales candidatos para ser empleados en formulaciones de repelentes.

6. Conclusiones

Los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol, nerol y las sustancias sintéticas DEET e IR3535 interaccionan con los aminoácidos Arg23, Tyr54 y Ile125 que pertenecen al sitio de unión de la proteína odorante 3K1E.

Se demostró mediante análisis *in silico* que el valor de energía libre de interacción ΔG tiene relación con la afinidad de la proteína odorante 3K1E, confirmado mediante pruebas *in vivo*.

Mediante los parámetros de Lipinski (LogP, LogS y perfiles de riesgo) se demostró que los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol, nerol y α -bisabolol estudiados tienen menor capacidad de permeabilidad, a través de membranas celulares, que las sustancias sintéticas DEET e IR3535.

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* demostraron que los terpenos acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol y sus mezclas presentan baja toxicidad frente a células normales con valores de CL_{50} mayores a 138 μM en la línea celular *Vero*.

En este estudio, los metabolitos acetato de geranilo, nerolidol, α -bisabolol y sus mezclas, presentaron porcentajes de protección frente a la picadura de *Ae. aegypti* comparables con los periodos de protección del DEET.

La mezcla de metabolitos compuesta por acetato de geranilo 5% (v/v) y nerolidol 5% (v/v) en formulación con PEG 400 al 15% presentó un máximo periodo de protección (durante 3 horas) comparable con DEET y sin efectos tóxicos.

Los periodos de protección de las formulaciones mostraron valores similares al DEET al emplear una menor concentración de producto. Por lo tanto, los metabolitos mencionados son potenciales candidatos para formulaciones de repelentes comerciales.

7. Recomendaciones

Estudios posteriores podrían mejorar la efectividad como repelente de estas sustancias derivadas de AEs empleando vehículos biodegradables y biocompatibles como liposomas y nanoemulsiones. Esto permitiría controlar la liberación de moléculas con efecto repelente al disminuir la volatilización. Además, se podría disminuir la permeabilidad a través de la piel con el fin de evitar efectos adversos a largo plazo como irritabilidad cutánea y toxicidad.

Referencias bibliográficas

- 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>
- Amer, A., & Mehlhorn, H. (2006). Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitology Research*, 99(4), 478–490. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0184-1>
- Andersson, K. (2010). *Mosquito Repellency of Essential Oils Derived from Lao Plants* (Tesis de pregrado). Uppsala Universitet, Uppsala, Suecia.
- Andrade-Ochoa, S., Correa-Basurto, J., Rodríguez-Valdez, L. M., Sánchez-Torres, L. E., Noguera-Torres, B., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). *In vitro* and *in silico* studies of terpenes, terpenoids and related compounds with larvicidal and pupaecidal activity against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0425-2>
- Balaji, A. P. B., Ashu, A., Manigandan, S., Sastry, T. P., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2017). Polymeric nanoencapsulation of insect repellent: Evaluation of its bioefficacy on *Culex quinquefasciatus* mosquito population and effective impregnation onto cotton fabrics for insect repellent clothing polymeric nanoencapsulation of insect repellent. *Journal of King Saud University - Science*, 29(4), 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.12.005>
- Balta, R. (1997). *Guía práctica para la identificación de Aedes aegypti*. Lima, Perú, Red Nacional de Laboratorios de Salud.
- Bar, A., & Andrew, J. (2013). Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Larvae. *Annual Review & Research in Biology*, 3(1), 52-69.

- Barnard, D., Bernier, U., Xue, R., & Debboun, M. (2006). *Standard Methods for Testing Mosquito Repellents*. <https://doi.org/10.1201/9781420006650.ch5>
- Barnard, D. R. (2005). Biological assay methods for mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(4 Suppl), 12–16. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2005\)21\[12:BAMFMR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2005)21[12:BAMFMR]2.0.CO;2)
- Belsito, D., Bickers, D., Bruze, M., Calow, P., Dagli, M. L., Dekant, W., ... Sipes, I. G. (2012). A toxicologic and dermatologic assessment of cyclopentanones and cyclopentenones when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 50(Suppl 3), 1-71. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.019>
- Benton, R. (2006). On the ORigin of smell: Odorant receptors in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(14), 1579–1585. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6130-7>
- Bezerra-Silva, P. C., Dutra, K. A., Santos, G. K. N., Silva, R. C. S., Iulek, J., Milet-Pinheiro, P., & Navarro, D. M. A. F. (2016). Evaluation of the activity of the essential oil from an ornamental flower against *Aedes aegypti*: Electrophysiology, molecular dynamics and behavioral assays. *PLoS ONE*, 11(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150008>
- Bohbot, J. D., & Pitts, R. J. (2015). The narrowing olfactory landscape of insect odorant receptors. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00039>
- Castillo, R. M., Stashenko, E., & Duque, J. E. (2017). Insecticidal and Repellent Activity of Several Plant-Derived Essential Oils Against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 33(1), 25–35. <https://doi.org/10.2987/16-6585.1>
- Centers for Disease Control and Prevention CDC. (2012). Mosquito Life cycle *Aedes aegypti*. *National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Disease*, 1–2. Recuperado de:

<https://www.cdc.gov/dengue/resources/factSheets/MosquitoLifecycleFINAL.pdf>

Centers for Disease Control and Prevention CDC. (2016). Surveillance and Control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*, 1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004043>

Cisak, E., Wójcik-Fatla, A., Zając, V., & Dutkiewicz, J. (2012). Repellents and acaricides as personal protection measures in the prevention of tick-borne diseases. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 19(4), 625–630. <https://doi.org/23311778>

Cockcroft, A., Cosgrove, J. B., & Wood, R. J. (1998). Comparative repellency of commercial formulations of DEET, permethrin and citronellal against the mosquito *Aedes aegypti*, using a collagen membrane technique compared with human arm tests. *Medical and Veterinary Entomology*, 12(3), 289–294. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00121.x>

Colón-González, F. J., Peres, C. A., Steiner São Bernardo, C., Hunter, P. R., & Lake, I. R. (2017). After the epidemic: Zika virus projections for Latin America and the Caribbean. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006007>

Costa, A. A., Naspi, C. V., Lucia, A., Masuh, H. M., & Barrera, R. (2017). Repellent and Larvicidal Activity of the Essential Oil From *Eucalyptus nitens* Against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 54(3), 670–676. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw222>

Department of Health Toxicology Unit. (2002). *Review of the Toxicology Literature for the Topical Insect Repellent Diethyl-m-toluamide (DEET)*. Recuperado de <https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/dhreviewdeetno02.pdf>

Devillers, J., Lagneau, C., Lattes, A., Garrigues, J. C., Clémenté, M. M., & Yébakima, A.

- (2014). *In silico* models for predicting vector control chemicals targeting *Aedes aegypti*. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 25(10), 805–835. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2014.958291>
- Diaz, J. H. (2016). Chemical and plant-based insect repellents: Efficacy, safety, and toxicity. *Wilderness and Environmental Medicine*, 27(1), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2015.11.007>
- Dragicevic, N., & Maibach, H. I. (2015). *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: Modification of the stratum corneum*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47039-8>
- Farnesi, L. C., Menna-Barreto, R. F. S., Martins, A. J., Valle, D., & Rezende, G. L. (2015). Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *Journal of Insect Physiology*, 83, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.10.006>
- Faulde, M. K., Uedelhoven, W. M., & Robbins, R. G. (2003). Contact toxicity and residual activity of different permethrin-based fabric impregnation methods for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), and *Lepisma saccharina* (Thysanura: Lepismatidae). *Journal of Medical Entomology*, 40(6), 935–941. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.6.935>
- Faulde, M., & Uedelhoven, W. (2006). A new clothing impregnation method for personal protection against ticks and biting insects. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(Suppl 1), 225–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.008>
- Gillij, Y. G., Gleiser, R. M., & Zygadlo, J. A. (2008). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology*, 99(7), 2507–2515. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.066>

- Gleiser, R. M., Bonino, M. A., & Zygadlo, J. A. (2011). Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, *108*(1), 69–78. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2042-4>
- Gopal, J. V., & Kannabiran, K. (2013). Studies on interaction of insect repellent compounds with odorant binding receptor proteins by *in silico* molecular docking approach. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, *5*(4), 280–285. <https://doi.org/10.1007/s12539-013-0152-2>
- Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*, *39*(Suppl 2), 270–277. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr366>
- Guo, H., & Smith, D. P. (2017). Odorant receptor desensitization in insects. *Journal of Experimental Neuroscience*, *11*, 1–5. <https://doi.org/10.1177/1179069517748600>
- Hsu, W. S., Yen, J. H., & Wang, Y. S. (2013). Formulas of components of citronella oil against mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *48*(11), 1014–1019. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.816613>
- Jordan, R. A., Schulze, T. L., & Dolan, M. C. (2012). Efficacy of Plant-Derived and Synthetic Compounds on Clothing as Repellents Against *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, *49*(1), 101–106. <https://doi.org/10.1603/ME10241>
- Kamatou, G. P. P., & Viljoen, A. M. (2010). A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *87*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1483-3>
- Kitchen, L. W., Lawrence, K. L., & Coleman, R. E. (2009). The Role of the United States Military in the Development of Vector Control Products, Including Insect Repellents,

- Insecticides, and Bed Nets. *Journal of Vector Ecology*, 34(1), 50–61.
<https://doi.org/10.3376/038.034.0107>
- Kongkaew, C., Sakunrag, I., Chaiyakunapruk, N., & Tawatsin, A. (2011). Effectiveness of citronella preparations in preventing mosquito bites: Systematic review of controlled laboratory experimental studies. *Tropical Medicine and International Health*, 16(7), 802–810. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02781.x>
- Leal, G. M., & Leal, W. S. (2015). Binding of a fluorescence reporter and a ligand to an odorant-binding protein of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *F1000Research*, 3(305), 1–14. <https://doi.org/10.12688/f1000research.5879.2>
- Leal, W. S. (2013). Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 373–391.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>
- Leite, N. R., Krogh, R., Xu, W., Ishida, Y., Iulek, J., Leal, W. S., & Oliva, G. (2009). Structure of an Odorant-Binding Protein from the Mosquito *Aedes aegypti* Suggests a Binding Pocket Covered by a pH-Sensitive “Lid.” *PLoS ONE*, 4(11), 1–7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008006>
- Leyva, M., Castex, M., Montada, D., Quintana, F., Lezcano, D., Marquetti, M. del C., ... Gonzalez, I. (2012). Actividad repelente de formulaciones del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake (Myrtales: Myrtaceae) en mosquitos. *Anales de Biología*, 34, 49–58.
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I. (2016). *Terpenoids. Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1>
- Maia, M. F., & Moore, S. J. (2011). Plant-based insect repellents: A review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 10(Suppl 1), S11.

<https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S11>

Maimone, T. (2002). Classic Terpene Syntheses. *Building*, 1–18. Recuperado de:

https://www.scripps.edu/baran/images/grpmtgpdf/Maimone_Oct_05.pdf

Michaelakis, A., Vidali, V. P., Papachristos, D. P., Pitsinos, E. N., Koliopoulos, G.,

Couladouros, E. A., ... Kimbaris, A. C. (2014). Bioefficacy of acyclic monoterpenes and their saturated derivatives against the West Nile vector *Culex pipiens*. *Chemosphere*, 96,

74–80. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.032>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application

to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2),

55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Murray, N. E. A., Quam, M. B., & Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: Past,

present and future prospects. *Clinical Epidemiology*, 5(1), 299–309.

<https://doi.org/10.2147/CLEP.S34440>

Natarajan, R., Basak, S. C., Mills, D., Kraker, J. J., & Hawkins, D. M. (2008). Quantitative

structure-activity relationship modeling of mosquito repellents using calculated descriptors. *Croatica Chemica Acta*, 81(2), 333–340.

Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils:

A review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372–378.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048>

Nogueira Barradas, T., Perdiz Senna, J., Ricci Júnior, E., & Regina Elias Mansur, C. (2016).

Polymer-based drug delivery systems applied to Insects Repellents devices: A Review.

Current Drug Delivery, 13(2), 221–235.

<https://doi.org/10.2174/1567201813666151207110515>

Northey, T., Venthur, H., De Biasio, F., Chauviac, F. X., Cole, A., Ribeiro, K. A. L., ...

Zhou, J. J. (2016). Crystal structures and binding dynamics of odorant-binding protein 3

- from two aphid species *Megoura viciae* and *Nasonovia ribisnigri*. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep24739>
- Oliferenko, P. V., Oliferenko, A. A., Poda, G. I., Osolodkin, D. I., Pillai, G. G., Bernier, U. R., ... Katritzky, A. R. (2013). Promising *Aedes aegypti* Repellent Chemotypes Identified through Integrated QSAR, Virtual Screening, Synthesis, and Bioassay. *PLoS ONE*, 8(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064547>
- Orsborne, J., Banks, S. D. R., Hendy, A., Gezan, S. A., Kaur, H., Wilder-Smith, A., ... Logan, J. G. (2016). Personal protection of permethrin-treated clothing against *Aedes aegypti*, the vector of dengue and zika virus, in the laboratory. *PLoS ONE*, 11(5), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152805>
- Oyedele, A. O., Gbolade, A. A., Sosan, M. B., Adewoyin, F. B., Soyelu, O. L., & Orafidiya, O. O. (2002). Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil. *Phytomedicine*, 9(3), 259–262. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00120>
- Pal, M., Kumar, A., & Tewari, K. (2011). Chemical composition and mosquito repellent activity of the essential oil of *Plectranthus incanus* link. *Facta Universitatis - Series: Physics, Chemistry and Technology*, 9(1), 57–64. <https://doi.org/10.2298/FUPCT1101057P>
- Paluch, G., Bartholomay, L., & Coats, J. (2010). Mosquito repellents: A review of chemical structure diversity and olfaction. *Pest Management Science*, 66(9), 925–935. <https://doi.org/10.1002/ps.1974>
- Pandit, J., Aquil, M., & Sultana, Y. (2006). *Essential oils and terpenes In Percutaneous penetration enhancers*. DOI: 10.1007/978-3-662-47039-8_11.
- 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>

- Pelosi, P., Iovinella, I., Felicioli, A., & Dani, F. R. (2014). Soluble proteins of chemical communication: An overview across arthropods. *Frontiers in Physiology*, 5(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00320>
- Pennetier, C., Chabi, J., Martin, T., Chandre, F., Rogier, C., Hougard, J. M., & Pages, F. (2010). New protective battle-dress impregnated against mosquito vector bites. *Parasites and Vectors*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-81>
- Phasomkusolsil, S., & Soonwera, M. (2010). Insect repellent activity of medicinal plant oils against *Aedes aegypti* (LINN.), *Anopheles minimus* (Theobald) and *Culex quinquefasciatus* Say based on protection time and biting rate. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 41(4), 831–840. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003829>
- Pillai, S., Mahmud, R., & Perumal, S. (2012). Determination of Antimicrobial Activity of Essential oils of *Myristica fragrans* Houtt. using Tetrazolium Microplate Assay and its Cytotoxic Activity Against Vero Cell Line. *International Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.3923/ijp.2012.572.576>
- Rickards, C. (1960). *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito, its life story, bionomics and structure. Bureau, India, *The Syndics of the Cambridge University Press*.
- Ríos, N., Stashenko, E. E., & Duque, J. E. (2017). Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 61(4), 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.08.005>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*, 114(8), 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>
- Rueda, L. M. (2004). Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue virus transmission. *Zootaxa* 589. 1-60

<http://doi.org/10.11646/zootaxa.589.1.1>

- Santos, S. R. L., Silva, V. B., & Barbosa, J. D. F. (2010). Toxic effects on and Structure-Toxicity of Phenylpropanoids, Terpenes, and Related Compounds in *Aedes aegypti* Larvae. *Vector-borne and zoonotic diseases*, *10*(10). DOI: 10.1089=vbz.2009.0158
- Solomon, B., Sahle, F. F., Gebre-Mariam, T., Asres, K., & Neubert, R. H. H. (2012). Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and *in vitro* permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *80*(1), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.08.003>
- Steinwascher, K. (1984). Egg size variation in *Aedes aegypti*: Relationship to body size and other variables. *American Midland Naturalist*, *112*(1), 76. <http://doi.org/10.2307/2425459>
- Suwansirisilp, K., Visetson, S., Prabaripai, A., Tanasinchayakul, S., Grieco, J. P., Bangs, M. J., & Chareonviriyaphap, T. (2013). Behavioral responses of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to four essential oils in Thailand. *Journal of Pest Science*, *86*(2), 309–320. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0464-8>
- Tavares, M., da Silva, M. R. M., de Oliveira de Siqueira, L. B., Rodrigues, R. A. S., Bodjolle-d’Almeira, L., dos Santos, E. P., & Ricci-Júnior, E. (2018). Trends in insect repellent formulations: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, *539*(1–2), 190–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.046>
- Tavassoli, M., Shayeghi, M., Abai, M., Vatandoost, H., Khoobdel, M., Salari, M., ... Rafi, F. (2011). Repellency Effects of Essential Oils of Myrtle (*Myrtus communis*), Marigold (*Calendula officinalis*) Compared with DEET against *Anopheles stephensi* on Human Volunteers. *Iran J Arthropod-Borne Dis Repellency Effects of Essential*, *5*(2), 10–22.
- Thavara, U., Tawatsin, a, Chompoosri, J., Suwonkerd, W., Chansang, U. R., & Asavadachanukorn, P. (2001). Laboratory and field evaluations of the insect repellent

- 3535 (ethyl butylacetylaminopropionate) and DEET against mosquito vectors in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 17(3), 190–195.
- Thirion J. (2003). El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. *Bayer Environmental Science*, 1, 11-35.
- Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., & Apiwathnasorn, C. (2005). Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research*, 19(4), 303–309. <https://doi.org/10.1002/ptr.1637>
- Van Zyl, R. L., Seatlholo, S. T., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2006). The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 129–133. Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33748485158&partnerID=tZOtx3y1>
- Vaughn, M. F., & Meshnick, S. R. (2011). Pilot Study Assessing the Effectiveness of Long-Lasting Permethrin-Impregnated Clothing for the Prevention of Tick Bites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), 869–875. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0158>
- Vera, S. S., Zambrano, D. F., Méndez-Sánchez, S. C., Rodríguez-Sanabria, F., Stashenko, E. E., & Duque Luna, J. E. (2014). Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(7), 2647–2654. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3917-6>
- Wang, L., Wu, Y., Deng, Y., Kim, B., Pierce, L., Krilov, G., ... Abel, R. (2015). Accurate and reliable prediction of relative ligand binding potency in prospective drug discovery by way of a modern free-energy calculation protocol and force field. *Journal of the American Chemical Society*, 137(7), 2695–2703. <https://doi.org/10.1021/ja512751q>
- Wang, T., & Gu, X. (2007). *In vitro* percutaneous permeation of the repellent DEET and the sunscreen oxybenzone across human skin. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical*

- Sciences*, 10(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.039>
- Wang, Z., Song, J., Chen, J., Song, Z., Shang, S., Jiang, Z., & Han, Z. (2008). QSAR study of mosquito repellents from terpenoid with a six-member-ring. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(9), 2854–2859. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.091>
- Warshel, A., & Lifson, S. (1970). Consistent force field calculations. II. Crystal structures, sublimation energies, molecular and lattice vibrations, molecular conformations, and enthalpies of alkanes. *The Journal of Chemical Physics*, 53(2), 582–594. <https://doi.org/10.1063/1.1674031>
- Wilder-Smith, A., Byass, P., Olanratmanee, P., Maskhao, P., Sringernyuang, L., Logan, J. G., ... Kittayapong, P. (2012). The impact of insecticide-treated school uniforms on dengue infections in school-aged children: Study protocol for a randomised controlled trial in Thailand. *Trials*, 13, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-13-212>
- World Health Organization. (2017). Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas by Country. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Xu, P., Atkinson, R., Jones, D. N. M., & Smith, D. P. (2005). *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron*, 45(2), 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.031>
- Xu, P., Choo, Y.-M., De La Rosa, A., & Leal, W. S. (2014). Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(46), 16592–16597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417244111>
- Yactayo, S., Staples, J. E., Millot, V., Cibrelus, L., & Ramon-Pardo, P. (2016). Epidemiology of chikungunya in the americas. *Journal of Infectious Diseases*, 214(February), S441–S445. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw390>
- Yin, J., Choo, Y. M., Duan, H., & Leal, W. S. (2015). Selectivity of odorant-binding proteins

from the southern house mosquito tested against physiologically relevant ligands.

Frontiers in Physiology, 6(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00056>

Zhang, Q., Grice, J., Wang, G., & Roberts, M. (2009). Cutaneous Metabolism in Transdermal

Drug Delivery. *Current Drug Metabolism*, 10(3), 227–235.

<https://doi.org/10.2174/138920009787846350>

Zhou, J. J., He, X. L., Pickett, J. A., & Field, L. M. (2008). Identification of odorant-binding

proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: Genome annotation and

comparative analyses. *Insect Molecular Biology*, 17(2), 147–163.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00789.x>