

α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-Limoneno, metabolitos secundarios de plantas medicinales con actividad insecticida sobre *Aedes aegypti* vector de las enfermedades dengue, chikungunya y zika.

Lizeth Natalia Rios Pinzón

Trabajo de investigación para optar el título de

Magister en Química

Directores

Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D en ciencias Bioquímicas, Jonny Edward Duque

Luna Msc, Ph.D en ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Maestría en Química

Bucaramanga

2018

Dedicatoria

Para Cami, que la vida no le dio tiempo de tener más alegrías, las mías serán todas tuyas.

Agradecimientos

Mis deseos de poder alcanzar una meta más no serían posibles sin la guía y oportunidad que la profesora Stelia Carolina y el profesor Jonny me dieron. Ser profesor no es solo impartir conocimientos, es tener la posibilidad de generar grandes y positivos cambios en las personas, gracias por su paciencia y por ser profesores cercanos a sus estudiantes. Mis sentimientos de gratitud a los compañeros de los grupos de investigación GIBIM y CINTROP, por los consejos y amabilidad que siempre tuvieron para brindarme su ayuda, a Ruth, Gustavo, Juliana, Luis Carlos, Gonzalo, Marilyn, César y Sandra y en especial a Mayra, que en los momentos difíciles me brindó su apoyo, además de alegrías, tertulias y karaokes que no faltaron.

Muchas gracias María Fernanda y Elizabeth, por su ayuda y paciencia en todas las veces que fuimos a molestarlas y siempre nos colaboraron con la mejor voluntad.

Gracias a los amigos que son hermanos que la vida en su generosidad nos da. Ana, Andrea, Milena, Wendy, Cristian, David, Adriana, Bibiana, Mercedes y las mágicas, su apoyo en todo momento es un aliento y fortuna que valoro. A mi familia, mis padres que me inculcaron el amor por aprender, por su confianza en que puedo lograr muchas cosas son su mejor herencia. A mi hermana por su cariño y apoyo, espero darles muchas más satisfacciones.

Finalmente, a la Universidad Industrial de Santander patrimonio invaluable de los colombianos, la educación dignifica, genera paz e igualdad ayuda a construir la sociedad que tanto anhelamos.

Tabla de contenido

Introducción	23
1 Objetivos.....	25
1.1 Objetivo general:	25
1.2 Objetivos específicos:	25
2 Marco teórico y antecedentes.....	26
2.1 <i>Aedes aegypti</i> vector de enfermedades y su control.....	28
2.2 Aceites esenciales.....	30
2.3 α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol, s-limoneno	32
2.3.1 α -Felandreno.....	32
2.3.2 α -Bisabolol	32
2.3.3 Nerolidol.....	34
2.3.4 s-Limoneno.....	34
2.4 Mecanismo de acción.....	35
2.5 Mitocondria organelo complejo	38
2.6 Cadena de transporte de electrones	40
2.6.1 Complejo I.....	42
2.6.2 Complejo II.....	43
2.6.3 Complejo III	45
2.6.4 Complejo IV	47

2.6.5 ATPasa/ ATPsintasa	49
2.7 Acetilcolinesterasa	51
2.8 Efectos de compuestos mayoritarios de aceites esenciales sobre el ADN	54
3 Hipótesis	55
4 Metodología	55
4.1 Análisis <i>in silico</i> :	56
4.2 Análisis estadístico por componentes principales:	57
4.3 Actividad insecticida:	57
4.3.1 Efecto larvicida	58
4.4 Determinación del mecanismo de acción	58
4.4.1 Determinación de la presencia o ausencia de degradación o fragmentación de ADN total de <i>Aedes aegypti</i>	58
4.4.1.1 Extracción de ADN de larvas tratadas durante 24 horas	59
4.4.1.2 Extracción de ADN de larvas tratado con los compuestos adicionados en el momento de la homogenización.	59
4.4.1.3 ADN purificado y tratado directamente con los compuestos mayoritarios	60
4.4.2 Inhibición de la acetilcolinesterasa	60
4.4.3 Efectos de los compuestos estudiados sobre la cadena energética mitocondrial.	62
4.4.3.1 Aislamiento de mitocondrias de larvas de <i>Aedes aegypti</i> para la realización de ensayos enzimáticos	62

4.4.3.2 Preparación de la suspensión de mitocondrias para el estudio de la actividad de las enzimas mitocondriales.....	62
4.4.3.3 Determinación de la actividad de los complejos enzimáticos que constituyen la cadena energética mitocondrial:.....	63
4.4.3.3.1 Determinación de la actividad enzimática de NADH Oxidasa.....	63
4.4.3.3.2 Determinación de la actividad enzimática de Succinato oxidasa.....	64
4.4.3.3.3 Determinación de la actividad de la enzima NADH deshidrogenasa	64
4.4.3.3.4 Determinación de la actividad de la enzima Succinato deshidrogenasa	64
4.4.3.3.5 Determinación de la actividad de la enzima ATPasa.....	65
4.4.3.3.6 Determinación de la actividad de la enzima Succinato Citocromo c reductasa.....	66
4.4.3.3.7 Determinación de la actividad de la enzima Citocromo C oxidasa	66
4.4.4 Actividad insecticida de mezclas de metabolitos	66
4.4.4.1 Mezclas evaluadas.....	67
4.5 Análisis estadísticos de los resultados.....	67
5 Resultados y discusión.....	67
5.1 Análisis <i>in silico</i>	68
5.2 Análisis de componentes principales	79
5.3 Actividad larvicida:	83
5.4 Resultados de la determinación de la presencia/ausencia de degradación/fragmentación de ADN de <i>Aedes aegypti</i>	86
5.4.1 Efectos sobre el ADN de larvas tratadas durante 24 horas.....	87

5.4.2 Efectos sobre de ADN de larvas tratado con los compuestos adicionados en el momento de la homogenización.	88
5.4.3 ADN purificado y tratado directamente con los compuestos mayoritarios.	89
5.5 Resultados de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa	91
5.6 Resultados de los efectos de los compuestos estudiados sobre la cadena energética mitocondrial	93
5.6.1 NADH oxidasa y succinato oxidasa	94
5.6.2 NADH y succinato deshidrogenasa	97
5.6.3 Succinato Citocromo c reductasa.....	100
5.6.4 Citocromo c oxidasa	101
5.6.5 Complejo enzimático ATPasa	102
5.7 Resultados de actividad insecticida de mezclas de metabolitos.....	105
6 Conclusiones.....	110
7 Recomendaciones	111
8 Divulgación de resultados.....	112
Referencias Bibliográficas.....	113

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>A. aegypti</i> en rojo se resaltan los estadios larvales acuáticos. Adaptado de Geris, Ribeiro, Da Silva Brandão, Da Silva, & Da Silva, 2012.	27
Figura 2. Estructuras de los metabolitos: (A). α -Felandreno, (B). α -Bisabolol, (C). Nerolidol, (D). s-Limoneno.....	33
Figura 3. Representación del contorno de una mitocondria. Adaptado de Bhagavan (2011).	40
Figura 4. Cadena de transporte de electrones. Adaptada de Le (2017).	41
Figura 5. Representación del sistema de reacciones ocurridas en el complejo I.	43
Figura 6. Succinato deshidrogenasa (SDH) complejo II. Adaptado de Settas (2017).	44
Figura 7. Esquema del sistema redox del complejo II. Adaptado de Bhagavan (2011).	44
Figura 8. Reacción general llevada a cabo en el complejo III	45
Figura 9. Esquema de la reducción de Q a QH ₂ donde el intermediario representa un radical libre. Fuente: Autora.	45
Figura 10. Diagrama esquemático del ciclo de Q. Tomado de Kramer (2004).	46
Figura 11. Esquema de la transferencia de electrones y bombeo de protones en la enzima citocromo c oxidasa. Adaptada de Blomberg (2012).	48
Figura 12. Representación de la estructura del complejo enzimático ATPasa. Adaptado de Bhagavan (2011).	50
Figura 13. Ataque nucleofílico de Ser200-His440-Glu327 perteneciente a AchE a la acetilcolina. Adaptado de Houghton(2006).	51

Figura 14. Amonio cuaternario estabilizado por los fragmentos aromáticos de aminoácidos. Adaptado de Houghton (2006).....	52
Figura 15. Mecanismo “back door”. Adaptado de Houghton (2006).....	53
Figura 16. Resumen de la metodología desarrollada.	55
Figura 17. Esquema de la reacción llevada a cabo en el método de Ellman (Ellman et al., 1961).	60
Figura 18. Esquema de la reacción llevado a cabo en el estudio de la NADH oxidasa.	63
Figura 20. Gráfico de sedimentación, criterio empleado para la selección del componente a considerar.	80
Figura 21. Gráfico de componente en espacio rotado.....	82
Figura 22. Análisis de ADN de larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas 24 h las concentraciones CL ₅₀ de: F: α -Felandreno (44 ppm), B: α -Bisabolol (21 ppm), N: Nerolidol (19 ppm), L: s-limoneno (6 ppm), MP: Marcador de peso, C: control ADN, BF: buffer de carga.	87
Figura 23. Análisis de ADN de larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratado con los metabolitos al momento de la homogeneización con las CL ₅₀ de: F: α -Felandreno (44 ppm), B: α -Bisabolol (21 ppm), N: Nerolidol (19 ppm), L: s-limoneno (6 ppm), MP: Marcador de peso, C: control ADN, BF: buffer de carga.....	88
Figura 24. Análisis de ADN de larvas de <i>Aedes aegypti</i> purificado e incubado con las CL ₅₀ de: F: α -Felandreno (44 ppm), B: α -Bisabolol (21 ppm), N: Nerolidol (19 ppm), L: s-limoneno (6 ppm), MP: Marcador de peso, C: control ADN, BF: buffer de carga.	89

Figura 25. Resultados de la inhibición de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) en sus correspondientes CL ₅₀ de AchE evaluada en la enzima disponible comercialmente (<i>Electrophorus electricus</i>).....	91
Figura 26. Resultados de la inhibición de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) en sus correspondientes CL ₅₀ de AchE evaluada en la enzima contenida en el homogeneizado de larvas de <i>A. aegypti</i>	92
Figura 27. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) en sus correspondientes CL ₅₀ sobre el flujo de electrones desde el complejo I hasta el IV.....	94
Figura 28. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) en sus correspondientes CL ₅₀ sobre el flujo de electrones desde el complejo II hasta el IV.....	96
Figura 29. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) evaluados en las CL ₅₀ , sobre la actividad enzimática de NADH deshidrogenasa.....	97
Figura 30. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) evaluados en las CL ₅₀ , sobre la actividad enzimática de Succinato deshidrogenasa.....	99
Figura 31. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) evaluados en las CL ₅₀ , sobre la actividad enzimática de Succinato citocromo c reductasa..	100

Figura 32. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) evaluados en las CL ₅₀ , sobre la actividad enzimática de le enzima citocromo c reductasa..	101
Figura 33. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) evaluados en las CL ₅₀ , sobre la actividad enzimática de le enzima ATPasa.....	102
Figura 34 . Porcentajes de mortalidad de larvas obtenidos con las diferentes mezclas de los 4 metabolitos seleccionados, α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-Limoneno a dos horas de exposición..	107
Figura 35. Porcentajes de mortalidad de larvas obtenidos con las diferentes mezclas de los 4 metabolitos seleccionados, α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-limoneno a 24 horas de exposición.	108

Lista de tablas

Tabla 1. Metabolitos presentados por Pavela y colaboradores, 2015.....	78
Tabla 2. Varianza total explicada.....	80
Tabla 3. Matriz de componente rotado.	81
Tabla 4. Resultados de la actividad larvicida.....	85
Tabla 5. Mezclas de los metabolitos y sus respectivas CL ₅₀	105

Lista de apéndices

Apéndice A Resultado de las propiedades físicas, actividad biológica y alertas de toxicidad generadas para cada metabolito usando las herramientas informáticas Osiris y Molinspiration.....	78
--	----

Lista de Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BCN	Centro binuclear
BSA	Albúmina bovina sérica
CcO	Citocromo c oxidasa
CD	Concentraciones diagnósticas
CI	Concentración inhibitoria
CINTROP	Centro de investigaciones en enfermedades tropicales
CL	Concentración letal
Cyt c	Citocromo c
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DEET	N,N-dietil-3-metilbenzamida

DL	Dosis letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA-PK	Proteína quinasa dependiente de ADN
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicon tetraacético
ER	Efectos reproductivos
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavin mononucleótico
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
Glu	Glutamato
GSH	Glutación
His	Histidina
I	Irritante
IE	Inhibidor enzimático
IK	Inhibidor de kinasas
IP	Inhibidor de proteasas

L GPRC	Ligando receptor acoplado a proteínas G
LogP	Logaritmo P
M	Mutagénico
M1 a M11	Mezcla 1 a Mezcla 11
MCI	Modulador de canales iónicos
MGMT	Metil guanina metil transferasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
OMS	Organización mundial de la salud
P	Peso
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PEP	Fosfoenol piruvato
Phe	Fenilalanina
PLS	<i>Pump loading site</i> (Centro de carga de la bomba)
PMS	Fenacina metosulfato
ppm	Partes por millón
QH ₂	Ubiquinol
RNL	Receptor nuclear de ligandos

S	Solubilidad
SCGE	Single-cell gel electrophoresis (Electroforesis unicelular en gel)
SDH	Succinato deshidrogenasa
Ser	Serina
T	Tumorigénico
TCA	Ácido tricloroacético
TPSA	Área de superficie polar topológica
Trp	Triptófano

Resumen

Título: α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-Limoneno, metabolitos secundarios de plantas medicinales con actividad insecticida sobre *Aedes aegypti* vector de las enfermedades dengue, chikungunya y zika.

Autora: RÍOS PINZON, Lizeth Natalia **

Palabras Clave: METABOLITOS SECUNDARIOS, AEDES AEGYPTI, MECANISMO DE ACCIÓN, ACTIVIDAD INSECTICIDA.

Resumen: Como medida de control del vector *Aedes aegypti*, el uso prolongado de sustancias sintéticas como el DDT o el temephos ha contribuido a la aparición de cepas resistentes (Dias y Moraes, 2014, Smith, Kasai y Scott, 2016). Con el deseo de encontrar otras formas de controlar el vector, los metabolitos secundarios de las plantas surgen como alternativas prometedoras. Por esta razón, se realizó una revisión del trabajo presentado por Pavela y colaboradores (Pavela et al, 2014) de los compuestos esenciales de más de 120 especies de plantas, a través del uso de herramientas informáticas Osiris y Molinspiration. Se seleccionaron metabolitos que cumplieran con los parámetros de Lipinski y que presentan mejores valores en la predicción de su actividad biológica. Finalmente, y con la ayuda de un análisis estadístico para los componentes principales, se seleccionaron 7 compuestos para llevar a cabo pruebas de actividad in vivo con larvas de mosquito entre la tercera y cuarta etapas de desarrollo. Los mejores compuestos fueron Felandrene Nerolidol Bisabolol con concentraciones letales 50 (LC₅₀) de 44, 21 y 19 ppm respectivamente, lo que permitió que estos compuestos fueran muy activos. Para estudiar el posible mecanismo de acción, se evaluó la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por el efecto de los metabolitos previos, encontrando que el Felandreno, Bisabolol y Nerolidol disminuyeron la actividad de esta enzima en un 20, 10% y 12%. Otro posible target estudiado fue la cadena de fosforilación, encontrando que el Felandreno provocó la disminución de la actividad enzimática del complejo I, el bisabolol del complejo IV, el Nerolidol de los complejos I y II, siendo el compuesto con los valores más altos de reducción de la actividad enzimática. Finalmente, el Limoneno causa la inhibición de ATPasa alterando la energética mitocondrial.

*: Trabajo de Grado

**.: Facultad de ciencias. Escuela de química. Directores: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D, Jonny Edward Duque Luna Msc, Ph.D.

Abstract

Title: α -Felandrene, α -Bisabolol, Nerolidol and s-Limonene, secondary metabolites of medicinal plants with insecticidal activity on *Aedes aegypti* vector of dengue, chikungunya and zika diseases

Author: RÍOS PINZON, Lizeth Natalia **

Keywords: SECONDARY METABOLITES, AEDES AEGYPTI, MECHANISM OF ACTION, INSECTICIDAL ACTIVITY.

Abstract: As a measure of control of the *Aedes aegypti* vector, the prolonged use of synthetic substances such as DDT or temephos has contributed to the emergence of resistant strains (Dias & Moraes, 2014, Smith, Kasai and Scott, 2016). With the desire to find other ways to control the vector, secondary metabolites of plants emerge as promising alternatives. For this reason, a review was made of the work presented by Pavela and collaborators (Pavela et al, 2014) of the essential compounds of more than 120 plant species, using Osiris and Molinspiration computer tools. Metabolites were selected that fulfilled the Lipinski parameters and that present better values in the prediction of their biological activity. Finally, and with the help of a statistical analysis for the main components, 7 compounds were selected to carry out in vivo activity tests with mosquito larvae between the third and fourth stages of development. The best compounds were Felandrene Nerolidol Bisabolol with lethal concentrations 50 (LC₅₀) of 44, 21 and 19 ppm respectively, which allowed these compounds to be very active. To study the possible mechanism of action, the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase was evaluated by the effect of the previous metabolites, finding that Felandrene, Bisabolol and Nerolidol decreased the activity of this enzyme by 20, 10% and 12%. Another possible target studied was the phosphorylation chain, finding that Felandrene caused the decrease of the enzymatic activity of complex I, bisabolol of complex IV, Nerolidol of complexes I and II, being the compound with the highest values of reduction of enzymatic activity. Finally, Limonene causes the inhibition of ATPase by altering the mitochondrial energy.

*: Graduation project

**: Faculty of Science. School of Chemistry. Directors: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D, Jonny Edward Duque Luna Msc, Ph.D

Introducción

El mosquito *Aedes aegypti* es el vector de enfermedades como el dengue, el chikungunya y zika. Algunas cifras relacionadas con la influencia que tiene este vector apuntan que cerca del 40% de la población mundial está en riesgo de contraer el dengue debido a la picadura de mosquitos portadores del virus. Solo en el continente americano en lo que va corrido del año 2017 según la semana epidemiológica 40, la organización mundial de la salud (OMS, 2009), reporta 943.717 casos de personas contagiadas por con el virus del dengue, 1'010.724 por el virus Chikungunya y 1'003.509 con el virus del Zika. Con el objetivo de controlar el dengue se ha avanzado en la creación de una vacuna (Sanofi Pasteur CYD-TDV vaccine (Dengvaxia®)) la cual se encuentra en fase III de desarrollo, sin embargo, los virus que causan chikungunya y zika a pesar de los esfuerzos realizados por equipos de trabajo como los de Kim y colaboradores (Kim et al., 2016), aún no tienen vacuna disponible. Minimizar los criaderos de las larvas y la aplicación de insecticidas son algunas de las principales estrategias utilizadas para el control del vector. Sin embargo, el uso prolongado de sustancias sintéticas como el temefos ha contribuido a la aparición de cepas resistentes (Dias & Moraes, 2014; Smith *et al.*, 2016).

Con el deseo de buscar estrategias que contribuyan al control del mosquito *Aedes aegypti*, los aceites esenciales surgen como una alternativa prometedora debido a la actividad insecticida que presentan, además, gracias a que tienen un origen natural, son más amigables con el medio ambiente (Dias & Moraes, 2014; Pavela, 2015). Estudios de los últimos 50 años han mostrado que más de 2000 especies de plantas de distintas familias tienen componentes que son tóxicos para los insectos, de allí el interés por encontrar sustancias con mayor efecto insecticida (Elumalai *et al.*, 2012).

Aun cuando se cuenta con un amplio registro de plantas con efecto insecticida, lo que se conoce acerca de su mecanismo de acción es más limitado. Un aceite esencial es una mezcla que contiene entre 50 y 300 compuestos volátiles (Stashenko, 2012). Su variada composición hace que dilucidar la forma como actúa cada metabolito en el metabolismo del insecto sea más complejo de determinar, entre otras razones porque al ser un conjunto de sustancias pueden tener efecto sinérgico entre ellas. Debido a las diversas formas como los compuestos pueden ejercer su efecto insecticida, en el presente trabajo de investigación se contemplaron tres diferentes dianas farmacológicas como son: los complejos enzimáticos de la cadena transportadora de electrones, la enzima acetilcolinesterasa y el ADN.

Con el objetivo de encontrar nuevos insecticidas, en este trabajo se evaluaron metabolitos mayoritarios de aceites con reconocida actividad contra *A. aegypti*. Estos metabolitos fueron seleccionados teniendo en cuenta los parámetros de Lipinski o “regla de los 5”, factores como actividad biológica y riesgos de toxicidad (según estimaciones realizadas con las herramientas informáticas Osiris y Molinspiration). Una vez escogidos los compuestos fueron evaluados *in vivo* y posteriormente estudiado su posible mecanismo de acción en las dianas anteriormente mencionadas. Con base en los resultados obtenidos se propusieron mezclas de metabolitos con dianas farmacológicas diferentes, presentando mejores efectos que los metabolitos por separado.

1 Objetivos

1.1 Objetivo general:

Generar mezclas a partir de los componentes principales reportados de aceites esenciales de plantas medicinales con uso potencial en el control de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y estudio de posible mecanismo de acción.

1.2 Objetivos específicos:

- Realizar el estudio *in silico* de los principales componentes de aceites esenciales para la determinación de su potencial insecticida.
- Seleccionar, de acuerdo con los resultados del estudio *in silico*, los metabolitos secundarios con mayor potencial insecticida sobre *Aedes aegypti*.
- Estudiar los efectos de los componentes mayoritarios de aceites seleccionados sobre la cadena energética mitocondrial.
- Analizar los efectos de los metabolitos seleccionados sobre la degradación o fragmentación del ADN en larvas de *Aedes aegypti* expuestas al insecticida.
- Examinar el efecto inhibitorio del insecticida sobre la enzima acetilcolinesterasa en individuos de *Aedes aegypti* expuestos al tratamiento.
- Plantear mezclas de metabolitos secundarios que potencialicen la actividad insecticida.

2 Marco teórico y antecedentes

1.1 *Aedes aegypti*

A. aegypti es un mosquito originario de África subsahariana, lugar donde vivían en un ambiente silvestre depositando huevos en los huecos de los árboles y se alimentaban preferencialmente de sangre no humana. Durante su proceso de domesticación llegaron al nuevo mundo en el siglo XVII en barcos que contaban con las condiciones necesarias para su reproducción (Tabachnick, 2013). Aunque se ha considerado un mosquito con presencia en zonas tropicales, la distribución de *A. aegypti* está influenciada por el clima, esto ocasiona que factores como el cambio climático amplíen su área de distribución en el planeta, como se evidencia en algunas regiones templadas (Jansen & Beebe, 2010).

Taxonómicamente, Culicidae es la familia a la que pertenece el mosquito de interés y de la cual hacen parte alrededor de 3200 especies (Foster *et al.*, 2002). El ciclo de vida de este insecto (Figura 1), contiene dos ambientes, el acuático en el cual la hembra pone los huevos para la eclosión y posterior desarrollo de las larvas y las pupas, finalmente el entorno terrestre donde habitan los adultos.

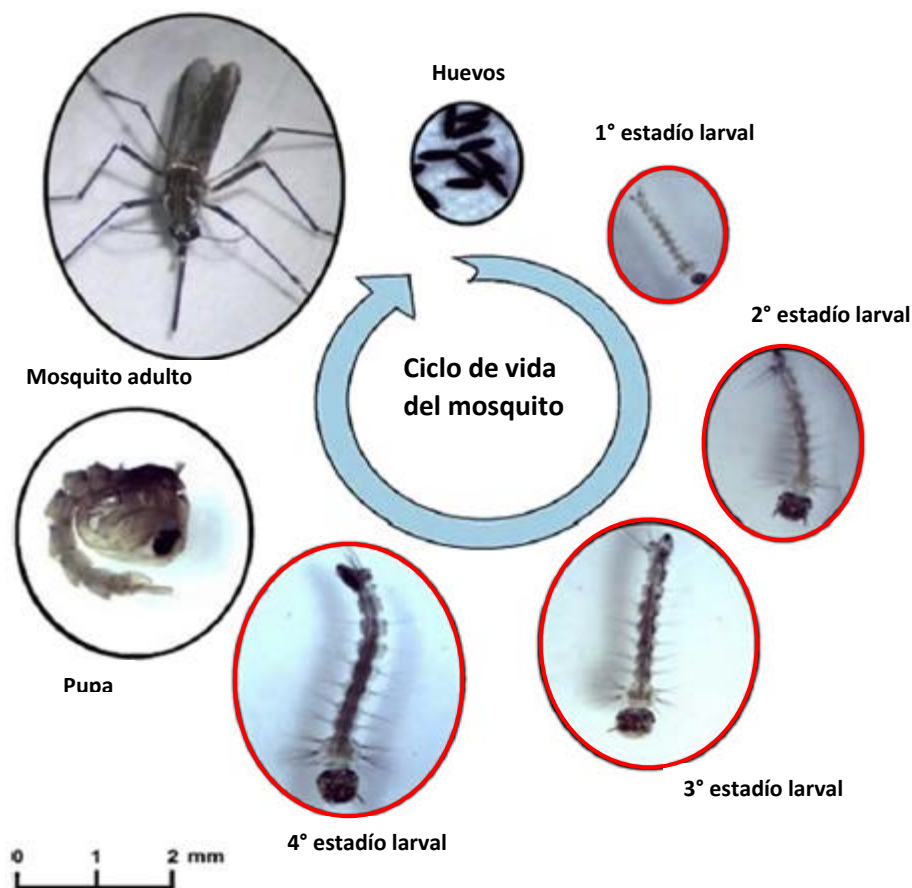


Figura 1. Ciclo de vida de *A. aegypti* en rojo se resaltan los estadios larvales acuáticos. Adaptado de Geris (2012).

Una vez eclosionadas, las larvas pueden durar alrededor de 5-6 días en presencia de abundante alimento y temperaturas mayores a 20°C características de las zonas tropicales, antes de cambiar de estadio. El estado de pupa puede extenderse por alrededor de 2 días, en el cual el insecto pasa la mayor parte del tiempo en la superficie del agua hasta que muda y completa su desarrollo llegando al estado adulto, en el cual una hembra puede alimentarse más de una vez para completar su ciclo gonotrópico. Las hembras se alimentan de la sangre de vertebrados puesto que la hemoglobina y las proteínas contenidas en el suero sanguíneo proporcionan los aminoácidos para la

síntesis de la vitelogenina, la cual es un precursor proteico necesario para el desarrollo de los huevos (Foster *et al.*, 2002).

2.1 *Aedes aegypti* vector de enfermedades y su control

Las principales enfermedades humanas transmitidas por vectores son el dengue, el paludismo, la filariasis linfática, la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis, la fiebre chikunguña, el zika, la fiebre amarilla entre otras. Estas enfermedades representan alrededor del 17% de la carga mundial estimada de enfermedades transmisibles y afectan principalmente a las poblaciones más pobres (OMS, 2017). Los mosquitos representan la mayor amenaza de propagación de enfermedades vectoriales, al ser los responsables de transmitir el paludismo, el dengue y la fiebre amarilla, enfermedades con cientos de millones de casos al año, incluso con casos graves que ocasionan millones de defunciones y de. El dengue, por ejemplo, es la virosis transmitida por mosquitos más importante del mundo, 2500 millones de personas están expuestas a esta infección y cada año se registran 20 millones de casos en más de 100 países (OMS, 2017). En el año de 1995, se registró la peor epidemia de esta enfermedad en América Latina y el Caribe en los últimos años, afectó a por los menos 14 países, causando más de 200 000 casos de fiebre del dengue y casi 6000 casos de la afección más grave del dengue (Petersen, 1996). El virus del dengue es transmitido por mosquitos hembra principalmente de la especie *Aedes aegypti*.

Un enfoque preventivo que ha mostrado resultados eficaces en la prevención de enfermedades que necesitan de organismos vivos para transmitirse, ha sido el control de los vectores, ya que de esta forma se reduce la probabilidad del contacto con los humanos logrando detener la transmisión. Una de las principales características que ha permitido la exitosa propagación de este vector es el

uso de una gran variedad de hábitats que puede colonizar, tanto artificiales como naturales (OMS, 2017).

Según la organización Mundial de la Salud para lograr un exitoso control del vector el enfoque debe comprender los siguientes manejos: ambiental, químico, protección individual y de la vivienda y control biológico.

- El manejo ambiental tiene como principal objetivo cambiar el entorno con el fin de prevenir o minimizar la propagación de los vectores y el contacto de este con los humanos, destruyendo, alterando, eliminando o reciclando los recipientes que pueden servir como hábitat para el estadio larval del insecto (OMS, 2017).
- El control químico se orienta a las diferentes etapas de desarrollo del vector y debe emplearse como complemento del manejo ambiental. En la etapa larval es de importancia que se usen larvicidas de baja toxicidad para otras especies, por otro lado, estos productos no deben cambiar el olor, sabor ni color del agua, ya que principalmente *A. aegypti* deposita los huevos en recipientes donde se almacena el líquido. Por otro lado, los métodos de control químico para el vector en etapa adulta tienen la finalidad de afectar las densidades del mosquito, su longevidad y otros parámetros de transmisión. Estos insecticidas se aplican en forma de tratamientos residuales de superficie o como tratamientos espaciales. Tanto el enfoque de control químico larvicida y adulticida debe estar acompañado de un monitoreo de la susceptibilidad a los insecticidas con el objetivo que no se generen cepas resistentes a los tratamientos (OMS, 2017).
- El enfoque de protección individual y de la vivienda se encamina a la protección de las personas mediante distintos elementos como el uso de ropa que minimice la exposición de la piel, la aplicación de repelentes como DEET (N,N-dietil-3-metilbenzamida) etc., el uso de mosquitero

y finalmente el uso de productos insecticidas domésticos en aerosoles y vaporizadores si se presentan casos de picaduras dentro del hogar (OMS, 2017).

- El control biológico se basa en la introducción de organismos que depreden, parasiten, compiten o de otra forma reduzcan las poblaciones que se desean controlar. Como un buen ejemplo de este tipo de control se encuentran ciertas especies de peces larvívoros y copépodos (*Copepoda cyclopoidea*) con efectividad contra larvas de *Aedes* en hábitats de recipientes específicos, sin embargo, presenta ciertas complicaciones en su aplicación como el costo y cría de los organismos a gran escala, pH, temperatura entre otros (OMS, 2009).

2.2 Aceites esenciales

Durante muchos años, una de las estrategias utilizadas en el control de insectos es la aplicación de productos sintéticos (entiéndase sintéticos a aquellos obtenidos a través de una síntesis en el laboratorio, como por ejemplo organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, DDT (Dicloro difenil tricloroetano), temephos, permethrin, fenitrothion entre otros). Sin embargo, su uso excesivo ha dado lugar a problemas tales como efectos negativos en fauna (peces, aves), la contaminación de las aguas subterráneas, y la resistencia a los pesticidas, este último caso con reportes en Colombia para el vector *A. aegypti* (Grisales *et al.*, 2013). Es allí donde el uso de sustancias de origen natural juega un papel importante en la búsqueda de alternativas de control de mosquitos (Manimaran *et al.*, 2012).

Aun cuando el uso de insecticidas de origen vegetal se remonta aproximadamente 150 años atrás en Europa, el interés por utilizar estos productos ha aumentado en la actualidad, ya que no se han reportado casos que presenten los aspectos negativos de los insecticidas sintéticos anteriormente mencionados (Maestre *et al.*, 2014). Una de las razones por las cuales se evidencia

este aspecto positivo se debe a que los aceites esenciales al ser una mezcla de componentes, disminuyen el riesgo de las plagas al desarrollo de resistencia, en comparación a la que pueden desarrollar por el uso prolongado de una sola sustancia, por ejemplo en el caso de los insecticidas sintéticos (Gonzalez *et al.*, 2013).

Los insecticidas de productos de origen natural pueden contener numerosas formas estructurales y funcionales entre ellas se encuentran: ácidos y derivados, quinonas, policétidos, péptidos no ribosomales, fenilpropanoides, cumarinas, flavonoides, terpenoides, alcaloides entre otros. Además, se ha comprobado en una gran cantidad de estudios, que varios de estos compuestos presentan efecto insecticida en las diferentes etapas de desarrollo del mosquito (Dharmagadda *et al.*, 2005; Govindarajan *et al.*, 2013; Length, 2012; Lima *et al.*, 2011; Pavela, 2014; Senthilkumar *et al.*, 2008; Silva & Mota, 2005; Vera *et al.*, 2014).

Los aceites esenciales están constituidos por monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos que, desde la edad media se han utilizado ampliamente como bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitarios e insecticidas, en aplicaciones medicinales, cosméticas y en la actualidad son de particular importancia para la industria farmacéutica, cosmética, agrícola y alimentaria (Bakkali *et al.*, 2008).

En la actualidad, es posible conocer los componentes principales de los aceites esenciales, por medio de técnicas analíticas como por ejemplo cromatografía de gases acoplada a masas (Vicuña *et al.*, 2010) así como la proporción de cada compuesto en la mezcla. A partir de la metodología llevada a cabo en el presente trabajo, se encontraron cuatro metabolitos con actividad larvicida considerable, los cuales se exponen a continuación.

2.3 α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol, s-limoneno

2.3.1 α -Felandreno: Es un monoterpeno cíclico también llamado 5-isopropil-2-metil-1,3-ciclohexadieno (figura 2 A) presente en el aceite esencial de plantas como *Solanum erianthum* (Solanaceae), *Thymus kotschyanus* (Lamiaceae) y *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). A este compuesto se le atribuyen numerosas propiedades dentro de las cuales tenemos, antiinflamatorias, antinociceptivas (Siqueira et al., 2016), actividad antiproliferativa contra 9 líneas celulares tumorales, donde se destacan su efectividad en control del crecimiento de células de cáncer de riñón, con dosis menores a 3,9 $\mu\text{g/mL}$. Extractos obtenidos de *Schinus terebinthifolius*, mostraron una potente actividad contra líneas celulares tumorales de ovario, próstata y glioma resistentes a medicamentos (Silva et al., 2017). Además del uso en tratamientos médicos, aceites esenciales cuyo componente principal es el α -Felandreno por ejemplo el extraído de *Anethum graveolens* ha mostrado actividad larvicida en individuos de tercer y cuarto instar de *Culex pipiens* con valores de CL50 de 52,74 mg/L (Evergetis et al., 2013).

2.3.2 α -Bisabolol: $(-)$ -6-Methyl-2-(4-methyl-3-cyclohexen-1-yl)-5-hepten-2-ol o α -Bisabolol (figura 2 B) es un alcohol sesquiterpénico con potenciales usos farmacológicos debido a su actividad antiinflamatoria contra edemas, efectos antinociceptivos y efectos gastroprotectivos (Teixeira, Vieira-Neto, da Costa, e Silva, & Campos, 2017). Estos últimos demostrados en ensayos con nanocápsulas de núcleo lipídico cargadas con α -Bisabolol en ratas (Terroso et al., 2016). α -Bisabolol es un metabolito presente en el aceite esencial de numerosas plantas dentro de las cuales

se destacan *Chamomilla recutita* (Asteraceae) y *Matricaria recutita* (Asteraceae) por su alto contenido (Oliveira *et al.*, 2017).

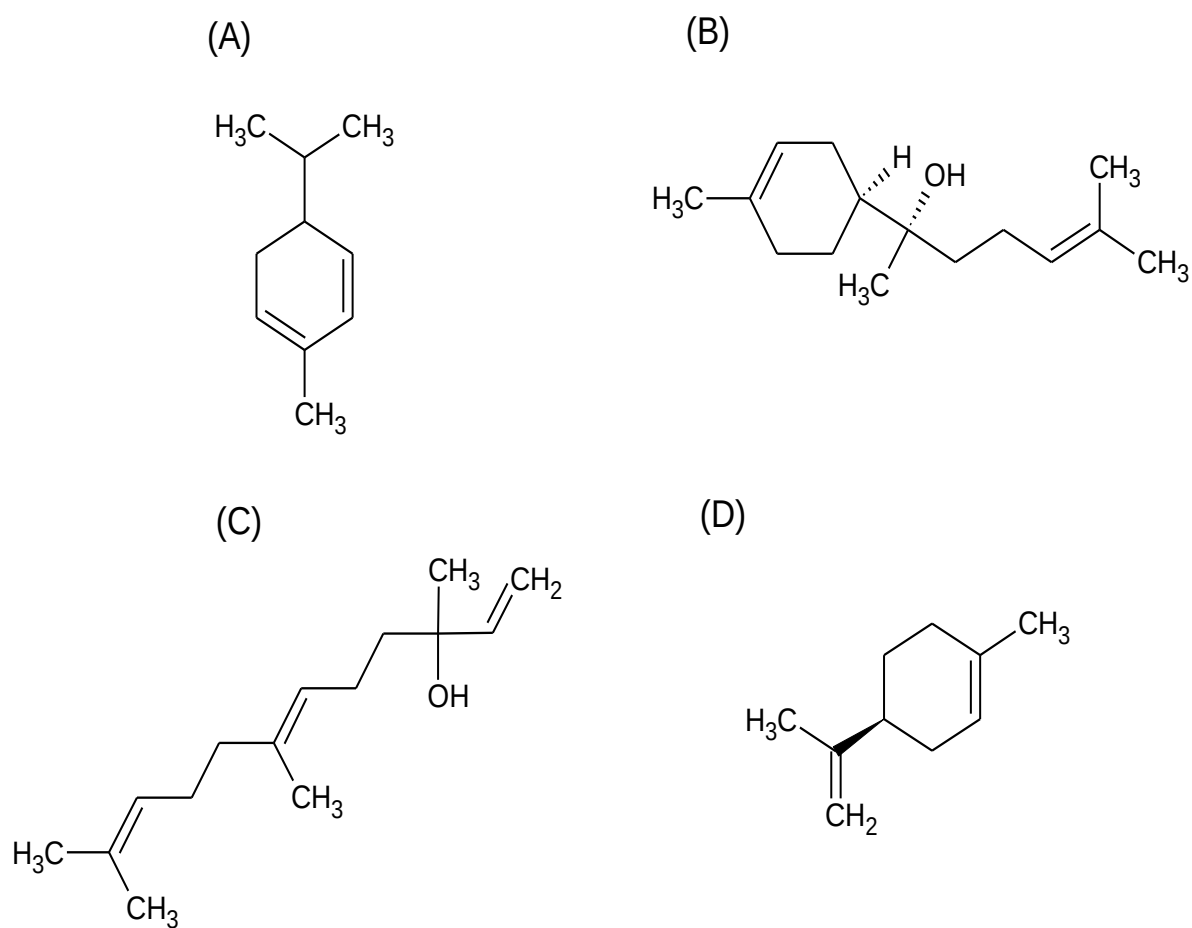


Figura 2. Estructuras de los metabolitos: **(A)**. α -Felandreno, **(B)**. α -Bisabolol, **(C)**. Nerolidol, **(D)**. s-Limoneno. Obtenida usando el software ChemSketch.

2.3.3 Nerolidol: Es un sesquiterpeno alifático también conocido como 3-Hidroxi-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrieno (figura 2 C) que se encuentra en el aceite esencial de plantas como *Virola surinamensi* (Myristicaceae) y *Jasminum Grandiflorum* (Oleaceae) (Arun *et al.*, 2016). A este metabolito se le atribuyen propiedades antimicrobianas, antitumorales, antioxidantes, antinociceptivas, antiúlcerosas, antiinflamatorias e insecticidas. Además, este compuesto ha exhibido propiedades antiparasitarias contra microorganismos como *Plasmodium*, *Babesia*, *Trypanosoma* y *Leishmania* (Oliveira *et al.*, 2017). Estudios llevados a cabo por Saito y colaboradores en un modelo en ratones se concluyó que el tratamiento con Nerolidol vía oral inhibe la parasitemia en un 99% después de 14 días después de la infección por *Schistosoma mansoni* (Saito *et al.*, 2016).

2.3.4 s-Limoneno: También llamado (S)-4-Isopropenil-1-metil ciclohexano es un monoterpeno (figura 2 D) constituyente de aproximadamente el 90% del aceite esencial de naranja. Algunas de las propiedades atribuidas a este compuesto van desde, actividad microbiana (Montironi *et al.*, 2016) citotóxica y también el control de plagas de cultivos (Kostyukovsky *et al.*, 2002). Russo y colaboradores, por ejemplo, reporta citotoxicidad en células de neuroblastoma SH-SY5Y cuyo mecanismo de acción está asociado a la activación de la caspasa-3, escisión de PARP, fragmentación de ADN, encogimiento celular y alteraciones en el citoesqueleto lo que finalmente desencadena la muerte celular por vía apoptótica (Russo *et al.*, 2013). El efecto de este compuesto en la reproducción *Spodoptera frugiperda* fue evaluado por Cruz y coautores, encontrando que este metabolito causa apoptosis testicular y disminución en el período de longevidad de adultos de esta especie evidenciando su potencial insecticida (Cruz *et al.*, 2017).

2.4 Mecanismo de acción

Debido a que los aceites esenciales están constituidos por una mezcla de metabolitos son relativamente no específicos y tienen una amplia gama de dianas moleculares. Algunas son proteínas (enzimas, receptores, canales iónicos, proteínas estructurales), ácidos nucleicos y biomembranas entre otros componentes celulares. Pueden además interferir con ciertos componentes vitales del sistema de señalización celular, o de señalización en el sistema nervioso (tales como síntesis de neurotransmisores, el almacenamiento, la liberación, la unión, y la recaptación de receptores, la activación y función de las enzimas implicadas en la transducción de la señal) y el bloqueo de vías metabólicas (Rattan, 2010).

Trabajos con metabolitos como tuyona, timol, mentol y borneol muestra la interferencia de estas sustancias con los receptores de octopamina y el cierre de los canales cloruro-GABA (Gonzalez *et al.*, 2013). Otro efecto relacionado con el sistema nervioso del insecto se evidencia en estudios realizados en Coleoptera: *Sitophilus oryzae* L (*Curculinidae*), *Rhizopertha dominica* F (*Bostrichidae*), *Tribolium castaneum* Herbst (*Tenebrionidae*), *Oryzaephilus surinamensis* L (*Silvanidae*), *Trogoderma granarium* Everts (*Dermestidae*), donde los componentes mayoritarios de aceites esenciales denominados por los autores como ZP-51 y SEM-76 mostraron interacción con los receptores de octopamina de los insectos (Kostyukovsky et al., 2002)

Otro posible mecanismo de acción de los aceites esenciales está relacionado con la acción neurotóxica, específicamente con la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Rattan, 2010). La acetilcolina (ACh) es un compuesto que a partir de los impulsos nerviosos es transmitido de una célula nerviosa a otra. ACh se almacena en las terminales nerviosas en estructuras llamadas vesículas. El contenido de estas vesículas se libera de las terminaciones nerviosas cuando el nervio

está despolarizado, y por lo tanto la ACh liberada entra en la sinapsis y se une al receptor. La ACh que se libera tiene una vida media muy corta debido a la presencia de grandes cantidades de la acetilcolinesterasa (AChE), una enzima que hidroliza el enlace éster en la molécula, lo que conduce a la pérdida de actividad estimulante (Houghton *et al.*, 2006). La actividad neurotóxica se basa en la estimulación excesiva del sistema colinérgico en el insecto ya que en un principio se presenta hiperactividad, seguida de hiperexcitación lo que provoca el efecto knock down o en español efecto derribo seguido de una rápida inmovilización (Enan, 2001). Aceites extraídos de plantas como, *Salvia officinalis* y *S. lavandulaefolia* (Lamiaceae), muestran inhibición de la AChE atribuida a metabolitos presentes como el 1,8-cineol y alfa-pineno en concentraciones inhibitorias (IC por sus siglas en inglés) de IC₅₀ 670 μ M y 630 μ M respectivamente contra AChE de eritrocitos de bovino (Perry *et al.*, 2002).

Productos de origen vegetal también pueden influenciar el funcionamiento del metabolismo energético mitocondrial afectando las bombas de protones o enzimas específicas, tal es el caso de la rotenona que actúa mediante la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria. La rotenona interfiere con el sistema de transporte de electrones entre NADH deshidrogenasa y coenzima Q disminuyendo el consumo de oxígeno, lo cual se ve reflejado en los insectos en parálisis de las piezas bucales de manera que dejan de alimentarse y mueren de inanición (Story *et al.*, 1981).

Estudios de ADN en electroforesis en gel extraído de cultivos celulares (SCGE por sus siglas en inglés) permite tanto la evaluación cualitativa y cuantitativa de los daños del ADN en células eucariotas. Valiéndose de esta herramienta, se encontró que el aceite esencial de *P. corylifolia* ocasiona daño significativo en el ADN de *Cx. quinquefasciatus* en concentraciones de 0.034 mg/cm² y 0.069 mg/cm². El posible mecanismo de la toxicidad del aceite esencial puede ser a través de la reacción con el ADN o por la generación de EROS (especies reactivas de oxígeno), causando

daños en el ADN incluso en adultos de *Cx. quinquefasciatus*. EROS son generadas por la inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial a través del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Dua *et al.*, 2013).

Además de las posibles formas de acción anteriormente expuestas, se suma el desencadenamiento de la apoptosis. La apoptosis es el suicidio celular para la eliminación de células "no deseadas" durante el desarrollo animal. Las células que mueren por apoptosis presentan cambios morfológicos, como condensación de la cromatina, pérdida de potencial de membrana mitocondrial, asimetría de los fosfolípidos de membrana y el desprendimiento de la matriz celular (Nayak *et al.*, 2012). Varias pruebas realizadas con curcumina (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) un pigmento amarillo, mostraron que este compuesto de origen vegetal también puede generar especies reactivas de oxígeno en líneas celulares como las de cáncer de colon HT-29 conduciendo a la muerte apoptótica de las células (Wang *et al.*, 2009). Estudios con curcumina en *Setaria cervi* (Setariidae) mostraron que este metabolito indujo la depleción del nivel de glutatión (GSH), provocando una elevación muy rápida y significativa en el nivel de EROS, que podría tener un papel en la activación de la caspasa CED-3 que media las vías de apoptosis (Nayak *et al.*, 2012).

Por otro lado, según estudios realizados por el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales-CINTROP, aceites esenciales de plantas como *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) y *L. origanoides* + *S. glutinosa* poseen actividad insecticida contra *A. aegypti*, destacando el aumento en la mortalidad de los insectos obtenida por la mezcla de metabolitos de las dos últimas plantas. Adicionalmente, evaluaron la actividad insecticida de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) en *A. aegypti*, planta que mostró tener efecto ovicida, inhibitorio de la enzima acetilcolinesterasa y el bloqueo del paso de electrones al complejo II de la cadena energética mitocondrial (Castillo, 2015).

Las ciencias biomédicas han venido acrecentando su interés en el estudio de la mitocondria. Este organelo se considera el lugar donde convergen diferentes vías de señalización de muerte celular, tanto en procesos de necrosis como de apoptosis, además de llevarse a cabo importantes ciclos metabólicos energéticos como la fosforilación oxidativa, la cual se estudió en la presente propuesta. Con el gran potencial mostrado por los compuestos mayoritarios de aceites esenciales para su uso como insecticida, se buscó hacer una selección más acertada y efectiva de los componentes activos de una mezcla de metabolitos secundarios de plantas, haciendo uso de herramientas informáticas que proporcionan información relacionada con la toxicidad, solubilidad y actividad enzimática de las moléculas. Estos compuestos fueron seleccionados a partir de una recopilación publicada por Pavela y colaboradores (Pavela, 2015), donde se tienen en cuenta 152 plantas medicinales.

A continuación, se expondrán con mayor detalle cada una de las posibles dianas de los compuestos estudiados, cadena energética mitocondrial, AchE y ADN, abordados en el presente trabajo mediante los ensayos realizados en el laboratorio, cuyos métodos se exponen en la sección de metodología.

2.5 Mitocondria organelo complejo

Las mitocondrias son organelos implicados en una gran variedad de aspectos metabólicos de la célula. Algunas de las funciones que la mitocondria desempeña son el metabolismo energético, control de las respuestas al estrés oxidativo además de ser centro de algunos procesos biosintéticos. Este organelo es el responsable de la energética celular, es fuente primaria de la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno, ayuda en la homeostasis celular de Ca^{2+} y está

relacionado con factores apoptóticos que pueden desencadenar la muerte celular (Vakifahmetoglu *et al.*, 2017).

Por otro lado, algunos estudios demuestran efectos directos e indirectos sobre la mitocondria, provocados tanto por insecticidas como por compuestos extraídos de plantas, es decir, algunas sustancias pueden alterar el normal funcionamiento de este organelo. Un ejemplo de ello se evidencia en el trabajo presentado por Li y colaboradores (Li *et al.*, 2015), en el cual se estudió el efecto de tres insecticidas; cialotrina, alfa-cipermetrina y etofenprox, sobre la actividad del complejo enzimático ATPasa que hace parte del metabolismo energético de la mitocondria, en dos especies de insectos, la araña lobo *Pirata subpiraticus* y la barrena del tallo de arroz *Chilo suppressalis* (Walker) (Li *et al.*, 2015). Al ser evaluados en sus correspondientes dosis letales 50 (DL₅₀), la Cialotrina (DL₅₀ 0.00078 para la araña y 0.0042 µg/individuo para la barrena) inhibió la actividad de la Na⁺-K⁺-ATPasa y la Ca²⁺-Mg²⁺-ATPasa de hasta un 44 y 28% respectivamente en la araña y de 19 y 11% en la barrena de tallo de arroz. Por su parte la alfa-cipermetrina (DL₅₀ 0.00143 en la araña y 0.0036 µg/individuo en la barrena) inhibió los dos tipos de ATPasas (Na-K y Ca-Mg) alrededor de 36 y 27% en la araña lobo mientras que, para la barrena de tallo de arroz, los valores fueron de 12 y 24% respectivamente. Para el etofenprox (DL₅₀ 0.00955 y 0.0127 µg/individuo para la barrena) los valores de inhibición fueron de 23 y 26% para la araña de arroz y 22 y 6% para la barrena.

Estos resultados evidencian los efectos sobre el mecanismo energético mitocondrial que pueden tener los compuestos usados como insecticidas, por tal motivo se expondrá a continuación cada uno de los complejos enzimáticos pertenecientes a la cadena de transporte de electrones que fueron evaluados en la parte experimental del presente trabajo.

2.6 Cadena de transporte de electrones

La mitocondria está presente en el citoplasma de las células aeróbicas eucariotas, su número y tamaño varían de un tipo de célula a otra. Generalmente, sus dimensiones aproximadas son de 0,5-1,0 μm de ancho y 2-3 μm de largo. Este organelo está constituido por dos membranas las cuales forman dos espacios: la matriz mitocondrial, que es el formado entre la membrana interna y el espacio central y el espacio intermembrana (figura 3).

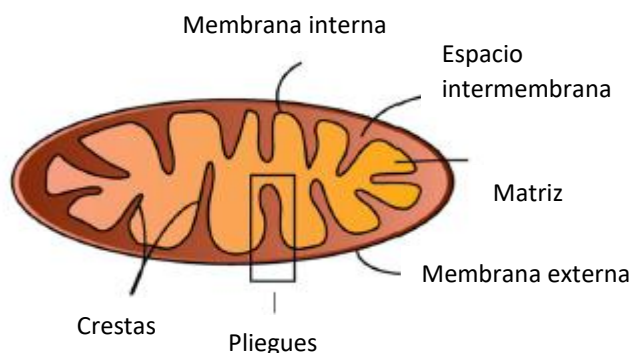


Figura 3. Representación del contorno de una mitocondria. Adaptado de Bhagavan (2011).

La membrana interna cuenta con múltiples pliegues orientados hacia la matriz, conocidos también como crestas, las cuales están constituidas entre un 30-35% en peso por fosfolípidos que les confieren alta fluidez a temperaturas fisiológicas. Entre los componentes de la membrana interna se encuentran una variedad de transportadores de moléculas, una parte del complejo enzimático que sintetiza ATP (ATP sintasa) y las proteínas de la cadena respiratoria (Bhagavan & Ha, 2011).

La cadena mitocondrial de transporte de electrones está conformada por proteínas incrustadas dentro de la membrana interna. Los electrones transportados son capturados de las moléculas

donantes como Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) por el complejo I y succinato por el complejo II y transferidos a un portador (coenzima Q) que los entrega a complejo III (complejo Citocromo b, c1), este al citocromo c, para finalizar su camino en el complejo IV (citocromo oxidasa) donde ocurre la reducción del oxígeno formando moléculas de agua (figura 4). Durante el transporte de electrones se genera un gradiente electroquímico de H^+ ya que algunos de estos complejos proteicos los bombean al espacio intermembrana, permitiendo que la ATP sintasa use este flujo de H^+ devuelta hacia la matriz para generar ATP (Le *et al.*, 2017). A continuación, se presentarán con más detalle cada uno de los complejos.

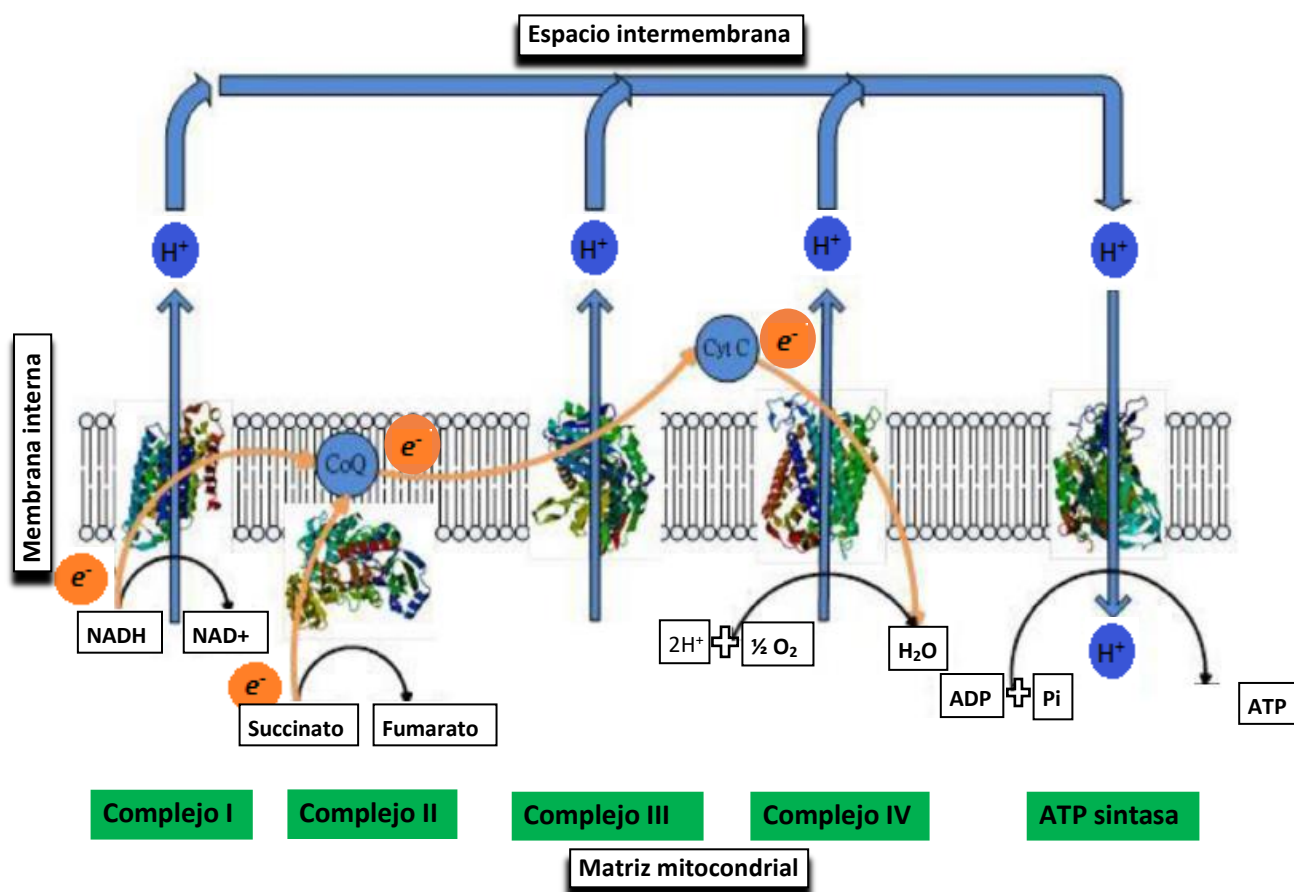


Figura 4. Cadena de transporte de electrones. Adaptada de Le (2017).

2.6.1 Complejo I: Este complejo es conocido como NADH deshidrogenasa o NADH: ubiquinona oxidoreductasa y es el principal punto de entrada de los electrones en la cadena respiratoria, generando el 40% de la fuerza protón motriz, debido a que transloca protones al espacio intermembrana al transportar una pareja de electrones hacia la ubiquinona. Este complejo consta de dos partes, un brazo periférico que se extiende dentro de la fase acuosa y la segunda es un brazo incrustado en la membrana interna (Hellwig *et al.*, 2016). En general este complejo tiene dos tipos de portadores de electrones, flavin mononucleótico (FMN) y algunos centros de hierro azufre. FMN está estrechamente ligado al grupo prostético de la enzima deshidrogenasa y al ser reducido por los equivalentes derivados del NADH se encuentra como FMNH₂. Posteriormente los centros hierro azufre que consisten en átomos de hierro emparejados con un número igual de átomos de azufre, por ejemplo, Fe₄S₄, reciben estos equivalentes y los portan hacia la coenzima Q (figura 5). Estos centros metálicos están organizados de manera que los átomos de hierro y azufre ocupan alternamente las caras de un cubo (Bhagavan & Ha, 2011). En contraste con la sección orientada hacia la matriz mitocondrial, el brazo incrustado en la membrana, no contiene ningún cofactor y estudios llevados a cabo con rayos X, sugieren que esta sección está directamente relacionada con la translocación de los protones debido a la presencia de las tres subunidades que son homólogas a antiporter monovalentes catión/protón interna (Hellwig *et al.*, 2016).

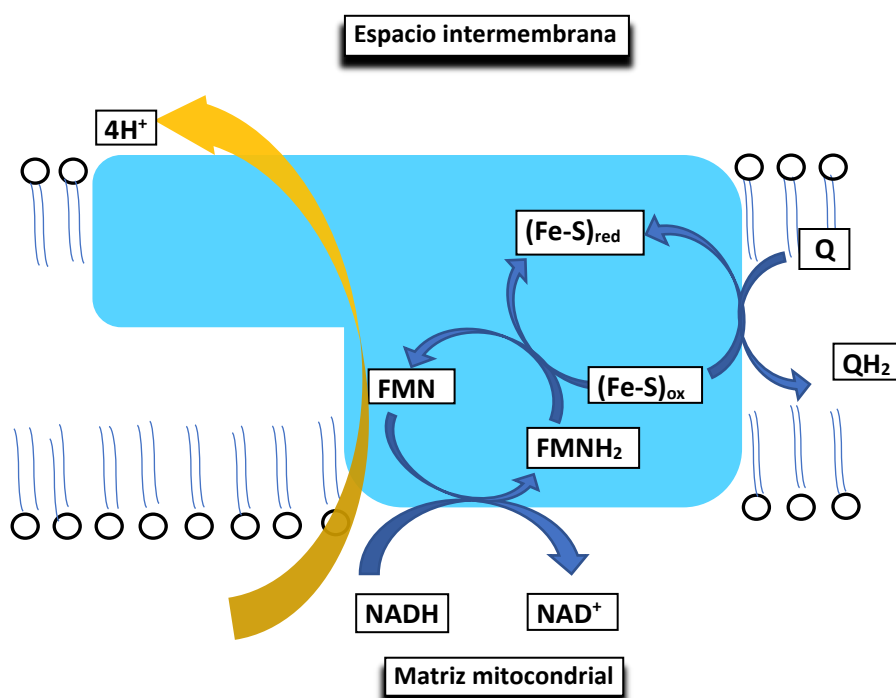


Figura 5. Representación del sistema de reacciones ocurridas en el complejo I.

2.6.2 Complejo II: Este complejo se conoce como succinato deshidrogenasa (SDH) y es una enzima incrustada en la membrana mitocondrial interna, esencial tanto en el metabolismo intermedio como en la producción de energía aeróbica puesto que une la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs, con la reducción de ubiquinona a ubiquinol en la cadena de transporte de electrones. Esta enzima es un tetrámero integrado por cuatro subunidades: dos hidrofílicas y dos hidrofóbicas. La subunidad hidrofílica SDHA es una flavoproteína que junto con la subunidad hidrofóbica SDHB constituida por centros hierro-azufre, están ancladas a la membrana interna mitocondrial por las subunidades SDHC y SDHD (figura 6) (Ugarte, 2014).

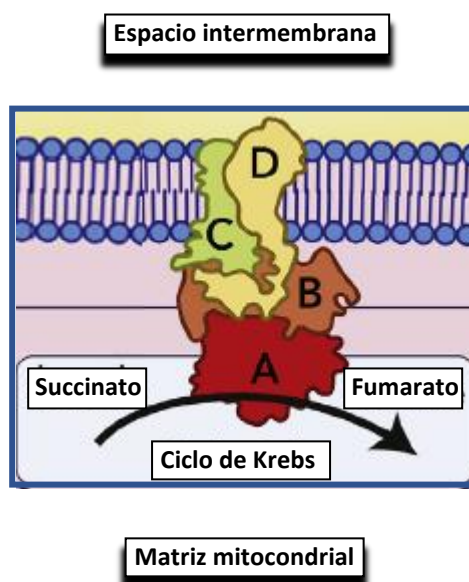


Figura 6. Succinato deshidrogenasa (SDH) complejo II. Adaptado de Settas (2017).

El complejo enzimático SDH contiene un grupo FAD (Flavín adenín dinucleótido) que hace parte del ciclo del ácido tricarboxílico y cataliza la eliminación en posición trans de dos hidrógenos del succinato a fumarato, los hidrógenos son aceptados por el FAD que está unido a la apoproteína por medio de un residuo de histidina (Settas *et al.*, 2017). La reducción de los equivalentes de FADH_2 se produce al pasarlos a la coenzima Q vía centros de hierro azufre (figura 7).

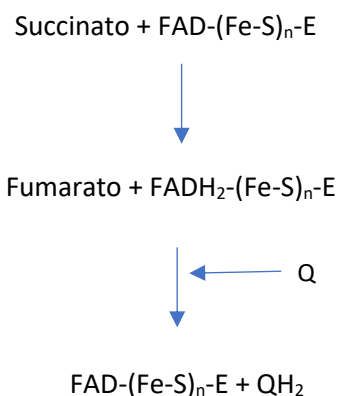


Figura 7. Esquema del sistema redox del complejo II. Adaptado de Bhagavan (2011).

2.6.3 Complejo III: También llamado Ubiquinol citocromo c oxidoreductasa, es un complejo proteico oligomérico multifuncional, localizado en la membrana mitocondrial interna. Este complejo cataliza la transferencia de electrones desde el sustrato ubiquinol (QH_2) al citocromo c (figura 8) acoplado con un translocador de protones hacia el espacio intermembrana (Xia *et al.*, 2013). También conocido como Citocromo c reductasa, el complejo III está constituido por diferentes tipos de citocromo, citocromo b_{562} y b_{566} , los cuales se conocen como citocromo b y citocromo c_1 , además de centros de hierro azufre.

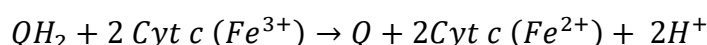


Figura 8. Reacción general llevada a cabo en el complejo III

Relacionada a este complejo está la coenzima Q o Ubiquinona, cuyo rol principal en el transporte de electrones es coleccionar los equivalentes de NADH y FADH_2 y pasarlos al sistema terminal del citocromo. La reducción de Q a QH_2 requiere dos electrones y dos protones (figura 9) y se cree que ocurre mediante un intermediario tal como se muestra a continuación (Kramer *et al.*, 2004):

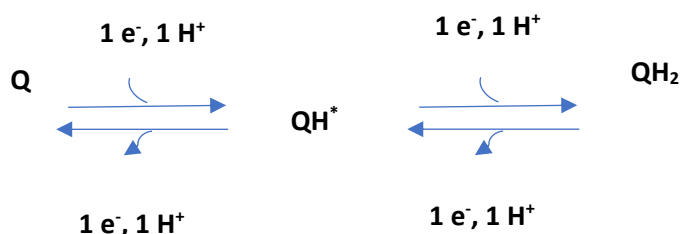


Figura 9. Esquema de la reducción de Q a QH_2 donde el intermediario representa un radical libre.

Los centros de hierro también denominados proteína Rieske (ISP) junto con los citocromos también conocidos como $\text{cyt } \text{b}_\text{H}$ y b_L por su relativamente alto y bajo potencial respectivamente,

constituyen este complejo mitocondrial que posee dos sitios de unión quinona/quinol. Uno de esos sitios, Q_o está localizado en el espacio intermembrana junto a la proteína rieske y actúa para oxidar QH_2 a Q . El otro sitio de unión se denomina Q_i y está localizado cerca al $cyt\ b_H$ hacia la matriz mitocondrial y actúa para la reducción de Q (figura 10). La transferencia de electrones hacia el complejo III ocurre gracias al denominado “ciclo Q” (Kramer *et al.*, 2004).

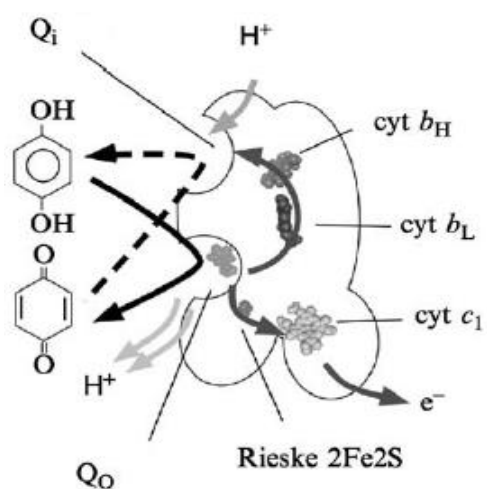


Figura 10. Diagrama esquemático del ciclo de Q. Tomado de Kramer (2004).

El paso central en el ciclo de Q es la oxidación bifurcada de la especie quinol en el sitio Q_o la cual resulta de la transferencia de un electrón al centro hierro azufre ($2Fe_2S$), produciendo una especie conocida como semiquinona (SQ) la cual es oxidada por el $cyt\ b_L$ formando Q . Dos protones provenientes del quinol oxidado son lanzados al espacio intermembrana. Se estima que

por cada electrón transferido al grupo 2Fe2S, dos protones son transportados desde la matriz mitocondrial (Kramer *et al.*, 2004).

2.6.4 Complejo IV: El complejo IV también conocido como Citocromo c oxidasa (CcO) es una enzima terminal del proceso de respiración, presente en la membrana interna mitocondrial y se encarga además de translocar H^+ al espacio intermembrana, de transportar electrones desde cada una de las moléculas de citocromo hasta las moléculas oxígeno, el cual reduce a agua. El proceso redox ocurrido en este complejo enzimático es alimentado por cuatro ciclos en los cuales se ve involucrado el citocromo c. El sitio activo de la proteína unido al oxígeno está integrado por grupos hemo de hierro y un centro de cobre (Vorbürger *et al.*, 2017).

Los electrones son transferidos desde el citocromo c vía complejos binucleares de cobre Cu_A y un grupo hemo a al centro binuclear (BCN) consistente en otro grupo hemo a_3 y a un centro mononuclear de cobre Cu_B donde ocurre la reducción de una molécula de O_2 formando dos de agua (figura 11).

Como se mencionó anteriormente, la citocromo c oxidasa cumple además, la función de translocar protones desde la matriz al espacio intermembrana. Uno de los modelos aceptados supone que la transferencia de electrones está acoplada a la transferencia de un protón en el *sitio de carga de la bomba* (*pump loading site*, PLS por sus siglas en inglés) en donde el protón que será bombeado es cargado temporalmente.

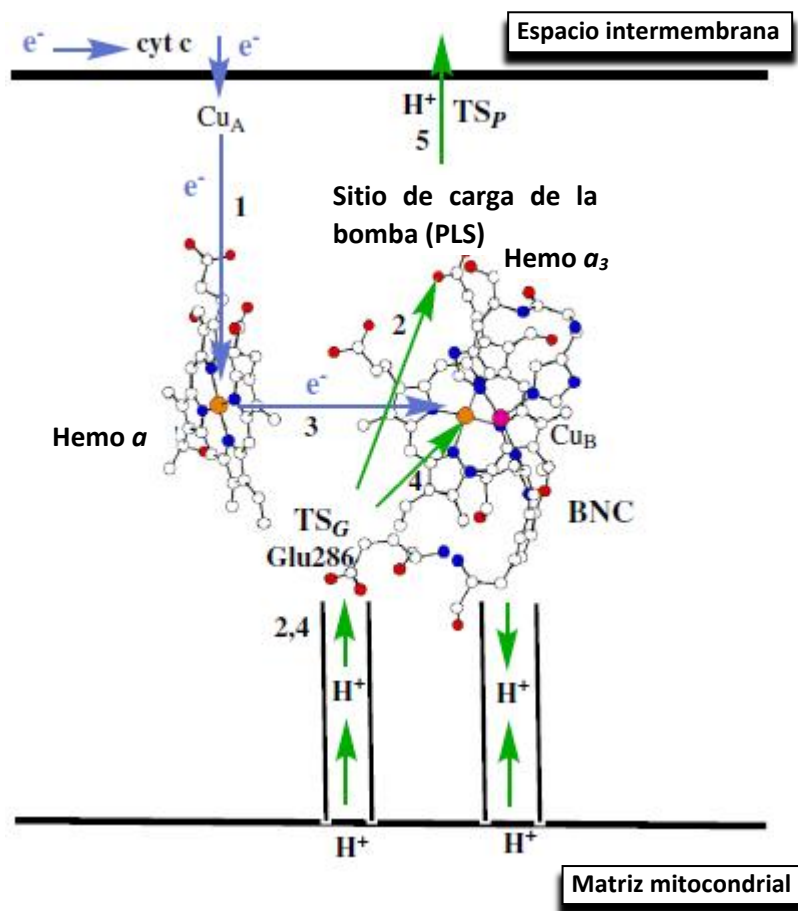


Figura 11. Esquema de la transferencia de electrones y bombeo de protones en la enzima citocromo c oxidasa. Adaptada de Blomberg (2012).

La fuerza que conduce la transferencia del protón se asume que proviene de una interacción electrostática con el electrón entrante. Una vez ocurrida la transferencia de un protón a PLS, otro es tomado en el centro binuclear y la repulsión electrostática de esta segunda carga positiva expulsará el protón en PLS fuera de la enzima al espacio intermembrana.

2.6.5 ATPasa/ ATPsintasa: Para la vida, todo organismo necesita de un adecuado suministro de ATP el cual es producido principalmente por la ATPsintasa. Un tipo de esta enzima es la llamada F-ATPasa, presente en las mitocondrias y funciona mediante el uso del gradiente electroquímico transmembrana para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi), por esta razón, se conoce a este complejo enzimático como el acople entre la producción de ATP y la cadena de transporte de electrones (Bhagavan & Ha, 2011).

Las ATPasas trabajan de forma inversa, usando la energía liberada de la hidrólisis del ATP para bombear protones a través de la membrana. Este complejo enzimático se reconoce con dos nombres según la dirección del trabajo que desempeñe. Si cataliza la síntesis de ATP recibe el nombre de ATP sintasa, si por el contrario cataliza la hidrólisis de ATP en ADP y fosfato libre se reconoce como ATPasa. Tanto ATPasa y ATPsintasa están compuestas por una cabeza globular hidrosoluble F_1 y el subcomplejo F_0 incrustado en la membrana mitocondrial interna. La sección F_1 contiene tres subunidades catalíticas β - y tres no catalíticas α - que se encuentran alternadas en un anillo hexamérico $(\alpha\beta)_3$. El subcomplejo F_0 consiste en un rotor en forma de anillo, algunas subunidades a y b que conforman el estator y otras subunidades hidrofóbicas (Figura 12). En las ATPasas rotativas el tallo central conecta la cabeza catalítica al anillo del rotor el cual puede contener entre ocho a 15 subunidades c (Kuhlbrandt & Davies, 2016).

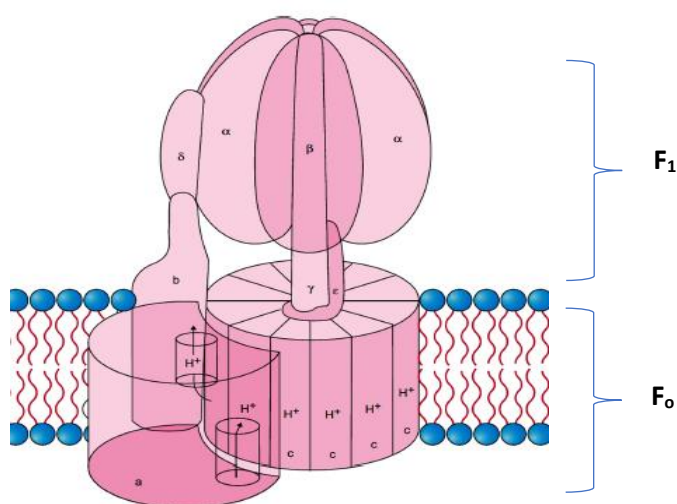


Figura 12. Representación de la estructura del complejo enzimático ATPasa. Adaptado de Bhagavan (2011).

Respecto al funcionamiento de la ATPasa también conocida como complejo V, la explicación adoptada propone un mecanismo de catálisis rotacional en el que los tres sitios activos situados en F_1 alternan la catálisis en la síntesis de ATP. Una de las subunidades β inicialmente adopta la conformación β -ADP el cual une ADP y P_i presente en el medio, posteriormente dicha subunidad cambia de conformación, acogiendo la forma β -ATP que une la molécula de ATP. Finalmente, la subunidad cambia a la conformación β -vacía cuya afinidad por el ATP es baja por lo cual es liberado de la enzima. Los cambios de conformación están promovidos por el paso de protones a través de la porción F_0 de la ATPsintasa (Nelson & Cox, 2008).

Además de los efectos sobre los complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, en el presente trabajo se estudió la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, como aproximación inicial al estudio de los posibles efectos que los metabolitos α -Felandreno, α -

triada catalítica compuesta por 2 aminoácidos aromáticos (Trp84 y Phe330) y Glu199 que se unen mediante interacciones π al amonio cuaternario (figura 14).

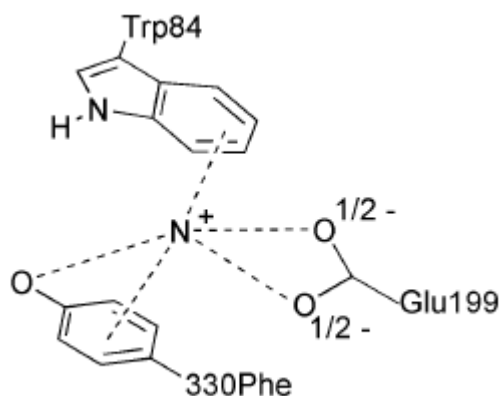


Figura 14. Amonio cuaternario estabilizado por los fragmentos aromáticos de aminoácidos. Adaptado de Houghton (2006).

La forma en que la colina una vez hidrolizada abandona la enzima sigue el mecanismo “back door” (Figura 15). En este mecanismo el producto de la reacción sale a través de la apertura en la parte inferior de base de la enzima AChE por medio de un canal a través del sitio activo (Houghton et al., 2006).

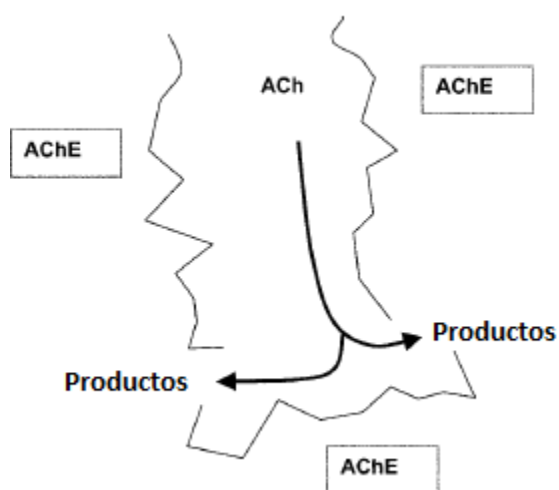


Figura 15. Mecanismo “back door”. Adaptado de Houghton (2006).

La enzima AChE es objeto de estudio desde hace más de 50 años debido a que es diana de numerosos insecticidas, desde piretroides (Carlier *et al.*, 2008) hasta compuestos producto del metabolismo secundario de plantas como la *Chromolaena odorata* (Asteraceae). El aceite esencial de esta planta contiene estigmasterol y hexacosanol, compuestos que además de demostrar propiedades repelentes y larvicidas presentan inhibición de la enzima AChE del vector *Aedes aegypti* y otras especies de dípteros como *Chironomus riparius* y *Cx. quinquefasciatus* (Gade *et al.*, 2017).

Finalmente, se estudió los posibles efectos de los metabolitos α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol, s-Limoneno sobre el ADN de larvas de mosquito *Aedes aegypti*, debido a evidencias encontradas en la literatura, del daño a esta macromolécula debido a compuestos presentes en aceites esenciales de distintas plantas. A continuación, se mencionan algunos trabajos.

2.8 Efectos de compuestos mayoritarios de aceites esenciales sobre el ADN

Los aceites esenciales son mezclas de metabolitos secundarios de plantas a los cuales se les atribuyen numerosos efectos en diferentes targets; algunas de las propiedades que pueden presentar este tipo de sustancias son por ejemplo la actividad antimicrobiana (Prabuseenivasan *et al.*, 2006) y el efecto antioxidante y protector de macromoléculas como el ADN (Burits & Bucar, 2000). Sin embargo, hay compuestos presentes en los aceites esenciales que pueden inducir daño al ADN por vías como por ejemplo el estrés oxidativo. El 1,8-cineol conocido popularmente como eucaliptol, presenta efectos genotóxicos en células humanas de cáncer colorrectal HCT116 y en fibroblastos de hámster línea AA8 cuando son tratadas a 2000 μM durante 24 horas (Dörsam *et al.*, 2015). Compuestos como diterpenoides quinonas contenidos en el aceite esencial de *Salvia officinalis* presentan efectos sobre el material genético. Roileanona, horminona y acetil horminona inducen la creación de rupturas en las hebras de ADN de células humanas de carcinoma de colon Caco-2 y células humanas de hepatoma HepG2 en ensayos *in vitro* en concentraciones $>1 \cdot 10^{-7}$ hasta $1 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Aun cuando los ensayos realizados no permiten dilucidar el mecanismo de la inducción del daño a las hebras de nucleótidos, los autores suponen una relación entre la inhibición de las topoisomerasas I o II generando la activación de señales asociadas al estrés que finalmente inducen apoptosis (Mas *et al.*, 2004).

Estudios posteriores realizados con extractos de *Salvia officinalis*, mostraron la inducción de la apoptosis en células de leucemia L1210 cuyo mecanismo aparente muestra una implicación de las caspasas 9, 8 y 3. La apoptosis causada, mostraba efectos de fragmentación de ADN, la cual fue detectable después de 4 horas de tratamiento a concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Jantová *et al.*, 2014).

Con la información anteriormente expuesta relacionada con los efectos presentados por los metabolitos de las plantas en diferentes organismos, se desarrolló la metodología presentada en el numeral 5, precedida de la siguiente hipótesis.

3 Hipótesis

Mezclas de metabolitos secundarios de distintas plantas, tienen actividad insecticida sobre individuos de *Aedes aegypti* y su mecanismo de acción puede estar relacionado con efectos sobre la cadena energética mitocondrial, ADN y afectar la actividad enzimática de AChE.

4 Metodología

A continuación, se presenta un esquema que resume la metodología desarrollada en el presente trabajo.

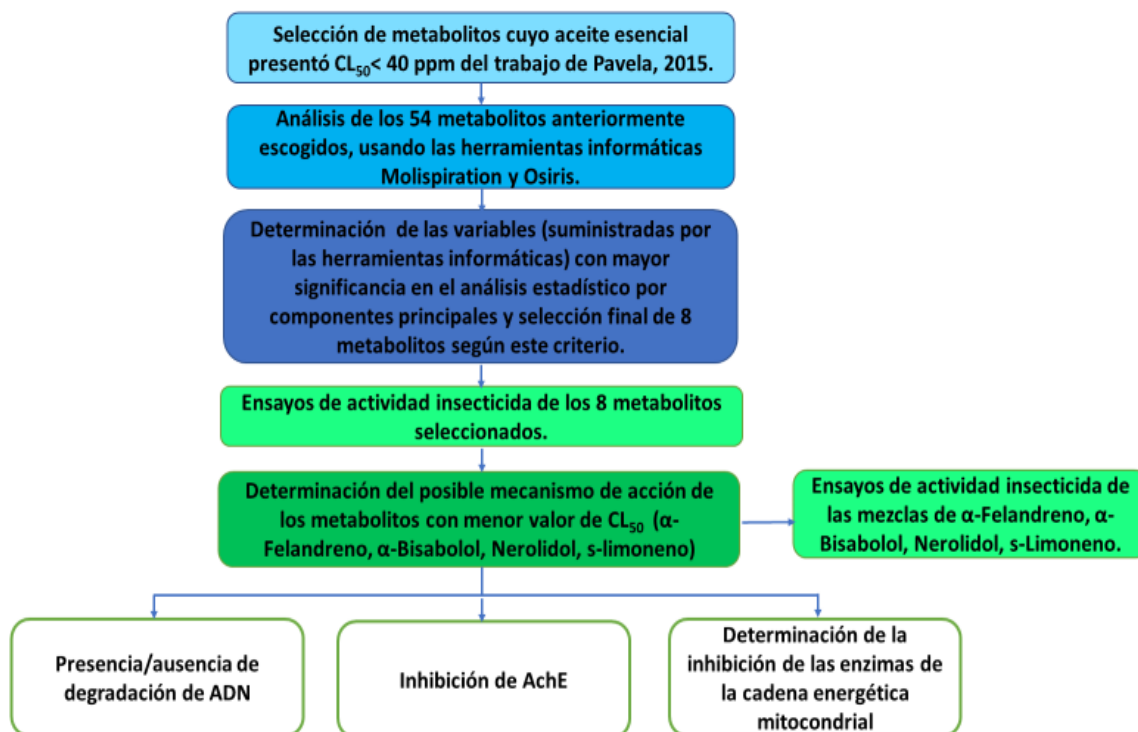


Figura 16. Resumen de la metodología desarrollada.

4.1 Análisis *in silico*:

El análisis *in silico* se realizó a través de un cribado virtual de los componentes mayoritarios de diferentes plantas medicinales con actividad larvicida, mostrados por Pavela y colaboradores (Pavela, 2015). Este equipo de investigadores presenta los resultados de aceites esenciales de 122 plantas (pertenecientes a 26 familias distintas), sobre algunos vectores dentro de los cuales se encuentra *Aedes aegypti*. De la lista presentada por estos autores, se escogieron los componentes de los aceites esenciales cuya CL₅₀ fuera menor a 40 ppm (α -Terpineol, metil alil disulfuro, Dimetil trisulfuro, Cariofileno, Umbellulona, Mirtenol, Mirtenal, α -Humuleno, δ -3-Careno, 1,8-Cineol, Timol, α -Felandreno, Óxido de piperitenona, Metil eugenol, Fenchona, Camfor, γ -Terpineno, p-Cimeno, Benzoato de bencilo, α -Felandreno, Cinamaldeído, Acetato de cinamilo, β -Feladreno, Nerolidol, Linalool, 2,6-octadien-1-ol, Acetato de (E)-3,7-dimetilo, Trans-anetole, (Z)- β -Ocimeno, α -Pineno, Borneol, D-germacreno, B-Cariofileno, s-Limoneno, Terpinoleno, α -Bisabolol, α -Cadinol, Guaiol, Ácido citronélico, α -Copaeno, Terpinen-4-ol, Eugenol, Geraniol (al), Neral, Estragole, β -Pineno, Geijereno, D-Germacreno, 2-Undecanona, 2-nonanona, Acetato de bornilo, 1 H-3a,7 metano azulene, Curcumeno) para realizar el análisis con las herramientas informáticas que se mencionan a continuación.

Para el cribado virtual se usó los programas disponibles en línea, OSIRIS Property Explorer (Organic Chemistry Portal, 2015) y Molinspiration Cheminformatics Software (Molinspiration Cheminformatics, 2015) con el objetivo de calcular los valores de los Parámetros de Lipinski, factores como actividad biológica y riesgos de toxicidad, los cuales, sirvieron como criterio para la elección de los metabolitos a evaluar en las pruebas de laboratorio.

4.2 Análisis estadístico por componentes principales:

Una vez obtenidos los datos del cribado virtual, se realizó un análisis estadístico por componentes principales con los valores obtenidos con las herramientas informáticas especificadas en el numeral anterior. Este paso se hizo con el propósito de reducir la dimensionalidad de las variables y determinar cuáles de ellas contribuyen más a la varianza de cada componente estadístico, utilizando el software IBM SPSS Statistics. Una vez establecidas dichas variables, se seleccionaron 8 metabolitos con los cuales se realizó los ensayos de actividad larvicida que se mencionan en el siguiente numeral.

4.3 Actividad insecticida:

La actividad insecticida de los compuestos escogidos, así como las mezclas de metabolitos seleccionados, se evaluó en individuos de *A. aegypti* cepa Rockefeller que se encontraban entre el tercer y cuarto estadio larval, los cuales pertenecen al Centro de investigaciones en enfermedades tropicales CINTROP, laboratorio de entomología médica.

La colonia se mantuvo en jaulas de cría con dimensiones 40×40×40 cm en un insectario a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad de $70 \pm 5\%$ y fotoperiodo (12:12) suministrándole permanentemente una solución azucarada de miel al 10%. Cada ocho días, se proporcionó a las hembras alimentación sanguínea para la obtención de huevos, utilizando rata albina (*Rattus norvegicus*) de raza Wistar WI IOPS AF/Han, proveniente del bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Lo anterior, cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

4.3.1 Efecto larvicida: Los huevos de *A. aegypti* fueron eclosionados en agua mineral libre de cloro obtenida por osmosis inversa (EC106M-P), y se les suministró alimento para peces marca TetraMin Tropical Flakes ®. Cuando las larvas emergidas estuvieron en estado Larval 3 (L3) y final 4 (L4), 10 individuos fueron transferidos a vasos plásticos de 200 mL con 99,5 mL de agua libre de cloro. A cada vaso se adicionó los compuestos seleccionados, obteniendo un volumen final de 100 mL.

Inicialmente, se realizó un ensayo larvicida *screening* con concentraciones diagnósticas (CD) de 30, 90 y 190 mg * L⁻¹. Posteriormente se tomaron los porcentajes de mortalidad obtenidos, para seleccionar nuevas concentraciones experimentales de bioensayos dosis-respuesta con un menor rango de diferencia entre los valores. Esto se realizó con el objetivo de determinar las concentraciones letales (CL) que ocasionan mortalidad entre 5 y 95%. Se realizaron pruebas por cuádruplicado, para cada concentración evaluada, que fueron repetidas en tres diferentes días, teniendo en cuenta el blanco respectivo usando dimetilsulfóxido (DMSO 0,5%). En cada ensayo se registró la mortalidad a las 24 y 48 horas generada por cada metabolito y 2 y 24 horas para las mezclas finales. Se consideró como muertas aquellas larvas que no presentaron movimiento o que no reaccionaron al movimiento del agua. Los resultados de mortalidad y supervivencia fueron sometidos a análisis Probit (Finney, 1971).

4.4 Determinación del mecanismo de acción

4.4.1 Determinación de la presencia o ausencia de degradación o fragmentación de ADN total de *Aedes aegypti*: Para la determinación de la existencia o ausencia de la degradación o fragmentación de ADN del mosquito, se emplearon larvas en estado 3 de desarrollo (L3) y final larval 4 (L4). El ADN fue extraído siguiendo el protocolo del Kit de extracción ULtraClean®

Tissue & Cells de Laboratorios MO BIOS Inc. Se utilizó *Buffer TBE pH 8.0*, gel de *agarosa 1%*, al cual se le adicionó el agente colorante de ADN SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). Como marcador de peso molecular, se utilizó HyperLadder® 1kb (Bioline) de 200 a 10000 pb.

El diseño experimental contempló el desarrollo de tres réplicas en días diferentes, con distintos tiempos de exposición a los compuestos seleccionados: larvas tratadas durante 24 horas; compuestos adicionados en el momento de la homogenización de las larvas, previa obtención del ADN; y compuestos adicionados directamente sobre ADN extraído. Las condiciones de corrida de la electroforesis fueron: 100 Voltios y 80 miliamperios durante 30 minutos. Una vez se concluido el tiempo de corrida, el gel fue documentado en un transiluminador ENDURO GDS TOUCH® de 302 nm (Labnet International, Inc.).

4.4.1.1 Extracción de ADN de larvas tratadas durante 24 horas: Inicialmente se usó una metodología similar a la realizada para la actividad larvicida; las larvas fueron previamente tratadas durante 24 horas con los compuestos seleccionados en sus correspondientes CL_{50} y posteriormente se realizó la extracción de ADN. El control fue tomado como el ADN de las larvas sin compuestos. Después de 24 horas de exposición, cada pool de larvas de cada metabolito estudiado se homogeneizó individualmente utilizando un homogeneizador tipo Potter y posteriormente se extrajo su ADN.

4.4.1.2 Extracción de ADN de larvas tratado con los compuestos adicionados en el momento de la homogenización: Se tomó un pool de larvas sin tratamiento previo por cada compuesto a evaluar, al cual, en el momento de la homogenización, se adicionó la CL_{50} de cada compuesto a en un periodo de incubación de 2 horas. El ADN obtenido de cada grupo de larvas

homogeneizadas y se agregó a cada pozo para ser corrido en el gel de electroforesis. El control fue tomado como el ADN extraído del homogeneizado sin adición de los compuestos.

4.4.1.3 ADN purificado y tratado directamente con los compuestos mayoritarios: Se realizó una extracción de ADN de un pool de larvas sin tratar y posteriormente se adicionaron los compuestos directamente al material genético. Se agregaron los compuestos evaluados en la CL_{50} y además se tuvo en cuenta el control de ADN sin tratamientos. El tiempo de incubación fue de 5 minutos.

4.4.2 Inhibición de la acetilcolinesterasa: Para la evaluación de la inhibición de la acetilcolinesterasa se usó el método de Ellman (Ellman *et al.* 1961) modificado, el cual se basa en técnicas colorimétricas, reemplazando la acetilcolina por acetil-tiocolina como sustrato debido a que la primera no presenta características espectroscópicas. La acetiltiocolina en presencia de la AchE genera tiocolina que reacciona con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) proporcionando una coloración amarilla (Figura 17) la cual se monitorea a 412 nm.

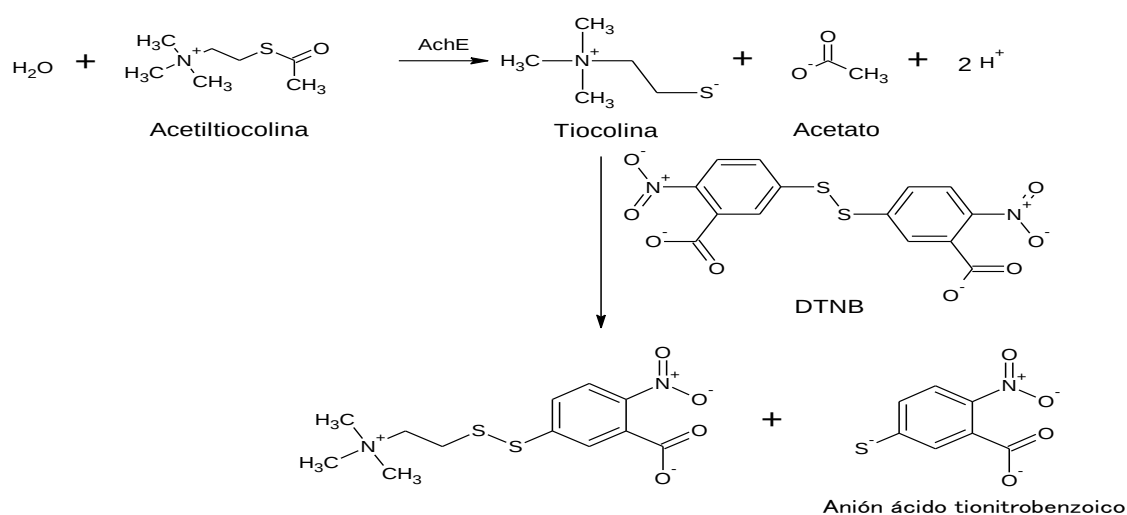


Figura 17. Esquema de la reacción llevada a cabo en el método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961), Obtenida usando el software ChemSketch.

Como control de la reacción se utilizó el medio de reacción sin los metabolitos estudiados. El medio de reacción consistió en (Myers & Slater, 1957) *buffers* fosfato pH= 7,0 y 7,8, las cuales fueron preparadas siguiendo el protocolo descrito por el Ministerio de Salud de Brasil y la Fundación Osvaldo Cruz (Cruz, 2006) como se menciona a continuación:

Solución buffer PBS: esta solución contiene K_2HPO_4 (8 mM) NaH_2PO_4 (2,3 mM) NaCl (0,15 M) Tween 20 (0,05%) a pH 7,8.

Solución sustrato DTNB/Fosfato de Sodio: contiene 0,2 mM de DTNB en 54 mM de NaH_2PO_4 a pH 7.0 y IATCh (0,24 mM), esta solución se mantuvo protegida de la luz. La solución que contiene la enzima se preparó usando buffer PBS para una concentración final en pozo de 0,259 U/mL.

Para la determinación de la inhibición de la enzima AChE se realizaron dos ensayos; uno con acetilcolinesterasa comercial (*Electrophorus electricus*) y otro cuya fuente de la enzima consistió en el homogeneizado de larvas. En ambas pruebas se utilizaron microplacas de 96 pozos, para un volumen final de 200 μ L del sistema de reacción. Para el ensayo de AChE comercial, se agregó a los pozos los compuestos a evaluar, PBS y la solución que contiene la enzima, posteriormente se incubó por 2 minutos y se agregó la solución sustrato para finalmente monitorear la reacción a 405 nm en un bucle cinético de una lectura por minuto, para un total de 60 lecturas en un espectrofotómetro *Multiskan Go-Thermo* empleando el software *SkaniIt RE 4*. En el ensayo de AChE cuya fuente de proteína fue el homogeneizado de larvas, se siguió un protocolo similar, variando solamente la concentración final en pozo de la proteína, (0,5 mg/mL) previa cuantificación usando el método de Bradford (Bradford, 1976)

4.4.3 Efectos de los compuestos estudiados sobre la cadena energética mitocondrial.

4.4.3.1 Aislamiento de mitocondrias de larvas de *Aedes aegypti* para la realización de ensayos enzimáticos: Las larvas fueron separadas del agua de cultivo mediante filtración con una red de plástico y colocadas en medio de aislamiento compuesto por sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, a pH 7.2, EGTA 1 mM y BSA 0.1 % para ser procesadas en homogeneizador tipo Van Potter.

La anterior mezcla obtenida se filtró utilizando lana de vidrio en una jeringa de 25 mL, posteriormente se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos. Se descartó el pellet y el sobrenadante fue centrifugado a 10000 x g durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en medio de aislamiento y fue centrifugado a 7000 x g durante 10 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en medio de aislamiento sin BSA y centrifugado a 7000 x g durante 10 minutos y finalmente resuspendido en medio sin BSA. Durante todo el ciclo de homogeneización y centrifugaciones la temperatura se mantuvo a 4 °C. El producto de la última resuspensión contiene mitocondrias de larva de mosquito, las cuales se mantuvieron en un tanque criogénico hasta su uso.

4.4.3.2 Preparación de la suspensión de mitocondrias para el estudio de la actividad de las enzimas mitocondriales: Las mitocondrias aisladas mantenidas en nitrógeno líquido fueron fragmentadas por 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento (Myers & Slater, 1957) y mantenidas en baño de hielo hasta la realización de los ensayos; lo anterior con el fin de exponer los complejos enzimáticos presentes en la membrana mitocondrial interna. Los fragmentos de membrana obtenidos fueron usados como fuente de enzimas.

Una vez obtenidas las mitocondrias fragmentadas se procedió a cuantificar el contenido de proteínas usando el método de Bradford. Para ello, se realizó una curva de calibración con

soluciones de albúmina de suero bovino (MERK, fraction V) disueltas en la misma buffer fosfato en las que se encuentran resuspendidas las mitocondrias. Estas soluciones patrón y las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro *Multiskan Go-Thermo* en placas de 96 con un volumen final de 200 μL por pozo.

4.4.3.3 Determinación de la actividad de los complejos enzimáticos que constituyen la cadena energética mitocondrial:

4.4.3.3.1 Determinación de la actividad enzimática de NADH Oxidasa: La actividad de la NADH oxidasa se determinó polarográficamente por el método de Singer (Singer, 1974). En este ensayo, la velocidad de oxidación del NADH se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, el principio se representa en la siguiente reacción:

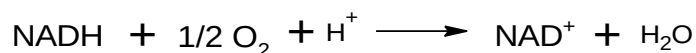
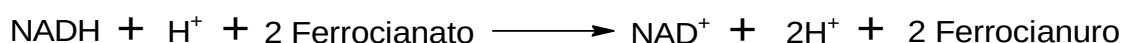


Figura 18. Esquema de la reacción llevado a cabo en el estudio de la NADH oxidasa.

El sistema de reacción consistió en tampón fosfato 80 mM (pH 7,4), EDTA 50 mM, NADH 0,17 mM y 0,1 mg de proteína mitocondrial. Durante el ensayo la temperatura se mantuvo controlada a 28°C y la reacción fue iniciada por la adición de NADH.

4.4.3.3.2 Determinación de la actividad enzimática de Succinato oxidasa: Este ensayo enzimático fue estudiado a través de métodos polarográficos (Singer, 1974) mediante la velocidad de consumo de oxígeno. El sistema de reacción consistió en tampón fosfato 80 mM (pH 7,4), 0,1 mg de proteína mitocondrial y succinato 10 mM el cual, fue el sustrato que dio inicio a la reacción. Durante el procedimiento la temperatura se controló a 28° C.

4.4.3.3.3 Determinación de la actividad de la enzima NADH deshidrogenasa: La actividad de este complejo enzimático se determinó por el método espectrofotométrico descrito por Singer (Singer, 1974), usando ferrocianato como receptor artificial de electrones tal como se representa en la siguiente reacción:



Esquema de la reacción para el estudio de la NADH deshidrogenasa.

La reacción se llevó a cabo en presencia de rotenona y el sistema de reacción fue compuesto por tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2.0 mM, NADH 0,15 mM, ferrocianato 600 mM, rotenona 1 μM , NaCN 1 mM y 0,1 mg de proteína mitocondrial. La reducción del ferrocianato se monitoreó en un espectrofotómetro *Multiskan Go-Thermo* con 60 intervalos de lectura cada segundo a 420 nm en una celda con un volumen final de 1 mL.

4.4.3.3.4 Determinación de la actividad de la enzima Succinato deshidrogenasa: La actividad de la enzima succinato deshidrogenasa fue determinada a través del método descrito por Singer (Singer, 1974), utilizando 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) y fenacina metosulfato

(PMS) como receptores artificiales de electrones. La velocidad de reducción del DCPIP se monitoreó a 600 nm en un sistema de reacción compuesto por tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4), succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM, NaCN 1 mM, rotenona 1 μ M, PMS 1 mM y 0,1 mg de proteína mitocondrial.

Todos los reactivos del sistema de reacción, excepto el PMS y el DCPIP fueron incubados por 10 minutos a 28°C y la reacción fue iniciada por la adición de DCPIP 180 mM. La actividad enzimática fue medida en un espectrofotómetro *Multiskan Go-Thermo* durante 15 minutos.

4.4.3.3.5 Determinación de la actividad de la enzima ATPasa: La actividad ATPasa se determinó según el método descrito por Pullman y colaboradores (Pullman *et al.*, 1960) mediante la cuantificación del fosfato resultante de la hidrólisis del ATP debida a la actividad de la ATPasa. El sistema de reacción consistió en solución tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgSO₄ 3 mM, 0,5 mg de proteína mitocondrial, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 mM y 10 unidades (U) de piruvato quinasa (1 U de piruvato quinasa convierte 1 μ mol de PEP a piruvato por minuto), se incubó a 28°C durante diez minutos. La reacción inició por la adición de ATP 4 mM y fue interrumpida al agregar ácido tricloroacético (TCA) al 5% (v/v) diez minutos después. A continuación, la mezcla de los anteriores reactivos fue centrifugada a 10000 x g por un minuto, de la cual se tomó el sobrenadante para la cuantificación del fosfato presente en el medio. La concentración de fosfato presente en las muestras se determinó espectrofotométricamente gracias a la formación de un complejo color azul de fosfomolibdato reducido con ácido ascórbico, cuya absorbancia se midió a 820 nm (Chen *et al.*, 1956), previa realización de una curva de calibración con soluciones de concentraciones que van desde los 1,0 a 300 μ M de KH₂PO₄.

4.4.3.3.6 Determinación de la actividad de la enzima Succinato Citocromo c reductasa:

La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente por el método de Somlo (Somlo, 1965), mediante el monitoreo de la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm. El sistema de reacción se constituye de: tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, succinato de sodio 5 mM, citocromo c (oxidado) 40 mM, NaCN 1 mM e 80 µg de proteína mitocondrial. Todos los reactivos excepto el citocromo c, se incubaron por 10 min a 28°C, la reacción fue iniciada por la adición del citocromo c, siendo seguida durante 2 minutos a 550 nm.

4.4.3.3.7 Determinación de la actividad de la enzima Citocromo C oxidasa: Usando el método de Mason (Mason, 1973) se determinó la actividad enzimática, medida por medio de la velocidad de oxidación del citocromo c a 550 nm. El sistema de reacción estuvo constituido por tampón fosfato 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, citocromo c 10 µM (reducido mediante la utilización de ditionito de sodio) y 0,1 mg de proteína. La concentración de citocromo c reducido que es quien dispara la reacción, se determinó usando la ley de Beer mediante su coeficiente de extinción molar $\epsilon = 29,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 550 nm.

4.4.4 Actividad insecticida de mezclas de metabolitos: Una vez realizados los ensayos de actividad enzimática y efectos sobre el ADN se hicieron ensayos de actividad larvicida, esta vez de todas las posibles mezclas de los metabolitos en sus respectivas CL₅₀ con el objetivo de determinar con cuales de estos compuestos se obtiene mejores porcentajes de mortalidad en larvas de *A. aegypti*, siguiendo la metodología descrita en el ítem de efecto larvicida mencionada anteriormente.

4.4.4.1 Mezclas evaluadas: Las mezclas con las cuales se trataron las larvas durante 24 horas se elaboraron combinando los 4 metabolitos con mayor actividad larvícida en sus correspondientes CL_{50} , según los ensayos descritos en el numeral 5.3. Posteriormente se mezcló 3 y 2 metabolitos en todas sus posibles combinaciones de los 4 compuestos elegidos.

4.5 Análisis estadísticos de los resultados

Los ensayos correspondientes a la actividad larvícida y actividad enzimática fueron realizados por triplicado en 3 días independientes. Los resultados fueron reportados con la media $\pm$ desviación estándar. Además, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0,05$) y el test Tukey para la comparación de medias, con el objetivo de determinar los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles, utilizando el software *GraphPad Prism 5*. Para el cálculo de las concentraciones letales de cada metabolito se empleó el análisis Probit (Finney, 1971). Para tal fin, se introdujo como variables al software los resultados obtenidos en los ensayos de actividad larvícida.

5 Resultados y discusión

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en la selección de los metabolitos a partir del uso de herramientas informáticas, así como los resultados de actividad larvícida, enzimática y efectos sobre el ADN que tuvieron los compuestos escogidos, sobre el vector *Aedes aegypti*.

5.1 Análisis

in

silico

Partiendo de la información presentada en el trabajo de Pavela y colaboradores (tabla 1) (Pavela, 2015) se escogieron aquellos aceites esenciales que presentaron una concentración letal 50 (CL₅₀) menor a 40 ppm (resaltados en la tabla mostrada a continuación) para realizar los correspondientes análisis de los compuestos constituyentes con las herramientas informáticas.

Tabla 1.

Metabolitos presentados por Pavela y colaboradores, 2015.

Especie de planta y familia	Constituyentes mayoritarios	CL ₅₀ (ppm) 24 horas	Organismo diana
<i>Amaranthaceae</i> <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	α -Terpineol	35	<i>A. aegypti</i>
<i>Amaryllidaceae</i> <i>Allium macrostemon</i> Bunge	Metil propil disulfuro; dimetil trisulfuro	73	<i>A. albopictus</i>
<i>Allium monanthum</i> Maxim.	Dimetil trisulfuro; dimethyl tetrasulfide	23	<i>A. aegypti</i>
<i>Allium victorialis</i> L. var. <i>platyphyllum</i>	alil metil disulfuro; dimetil trisulfuro	24	<i>A. aegypti</i>
<i>Anacardiaceae</i>	α -Pineno; ciclopentano	59	<i>C. pipiens</i>

<i>Pistacia terebinthus</i> L.			
subsp.			
<i>palaestina</i> (Boiss.)			
Engler			
<i>Spondias purpurea</i> L.	Óxido de cariofileno; α -cadinol	39	<i>A. aegypti</i>
Annonaceae	Acetato de bencilo; linalool;	52	<i>A. aegypti</i>
<i>Cananga odorata</i> (Lam.) Hook. F & Thomson	Metil benzoato		
<i>Guatteria blepharophylla</i> Mart.	Óxido de cariofileno	58	<i>A. aegypti</i>
<i>Guatteria friesiana</i> Erkens	α -, β y γ -eudesmol	52	<i>A. aegypti</i>
<i>Guatteria hispida</i>	β -Pineno; α -pineno; (E)-cariofileno	85	<i>A. aegypti</i>
Apiaceae	B-felandreno, derivados de	31	<i>A. aegypti</i>
<i>Angelica purpureaefolia</i> Chung.	pirimidina, nerolidol		
<i>Apium graveolens</i> L.	D-limoneno	42	<i>A. aegypti</i>
<i>Bupleurum fruticosum</i> L.	α -Pineno, β -pineno	64	<i>C. pipiens</i>
<i>Carum carvi</i> L.	Carvona, limoneno	54	<i>A. aegypti</i>
<i>Conopodium capillifolium</i> (Guss.) Boiss	α -Pineno, sabineno	68	<i>C. pipiens</i>
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Linalool, acetato de 2,6-octadien-1-ol,	20	<i>A. aegypti</i>

3,7-dimetil.

<i>Elaeoselinum</i>	α -Pinen, sabineno	96	<i>C. pipiens</i>
<i>asclepium (L.)</i>			
<i>Bertol</i>			
<i>Ferulago</i>	(Z)- β -Ocimeno, α -pineno	12	<i>An. stephensi</i>
<i>carduchorum Boiss</i>			
<i>Foeniculum vulgare</i>	Trans-anetole	49	<i>A. aegypti</i>
<i>Mill.</i>			
<i>Heracleum</i>	Octil acetato, limoneno	77	<i>C. pipiens</i>
<i>sphondylium ssp.</i>			
<i>Oenanthe</i>	γ -terpineno, o-cimeno	40	<i>C. pipiens</i>
<i>pimpinelloides L.</i>			
<i>Pimpinella anisum L.</i>	Trans anetole	27	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Seseli montanum</i>	α -Pinen, sabineno	86	<i>C. pipiens</i>
<i>Apocynaceae</i>	Cedren-9-nona, α -cadinol	77	<i>An. stephensi</i>
<i>Cionura erecta (L.)</i>			
<i>Griseb</i>			
<i>Araliaceae</i>	γ -Elemeno,	62	<i>A. aegypti</i>
<i>Dendropanax</i>	tetrametiltriciclohidrocarbono		
<i>morbifera Leveille</i>			
<i>Asteraceae</i>	1,8-Cineole, camfor,	49	<i>An. anthropophagus</i>
<i>Artemisia gilvescens</i>	D-germacreno		
<i>Miquel</i>			
<i>Blumea densiflora</i>	Borneol, D-germacreno, β -	10	<i>An. anthropophagus</i>
<i>D.C.</i>	cariofileno		

<i>Blumea mollis</i>	Linalool, γ -elemeno, copaeno, estragole	10	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Tagetes erecta</i> L.	piperitona	79	<i>A. aegypti</i>
<i>Tagetes filifolia</i> Lag.	Trans-anetole	47	<i>A. aegypti</i>
<i>Tagetes lucida</i>	Metil-chavicol	66	<i>A. aegypti</i>
<i>Tagetes minuta</i>	Tras-ocimenona	52	<i>A. aegypti</i>
<i>Tagetes patula</i>	Limoneno, terpinoleno	13	<i>A. aegypti</i> , <i>C. quinquefasciatus</i> , <i>An. stephensi</i> ,
<i>Boraginaceae</i>	α -Bisabolol, β -cadinol	3	<i>A. aegypti</i>
<i>Auxemma glazioviana</i> Taub.			
<i>Cordia curassavica</i>	α -Pinenos	97	<i>A. aegypti</i>
<i>Cordia leucomalloides</i>	δ -Cadinene;	63	<i>A. aegypti</i>
<i>Taroda</i>	(E)-cariofileno		
<i>Cupressaceae</i>	Guaiol, ácido citronélico	0,7	<i>A. aegypti</i>
<i>Callitris glaucophylla</i> Joy			
<i>Cryptomeria japonica</i>	16-Kaureno, elemol, eudesmol, sabinene	56	<i>A. aegypti</i>
<i>Cunninghamia konishii</i> Hayata	Cedrol	85	<i>A. aegypti</i> , <i>A. albopictus</i>
<i>Cunninghamia konishii</i> Hayata	α -Pinenos, γ -muroleno, p-cimeno	91	<i>A. aegypti</i>
<i>Cupressus arizonica</i> Greene	Trans-murola-3,5-dieno, cis-14-nor-murol-5-en-4-one	64	<i>A. albopictus</i>
<i>Cupressus benthamii</i>	Limoneno, umbellulona	37	<i>A. albopictus</i>

<i>Cupressus macrocarpa</i>	Sabineno, α -pineno, 4-terpineol	54	<i>A. albopictus</i>
<i>Cupressus sempervirens</i>	α -Pineno, δ -3-careno	54	<i>A. albopictus</i>
<i>Cupressus torulosa</i>	α -Pineno, δ -3-careno	57	<i>A. albopictus</i>
<i>Chamaecyparis formosensis</i>	Mirtenol, mirtenal	41	<i>A. aegypti</i> , <i>A. albopictus</i>
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	Limoneno, oplopanonil	47	<i>A. albopictus</i>
<i>Juniperus communis</i>	α -Pineno, sabineno, δ -3-careno	65	<i>C. pipiens</i>
<i>Juniperus drupacea</i>	α -Pineno, limoneno	26	<i>C. pipiens</i>
<i>Juniperus foetidissima</i>	Sabineno, 4-metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexen-1-ol	53	<i>C. pipiens</i>
<i>Juniperus oxycedrus</i>	α -pineno, mirceno, D-germacreno	55	<i>C. pipiens</i>
<i>Juniperus phoenicea</i>	α -Pineno, δ -3-careno, β -Felandreno, acetato de α -terpinil	55	<i>C. pipiens</i>
<i>Tetraclinis articulata</i>	α -pineno, acetato de bornilo,	70	<i>A. albopictus</i>
<i>Euphorbiaceae</i>	B-trans-guaieno	94	<i>A. aegypti</i>
<i>Croton argyrophylloides</i>			
<i>Croton nepetaefolius</i>	Metileugenol	66	<i>A. aegypti</i>
<i>Croton sonderianus</i>	Espatulenol	55	<i>A. aegypti</i>
<i>Croton zehntner</i>	(E)-anetole	56	<i>A. aegypti</i>
<i>Fabaceae</i>	β -Cariofileno, α -humuleno	18	<i>A. aegypti</i>

Copaifera multijuga***Haynet***

<i>Hymenaea courbaril</i>	α -Copaeno, espatulenol	15	<i>A. aegypti</i>
<i>Psoralea corylifolia</i>	Óxido de cariofileno, fenol,4-(3,7-dimetol-3-etenilocta-1,6dienil), cariofileno	63	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Gramineae</i>	Neral, geranial	69	<i>A. aegypti</i>
<i>Cymbopogon citratus</i>			
<i>Hypericaceae</i>	α -Pinenol	82	<i>C. pipiens</i>
<i>Hypericum scabrum</i>			
<i>Lamiaceae</i>	Timol	72	<i>A. albopictus</i>
<i>Coleus aromaticus</i>			
<i>Hyptis martiusii</i>	δ -3-careno, 1,8-cineol	18	<i>A. aegypti</i> , <i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Lavandula gibsoni</i>	α -Terpinoleno, timol	48	<i>A. aegypti</i> , <i>An. stephensi</i> , <i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Lippia sidoides</i>	Timol, α -felandreno	20	<i>A. aegypti</i> , <i>C. quinquefasciatus</i> ,
<i>Mentha piperita</i>	L-(-)mentol	54	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Mentha longifolia</i>	Óxido de piperitenona	17	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Mentha spicata</i>	Carvona, carveol, limoneno	62	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Ocimum americanum</i>	(E)-Metil-cinamato	67	<i>A. aegypti</i>
<i>Ocimum basilicum</i>	Linalol, metil eugenol	14	<i>C. tritaeniorhynchus</i> , <i>A. albopictus</i>
<i>Ocimum gratissimum</i>	Eugenol, 1,8-cineole	60	<i>A. aegypti</i>
<i>Ocimum sanctum</i>	Metileugenol	85	<i>A. aegypti</i>

<i>Plectranthus amboinicus</i>	Carvacrol	52	<i>A. aegypti</i>
<i>Plectranthus amboinicus</i>	Carvacrol, timol	55	<i>An. gambiae</i>
<i>Plectranthus mollis</i>	Óxido de piperitona, fenchona	25	<i>A. aegypti</i> , <i>An. stephensi</i>
<i>Pulegium vulgare</i>	Pulegona, carvona	64	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,8-cineole, camfor	38	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Satureja hortensis</i>	γ-terpineno, carvacrol	36	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Thymus leucospermus</i>	p-cimeno	34	<i>C. pipiens</i>
<i>Thymus satureoides</i>	Timol, borneol	43	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Thymus teucrioides</i>	p-cimeno, γ-terpineno, timol	23	<i>C. pipiens</i>
<i>Thymus vulgare</i>	p-cimeno, timol	33	<i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Vitex agnus castus</i>	Trans-β-cariofileno, cineole	1,8- 83	<i>C. pipiens</i>
<i>Lauraceae Cinnamomum impressicostatum</i>	Bencil benzoato, α-felandreno	11	<i>A. aegypti</i>
<i>Cinnamomum microphyllum</i>	Bencil benzoato	7	<i>A. aegypti</i>
<i>Cinnamomum mollissimum</i>	Bencil benzoato	10	<i>A. aegypti</i>
<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	Cinamaldehído, acetato cinamilo	36	<i>A. aegypti</i>
<i>Cinnamomum pubescens</i>	Benzoato de bencilo	13	<i>A. aegypti</i>
<i>Cinnamomum rhyncophyllum</i>	Benzoato de bencilo	6	<i>A. aegypti</i>

<i>Cinnamomum</i>	β -felandreno, linalol	22	<i>A. aegypti</i>
<i>scortechinii</i>			
<i>Lindera obtusiloba</i>	α -Copaeno, β -cariofileno	24	<i>A. aegypti</i>
<i>Blume</i>			
<i>Meliaceae</i>	Epóxido de cariofileno,	48	<i>A. aegypti</i>
<i>Guarea humaitensis</i>	epóxido de humuleno		
<i>Guarea scabra</i>	Cis-cariofileno	98	<i>A. aegypti</i>
<i>Myrtaceae</i>	1,8-Cineole, acetato de α -	55	<i>A. aegypti</i>
<i>Eucalyptus</i>	terpinil		
<i>camaldulensis</i>			
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Citronelal, citronelol, α -	71	<i>A. aegypti</i>
	humuleno, isopulegol		
<i>Eucalyptus dunnii</i>	γ -terpineno, 1,8-cineole	25	<i>A. aegypti</i>
<i>Eucalyptus grandis</i>	α -pineno, β -pineno, 1,8-	32	<i>A. aegypti</i>
	cineole		
<i>Eucalyptus gunnii</i>	1,8-Cineole, p-cimeno, β -	21	<i>A. aegypti</i>
<i>Hook</i>	felandreno		
<i>Eucalyptus saligna</i>	1,8-cineole, p-cimeno	22	<i>A. aegypti</i>
<i>Eucalyptus</i>	β -felandreno, 1,8-cineole	22	<i>A. aegypti</i>
<i>tereticornis</i>			
<i>Eugenia melanadenia</i>	1,8-cineole	85	<i>A. aegypti</i>
<i>Eugenia triquetra</i>	Linaool, limoneno, α -pineno	65	<i>A. aegypti</i>
<i>Pimenta racemosa</i>	Terpinen-4-ol, 1,8-cineol	27	<i>A. aegypti</i>
<i>Psidium guajava</i>	β -cariofileno, 1,8-cineole	25	<i>A. aegypti</i>
<i>Psidium rotundatum</i>	1,8-cineole, α -pineno	63	<i>A. aegypti</i>
<i>Syzigium aromaticum</i>	Eugenol	21	<i>A. aegypti</i> , <i>C. quinquefasciatus</i>
<i>Pinaceae</i>	α -pineno, β -pineno	67	<i>A. albopictus</i>

Pinus brutia

<i>Pinus halepensis</i>	β -cariofileno	70	<i>A. albopictus</i>
<i>Pinus stankewiczii</i>	D-germacreno, α -pineno, β -pineno	82	<i>A. albopictus</i>
<i>Piperaceae</i>	β -pineno	57	<i>A. aegypti</i>
<i>Piper aduncum</i>			
<i>Piper auritum</i>	safrole	17	<i>A. aegypti</i>
<i>Piper capense</i>	δ -cadineno	34	<i>An. gambiae</i>
<i>Piper hostmanianum</i>	Asaricina, miristicina	54	<i>A. aegypti</i>
<i>Piper klotzschianum</i>	1-butyl-3,4-metilenodioxibenceno	13	<i>A. aegypti</i>
<i>Piper marginatum</i>	(z)-asarona, patchoulí	23	<i>A. aegypti</i>
<i>Piper permucronatum</i>	Dilapiola, miristicina	47	<i>A. aegypti</i>
<i>Pittosporaceae</i>	Undecano, L-limoneno, 4-	58	<i>A. aegypti</i>
<i>Pittosporum tobira</i>	metil-1,3-pentadieno		
<i>Poaceae</i>	Geranial, neral	17	<i>A. aegypti</i>
<i>Cymbopogon flexuosus</i>			
<i>Rutaceae</i>	s-Limoneno	39	<i>C. pipiens</i>
<i>Citrus aurantium</i>			
<i>Citrus hystrix</i>	B-pineno, D-limoneno, terpieno-4-ol	30	<i>A. aegypti</i>
<i>Citrus limon</i>	Limoneno	30	<i>C. pipiens</i>
<i>Citrus reticulata</i>	D-limoneno, Y-terpineno	15	<i>A. aegypti</i>
<i>Blanco</i>			
<i>Citrus sinensis Osbeck</i>	Limoneno	20	<i>A. aegypti</i>
<i>Clausena excavata</i>	Safrol, terpinoleno	41	<i>A. aegypti</i> , <i>A. albopictus</i>
<i>Burm</i>			

<i>Feronia limonia</i>	Estragol, β -pineno	22	<i>An. stephensi</i> , <i>A. aegypti</i>
<i>Chloroxylon swietenia</i>	Geijereno, limoneno, D-germacreno	16	<i>An. stephensi</i> , <i>A. aegypti</i>
<i>Ruta chalepensis</i>	2-undecanona, 2-nonanona	22	<i>A. aegypti</i> , <i>An. quadrimaculatus</i> , <i>A. albopictus</i>
<i>Swinglea glutinosa</i>	B-pineno, α -pineno, piperitenona	65	<i>A. aegypti</i>
<i>Toddalia asiatica</i>	Geraniol. D-limoneno, isopimpinellina,	69	<i>A. albopictus</i>
<i>Zanthoxylum armatum</i>	Linalool, limoneno	54	<i>A. aegypti</i> , <i>An. stephensi</i>
<i>Zanthoxylum avicennae</i>	1,8-cineole	48	<i>A. albopictus</i>
<i>Zanthoxylum limonella</i>	D-limoneno, terpinen-4-ol	55	<i>A. aegypti</i> , <i>An. dirus</i> ,
<i>Zanthoxylum oxyphyllum</i>	Metil heptil cetona	7	<i>A. aegypti</i>
<i>Scrophulariaceae</i>	α -humuleno	73	<i>A. aegypti</i>
<i>Capraria biflora</i>			
<i>Stemodia maritima</i>	β -Cariofileno, óxido de cariofileno	23	<i>A. aegypti</i>
<i>Valerianaceae</i>	Acetato de bornilo	34	<i>A. aegypti</i>
<i>Valeriana fauriei</i>			
<i>Verbenaceae</i>	(Z)-cariofileno,	42	<i>A. aegypti</i>
<i>Lantana camara</i>	biciclogermacreno		
<i>Lippia alba</i>	Carvona, limoneno	44	<i>A. aegypti</i>

<i>Lippia origanoides</i>	Carvacrol, p-cimeno	53	<i>A. aegypti</i>
<i>Lippia sidoides</i>	Timol	63	<i>A. aegypti</i>
<i>Zingiberaceae</i>	Metanoazuleno, curcumeno	36	<i>A. aegypti</i>
<i>Curcuma aromatica</i>			
<i>Curcuma zedoaria</i>	1,8-cineole, p-cimeno	55	<i>A. aegypti</i>
<i>Kaempferia galanga</i>	Ácido 2-propanoico	53	<i>A. aegypti</i>
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberano, citronelol	46	<i>A. aegypti</i>
<i>Zingiber zerumbet</i>	α -humuleno, zerumbona	48	<i>A. aegypti</i>

Metabolitos usados como punto de partida para el estudio y selección de los compuestos a estudiar en el presente trabajo. Se resaltan los valores de CL₅₀ menores a 40 ppm de los aceites seleccionados para evaluar sus componentes mayoritarios con las herramientas informáticas mencionadas en el numeral 5.1

Una vez seleccionados los 53 metabolitos por su valor de CL₅₀, se procedió a analizar cada uno de ellos con las herramientas informáticas Osiris y Molinspiration. Este procedimiento se hizo con el fin de conocer propiedades como los parámetros de Lipinski y el posible efecto tóxico, clasificado como alto, medio y bajo en las categorías de mutagenicidad, tumorigenicidad, efectos irritantes y teratogénicos. Igualmente, con el uso de estas herramientas se obtuvo una estimación de la actividad biológica, enmarcada en el comportamiento como receptor acoplado a proteínas G (GPCR por sus siglas en inglés) modulador de canal iónico, inhibidor de kinasas, receptor nuclear de ligando, inhibidor de proteasa e inhibidor enzimático Apéndice A.

Una vez obtenidos todos los valores correspondientes a las propiedades físicas y de actividad biológica suministradas por Osiris y Molinspiration para los 52 compuestos seleccionados según su CL₅₀, se procedió a realizar un análisis estadístico por componentes principales. Este análisis se

realizó con el fin de discriminar cuales de las 14 variables suministradas por los programas estaban más relacionadas con la bioactividad de los compuestos y podrían ser las responsables de su actividad larvica.

5.2 Análisis de componentes principales

La idea principal del análisis por componentes principales es la transformación de un conjunto de variables, en este caso las analizadas con Osiris y Molispirations, en un nuevo agrupamiento que se denomina componentes principales. Este análisis se realizó con el objetivo de disminuir la dimensionalidad de las variables suministradas por las herramientas informáticas anteriormente descritas, de forma que se pueda elegir más adecuadamente el criterio de selección final de los metabolitos, con base en la intercorrelación de los datos según la información que cada variable tiene incorporada.

Los resultados del gráfico de sedimentación muestran (principalmente por el cambio de pendiente de la gráfica del primer al segundo factor (Figura 20) y por los valores de la tabla 1), que el primer componente es el que reúne el mayor porcentaje de varianza, por lo cual se escogió para conocer cuáles de las variables que contiene presentan la mayor significancia y de esta manera tener un criterio final de selección de los compuestos a evaluar.

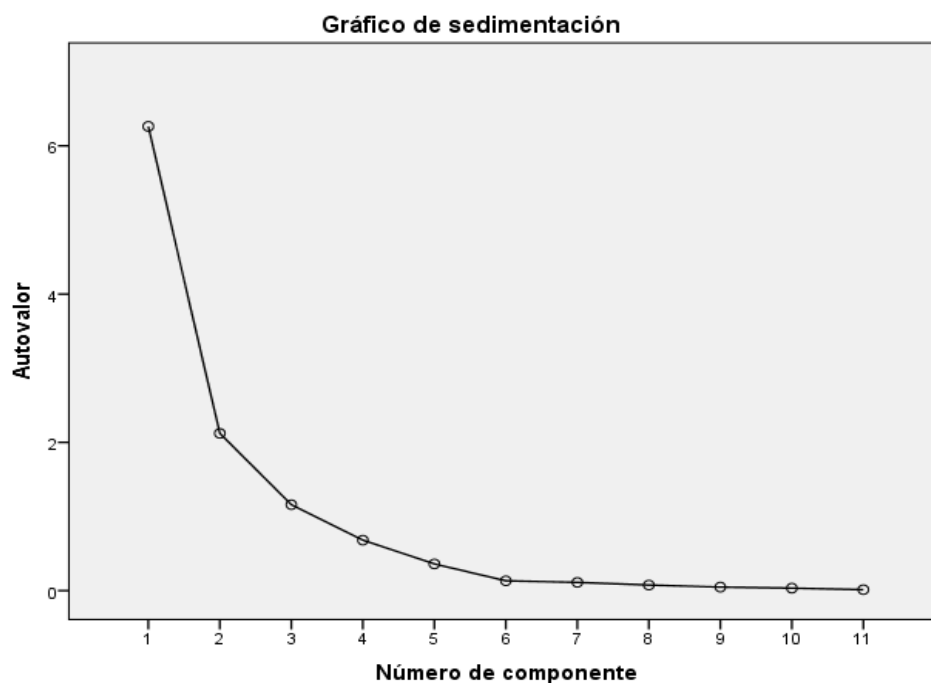


Figura 19. Gráfico de sedimentación, criterio empleado para la selección del componente a considerar.

Obtenida usando el software IBM SPSS Statistics.

Tabla 2.

Varianza total explicada

Componente	Sumas de extracción de cargas al cuadrado		
	Total	% de varianza	% acumulado
1	6,262	56,925	56,925
2	2,121	19,285	76,210
3	1,160	10,545	86,755

En la matriz de componente de espacio rotado (tabla 2 y figura 21), se muestran con mayor claridad cuáles de las variables que constituyen el primer componente, tienen mayor significancia. Este dato se usó para escoger las variables que finalmente determinaron la selección de los metabolitos.

Tabla 3.

Matriz de componente rotado.

	Componente		
	1	2	3
Peso	0,259		0,829
Log P	0,402		0,684
Solubilidad			-0.913
TPSA			0,682
Ligando GPCR	0,948		
Modulador de canales iónicos	0,977		
Inhibidor de kinasas	0,886		
Receptor nuclear de ligandos	0,959		
Inhibidor de proteasas	0,905		
Inhibidor enzimático	0,982		

Mutagenicidad	0,869
Tumorigenicidad	0,781
Irritante	0,611
Efectos reproductivos	0,748

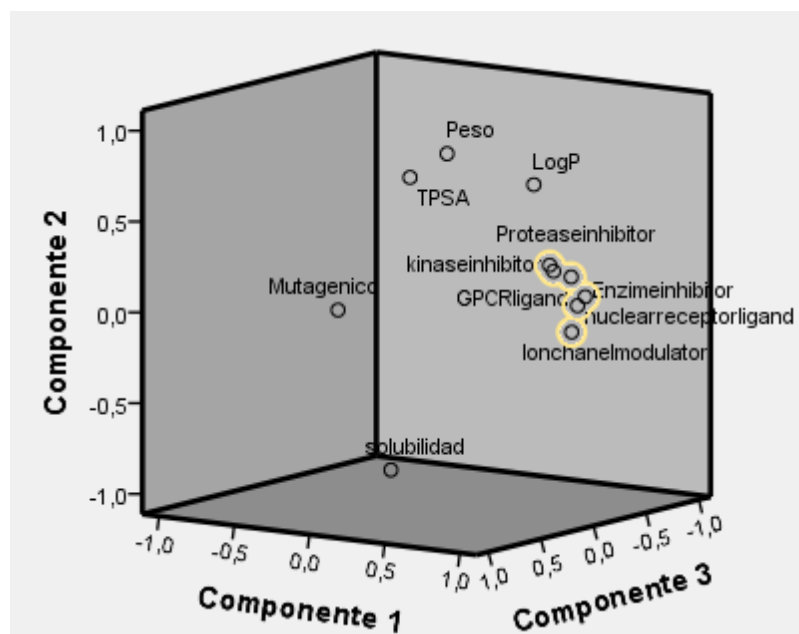


Figura 20. Gráfico de componente en espacio rotado. Se resaltan las variables que presentan mayor significancia, las cuales fueron el criterio final para discriminar los componentes de los aceites que se emplearon en los ensayos de actividad larvica. Imagen obtenida usando el software IBM SPSS Statistics.

Finalmente, con base en los anteriores criterios estadísticos, fueron escogidos los compuestos químicos constituyentes de los aceites que tuvieron los valores más altos en las variables: ligando

GPCR, modulador de canales iónicos, inhibidor de kinasas, receptor nuclear de ligandos, inhibidor de proteasas e inhibidor de enzimas del análisis realizado con Osiris y Molinspiration.

En resumen, de los metabolitos presentados en la tabla 1, correspondientes al trabajo realizado por Pavela, se escogieron 52 cuya $CL_{50} < 40$ ppm. Estos compuestos fueron estudiados con las herramientas informáticas para conocer sus propiedades físicas asociadas a los parámetros de Lipinski, actividad biológica y alertas de toxicidad. Posteriormente se discriminó entre las variables que suministraron las herramientas informáticas, cuáles tuvieron mayor significancia y estuvieron contenidas en el primer componente principal según los resultados del análisis estadístico, para determinar finalmente el criterio de selección. Es así como se eligieron aquellos metabolitos que tuvieron valores más altos en las estimaciones de la actividad biológica.

Para los ensayos con actividad larvicida finalmente fueron elegidos los compuestos: α -Terpineol, α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol, (-)-Linalool, ácido citronélico, óxido de cariofileno y s-Limoneno.

5.3 Actividad larvicida:

Los resultados muestran que los metabolitos α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-Limoneno presentaron actividad larvicida considerable, pues su CL_{50} se encuentra por debajo de 100 ppm siendo el limoneno y el Nerolidol los compuestos con los valores de concentración letal 50 más bajos (6,04 y 19 ppm respectivamente). Los resultados obtenidos para los 8 compuestos elegidos se observan en la tabla 3.

Tabla 5.

Resultados de la actividad larvicida

Compuesto	24 horas			48 horas		
	CL ₅₀ [ppm/mM]	CL ₉₅ [ppm/mM]	χ^2	CL ₅₀ [ppm]	CL ₉₅ [ppm]	χ^2
α- Terpineol	263,00/1,70 (252,45 -280,69)	385,25/2,49 (309,8-491)	4,48	242,41/1,57 (233,73-254,1)	420,07/2,72 (368,14-524,14)	3,70
α- Felandren o	44,38/0,32 (39,85-52,9)	114, 94/0,84 (85,21-192,7)	2,70	43,00/0,41 (38,92- 50,41)	109,00/0,80 (82,39- 176,23)	3,80
α- Bisabolol	21,52/0,07 (20,08-23,14)	50,92/0,18 (44,08-61,79)	1,36	19,32/0,07 (18,11- 20,62)	42,28/0,15 (37,61- 49,19)	1,42
Nerolidol	19,79/0,09 (18,76-20,91)	38,35/0,17 (34,28-44,77)	0,17	18,40/0,08 (12,79- 26,3)	36,68/0,16 (20,15- 68,15)	0,18
(-)- Linalool	125,77/0,81 (120,68-131,54)	226,87/1,47 (206,43-256,97)	0,91	138,71/0,90 (131,45-147,22)	304,40/1,97 (265,93-366,09)	1,38
Ácido citronélico	236,36/1,39 (229,04-245,96)	329,47/1,93 (305,63-376,10)	2,60	199,59/1,17 (194,57-205,31)	292,33/1,72 (275,23-316,19)	2,61
Óxido de cariofileno	> 280/1,27	> 280/1,27	---	> 280/1,27	> 280/1,27	---

s-	6,04/0,04 (5,37 – 17,2/0,12 (14,7 0,58	4,91/0,03 (4,32 – 13,3/0,09 (11,40 – 1,12
Limoneno	6,69) – 21,3)	5,47) 16,41)

CL_{50} y CL_{95} son las concentraciones letales que causan el 50 y 95% de mortalidad, de los individuos expuestos al tratamiento respectivamente. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza. Los análisis estadísticos se ajustaron al modelo probit, χ^2 chi cuadrado.

Aun cuando la organización mundial de la salud, no ha establecido un estándar, autores como Dias y Moraes (Dias & Moraes, 2014) han adoptado una clasificación de acuerdo a la mortalidad presentada por este tipo de compuestos biosintetizados. Si la CL_{50} se encuentra por encima de 100 ppm las sustancias se consideran no activas, si su valor está por debajo de 100 ppm son activas y por debajo de 50 ppm son consideradas muy activas. Tanto el Felandreno, bisabolol, Nerolidol y limoneno según la clasificación mencionada pueden catalogarse como compuestos altamente activos.

En el otro extremo, se encuentran los compuestos α -Terpineol, ácido citronélico y óxido de cariofileno, que no tuvieron actividad larvicida menor a 100 ppm resaltando el óxido de cariofileno como el compuesto menos efectivo puesto que en la mayor concentración evaluada 280 ppm no presentó mortalidad en los individuos evaluados.

Para el Felandreno, Pavela reporta una CL_{50} del aceite de *Cinnamomum impressicostatum* (Lauraceae), la planta que contiene dicho compuesto, de 11 ppm evaluado en *A. aegypti*, sin embargo, cuando se valuó el compuesto solo, se encontró una mortalidad de 44 ppm. Estos resultados pueden sugerir que en el caso de la evaluación del aceite de *C. impressicostatum*, el Felandreno no es el único compuesto responsable de la actividad insecticida. De igual manera para

el Bisabolol, se obtienen resultados mayores en su concentración letal 50 cuando se encuentra como constituyente del aceite esencial de *Auxemma glazioviana* (Boraginaceae) (3 ppm) (Pavela, 2015) que cuando se probó el compuesto solo la presente investigación (21 ppm).

En el caso del Nerolidol y s-Limoneno ocurre lo contrario a los dos aceites anteriormente mencionados. Para los dos compuestos que presentaron la mayor efectividad, se obtuvo CL₅₀ de 19,7 y 6,0 ppm, siendo concentraciones menores que los reportados en el artículo de revisión (Pavela, 2015) con 31 y 13 ppm cuando están como constituyentes de los aceites extraídos de *Angelica purpuraeifolia* y *Piper klotzschianum* respectivamente. Debido a que solo 4 de los 8 metabolitos escogidos (α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol, s-Limoneno) mostraron tener alta actividad larvica, fueron estos los seleccionados para evaluar sus posibles efectos sobre la cadena energética mitocondrial, ADN y la enzima AchE.

5.4 Resultados de la determinación de la presencia/ausencia de degradación/fragmentación de ADN de *Aedes aegypti*

Con el objetivo de determinar los efectos sobre el ADN que pudieran tener los metabolitos seleccionados, se realizaron los tres diferentes tipos de ensayos mencionados en la metodología del presente trabajo. Según los geles obtenidos en los tres tipos de ensayos realizados, ninguno de los metabolitos genera alteraciones a nivel de ADN de *A. aegypti*.

5.4.1 Efectos sobre el ADN de larvas tratadas durante 24 horas: En este ensayo las larvas fueron puestas en contacto con los metabolitos en las correspondientes CL_{50} y su ADN fue extraído una vez pasadas las 24 horas. Como se puede evidenciar en la figura 22, ninguno de los compuestos ocasionó daño al ADN de *A. aegypti* puesto que no se observa patrones de degradación ni fragmentación en el gel de agarosa.

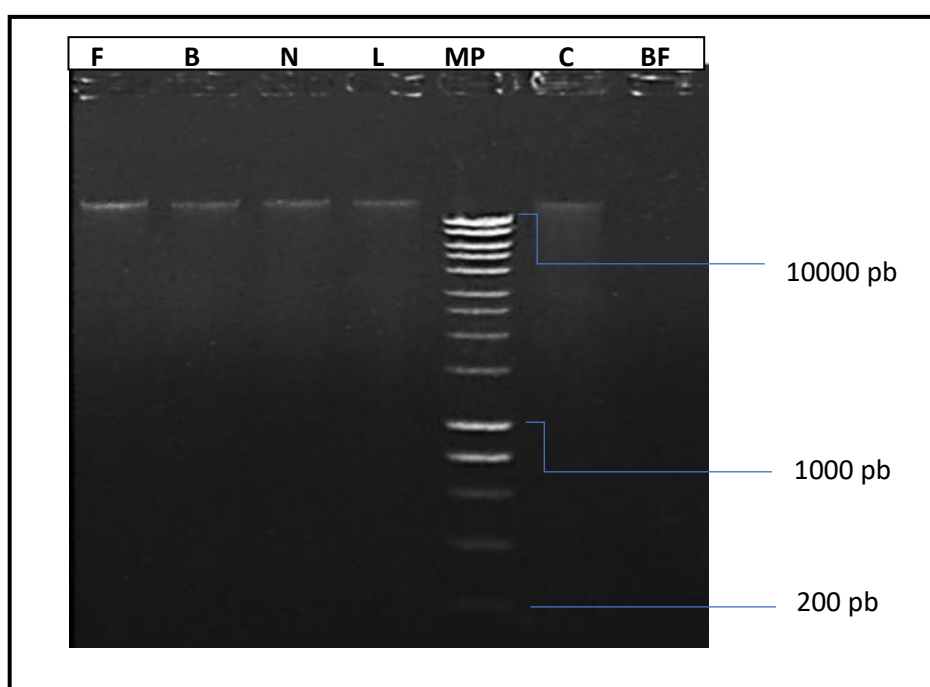


Figura 21. Análisis de ADN de larvas de *Aedes aegypti* tratadas 24 h las concentraciones CL_{50} de: **F:** α -Felandreno (44 ppm), **B:** α -Bisabolol (21 ppm), **N:** Nerolidol (19 ppm), **L:** s-limoneno (6 ppm), **MP:** Marcador de peso, **C:** control ADN, **BF:** buffer de carga.

Según los resultados obtenidos en este ensayo se puede sugerir que aun cuando los compuestos se encuentran presentes en el medio de cultivo de las larvas, pasadas las 24 horas, período en el

cual se lleva a cabo el normal desarrollo de los insectos, no se evidencia efectos sobre el ADN de los individuos empleados.

5.4.2 Efectos sobre de ADN de larvas tratado con los compuestos adicionados en el momento de la homogenización. En este ensayo no se evidenciaron patrones de fragmentación ni degradación en el ADN de las larvas cuando se adicionan los compuestos al momento de homogeneizar el material biológico (figura 23). Estos resultados sugirieren que los metabolitos no ocasionan alteraciones en la estructura de la molécula de material genético aun cuando se encuentra presente en un medio que contiene disueltas las proteínas del insecto.

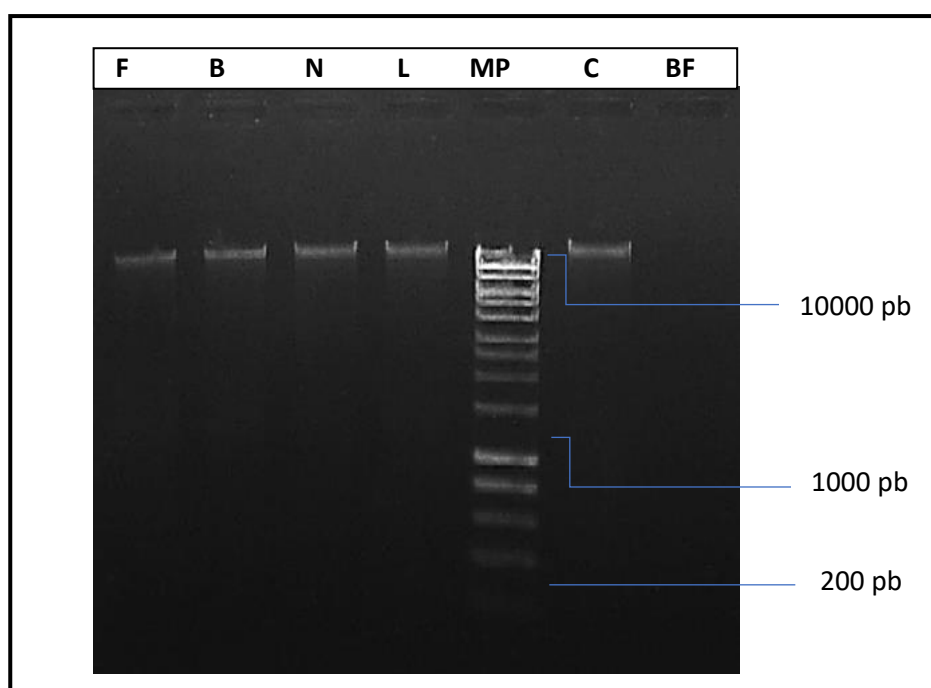


Figura 22. Análisis de ADN de larvas de *Aedes aegypti* tratado con los compuestos al momento de la homogeneización con las CL₅₀ de: **F:** α -Felandreno (44 ppm), **B:** α -Bisabolol (21 ppm), **N:** Nerolidol (19 ppm), **L:** s-limoneno (6 ppm), **MP:** Marcador de peso, **C:** control ADN, **BF:** buffer de carga.

5.4.3 ADN purificado y tratado directamente con los compuestos mayoritarios: Al agregar los metabolitos directamente a la solución buffer que contiene el ADN, no se observó alteraciones en la integridad de su estructura, como lo evidencia la figura 24. Lo cual sugiere que los compuestos no causan daño por escisión directa a la macromolécula de ADN.

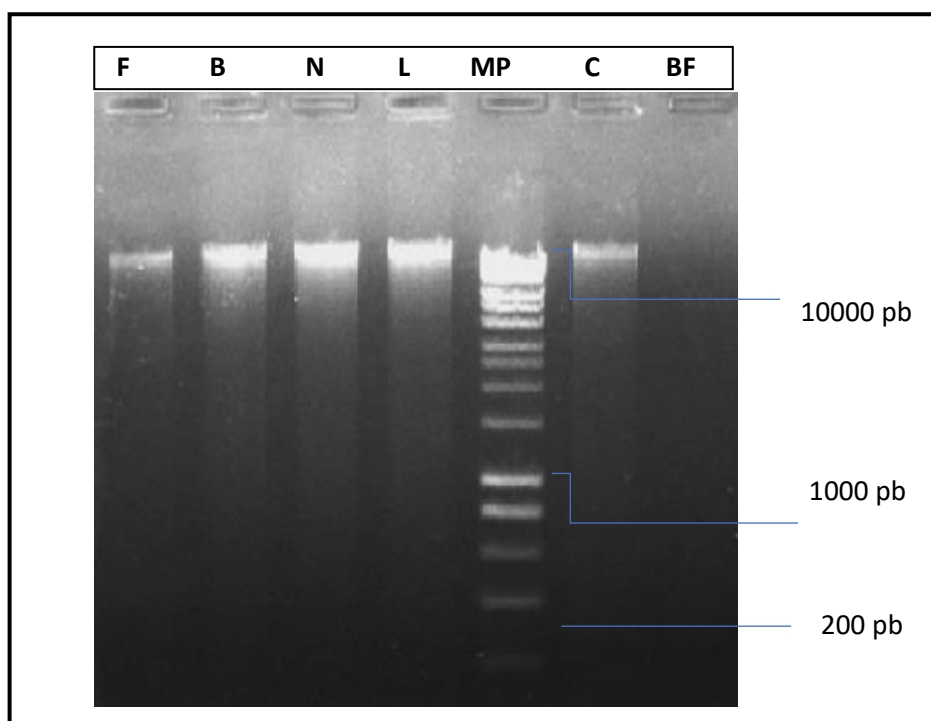


Figura 23. Análisis de ADN de larvas de *Aedes aegypti* purificado e incubado con las CL₅₀ de: **F:** α -Felandreno (44 ppm), **B:** α -Bisabolol (21 ppm), **N:** Nerolidol (19 ppm), **L:** s-limoneno (6 ppm), **MP:** Marcador de peso, **C:** control ADN, **BF:** buffer de carga.

Aun cuando trabajos realizados en células de leucemia murina, muestran que el α -Felandreno induce daño en el ADN muerte celular, entre otros efectos; los resultados obtenidos en el presente trabajo no muestran ningún efecto de este metabolito en ninguno de los tres tipos de ensayos realizados. En el caso de las células de leucemia en las que se ha reportado el daño del α -

Felandreno sobre el ADN, este efecto puede estar asociado a la inhibición de proteínas asociadas a la reparación de la hebra de material genético tales como MGMT (metil guanina metil transferasa) y DNA-PK (proteína quinasa dependiente de ADN, por sus siglas en inglés) (Lin *et al.*, 2015) por tal motivo son congruentes los resultados obtenidos en los ensayos de ADN directo, ya que el efecto del α -Felandreno no es a través de escisión directa.

El α -Bisabolol utilizado en ensayos realizados por Cavalieri y colaboradores, en células de glioma de rata demostró que este sesquiterpeno induce degradación en el ADN en tratamientos con concentraciones de 4,5 μ M durante 5 horas. Este efecto en células de glioma es producto de la apoptosis desencadenada por la vía mitocondrial (Cavalieri *et al.*, 2004). En los resultados obtenidos en el presente trabajo no se observan efectos del α -Bisabolol en los tres diferentes ensayos realizados tal como se observan en las figuras 22, 23 y 24.

Estudios realizados en células sanguíneas y hepáticas con el metabolito Nerolidol mostraron que este compuesto ocasiona daño al ADN en bajas proporciones (Chan *et al.*, 2016). Contrario a lo obtenido por Chan y colaboradores, en los ensayos realizados con ADN de *A. aegypti* no se evidencia ningún tipo de efecto cuando se evaluó la CL₅₀ de este compuesto.

Finalmente, no hay reportes en la literatura de efectos sobre el ADN producidos por el s-limoneno. Este metabolito fue evaluado por Bacanli y colaboradores en linfocitos y en células V79 sin evidencia de daño a la hebra de nucleótidos, por el contrario, se resalta su actividad protectora a esta macromolécula cuando se induce estrés oxidativo por H₂O₂ (Bacanli *et al.*, 2015). En el presente trabajo usando ADN de *A. aegypti* tampoco se evidencia efectos de este metabolito puesto que en el gel de agarosa no se observan los resultados característicos de degradación ni fragmentación.

Un aspecto importante es que los reportes anteriormente mencionados fueron realizados en diferentes líneas celulares, sin embargo, el ensayo realizado en este trabajo usa individuos completos del mosquito (larvas entre tercer y cuarto estadio), así como ADN puro y homogeneizado de larvas, lo cual supone una diferencia metodológica para tener en cuenta al comparar los resultados.

5.5 Resultados de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa

Cuando los compuestos fueron evaluados con AchE comercial se evidencia que los cuatro compuestos ejercieron inhibición, siendo el α -Felandreno el compuesto con mayor efecto, aproximadamente 31 % seguido de α -Bisabolol, Nerolidol, s-limoneno con 27, 23 y 10 %, respectivamente (figura 25).

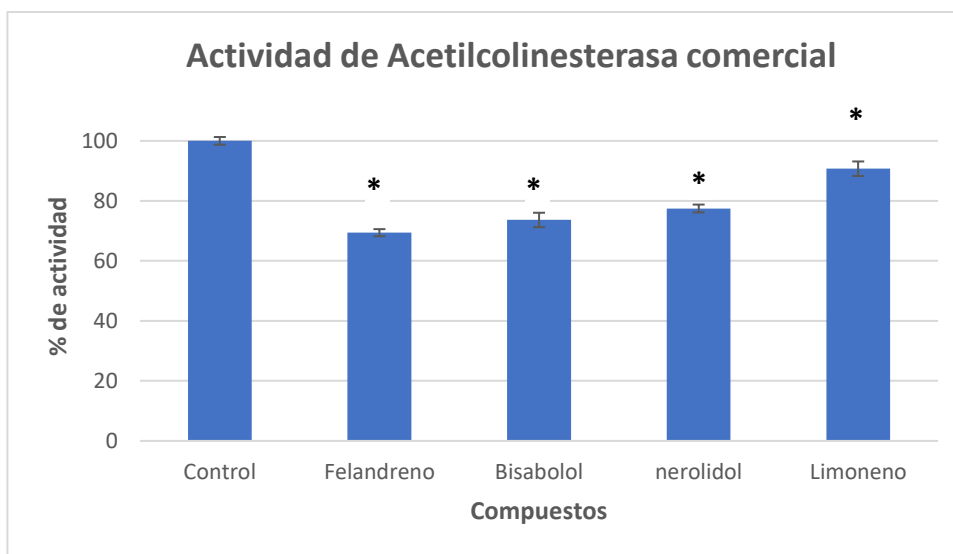


Figura 24. Resultados de la inhibición de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) en sus correspondientes CL_{50} de AchE evaluada en la enzima disponible comercialmente (*Electrophorus electricus*). El control fue tomado como el 100 % y

corresponde a $145,518 \pm 1,230$ μmol de yoduro de tiocolina formada / $\text{U} \cdot \text{min}$. * son los resultados con diferencias estadísticamente significativas y $p < 0,05$.

Contrario a los anteriores resultados, los ensayos llevados a cabo con la enzima contenida en el homogeneizado de larvas no muestran ninguna diferencia en los valores de actividad obtenidos respecto al control como lo muestra la figura 26.

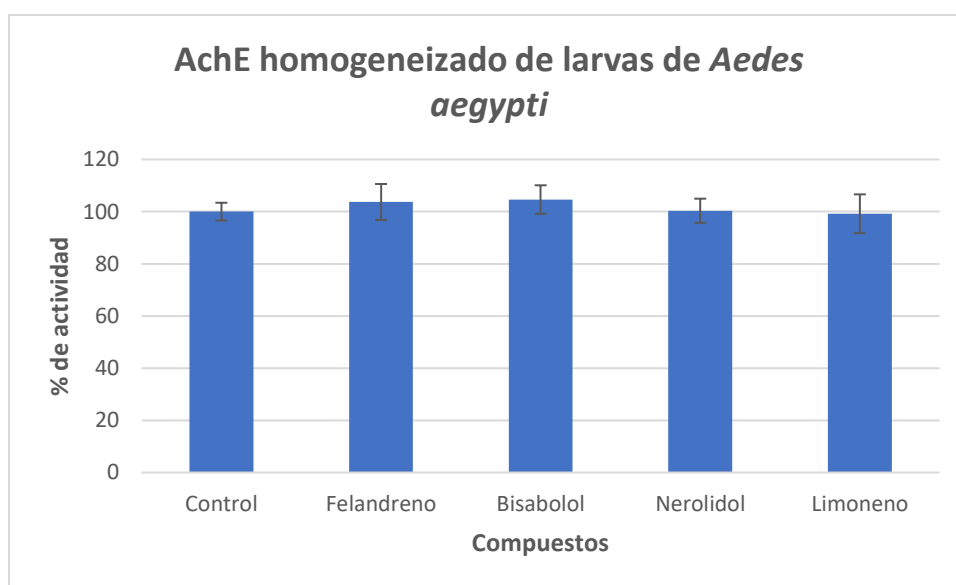


Figura 25. Resultados de la inhibición de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) en sus correspondientes CL_{50} de AChE evaluada en la enzima contenida en el homogeneizado de larvas de *A. aegypti*. El control fue tomado como el 100 % y corresponde a $1,472 \pm 0,373$ μmol de yoduro de tiocolina formada / $\text{min} \cdot \text{mg}$ de proteína. No se encontraron valores con diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

Estudios realizados con el aceite esencial de *R. epapposum* (Demirci *et al.*, 2017) cuyos componentes principales (del aceite esencial extraído de las partes aéreas) son canfeno, mirceno y

dos de los compuestos estudiados en el presente trabajo, limoneno y α -Felandreno, tiene efectos inhibitorios de alrededor del 14 % cuando se evalúa en la enzima disponible comercialmente.

Al comparar los resultados obtenidos del análisis de ambos compuestos por separado, se evidencia que ambos presentan valores más altos de inhibición de la enzima que los reportados para el aceite esencial por Demirci y colaboradores. El α -Bisabolol, segundo compuesto con mayor efecto en los ensayos con la enzima de *Electrophorus electricus*, según resultados obtenidos por Shanmuganathan y colaboradores también presenta actividad inhibitoria de la enzima AChE cuando se encuentra como componente mayoritario del aceite esencial de *Padina gymnospora* (Shanmuganathan *et al.*, 2015).

Si bien se evaluó la enzima comercial como un ensayo preliminar y posteriormente la presente en el homogeneizado de larvas, existe una diferencia significativa aun cuando se trata de la misma enzima proveniente de especies diferentes. En el primer caso, se tiene una solución de la enzima purificada, mientras que en el segundo no se tiene un extracto puro, sino la suspensión total de las proteínas que contienen las larvas, esto conlleva a considerar que la biodisponibilidad de los compuestos evaluados no es la misma en los dos ensayos y por ende la diferencia de los resultados obtenidos.

5.6 Resultados de los efectos de los compuestos estudiados sobre la cadena energética mitocondrial

Los ensayos de los complejos enzimáticos mitocondriales pertenecientes a la cadena de fosforilación oxidativa se realizaron con el fin de estudiar el efecto de los compuestos con mayor actividad insecticida de las pruebas *in vivo*. Los resultados que se presentan a continuación

corresponden al porcentaje de actividad de cada enzima, tomando como control o 100% la actividad enzimática en ausencia de los compuestos elegidos. Se probó la CL₅₀ de α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol, s-Limoneno en ensayos con tres repeticiones durante tres días diferentes en soluciones que contenían mitocondrias fragmentadas.

5.6.1 NADH oxidasa y succinato oxidasa: El ensayo denominado NADH oxidasa busca evaluar el paso de electrones desde el complejo mitocondrial I, III y IV sin tener en cuenta la contribución de electrones que desde el complejo II se pueda dar. Como su nombre lo indica se parte desde los equivalentes reductores que aporta el NADH desde el complejo NADH deshidrogenasa y se monitorea mediante la velocidad del consumo de oxígeno molecular disuelto en el medio de reacción.

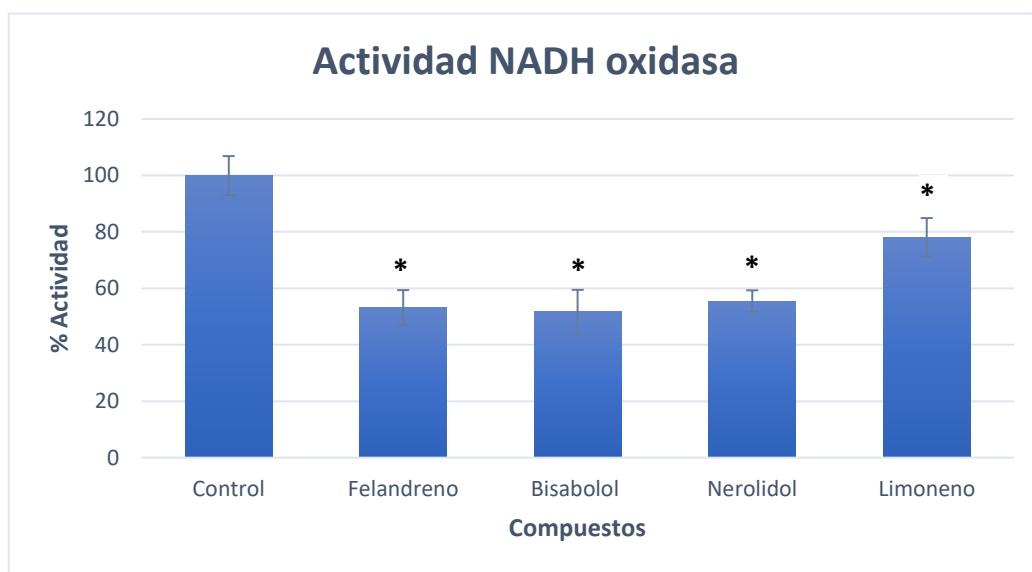


Figura 26. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) en sus correspondientes CL₅₀ sobre el flujo de electrones desde el complejo I hasta el IV. Los valores representan el promedio de las mediciones con su correspondiente

desviación estándar. El control fue tomado como el 100 % y corresponde a $88,23 \pm 6,36$ nmol O/min* mg de proteína. * son los resultados con diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$.

De los cuatro compuestos evaluados el s-Limoneno es el que menor inhibición presenta en este ensayo, alrededor de 22 %, seguido por el Nerolidol 45 % y finalmente los dos compuestos con valores más altos de disminución de la actividad enzimática son el Felandreno y Bisabolol con 47 y 49 %, respectivamente.

Estos resultados indican que cuando se usa el NADH como sustrato, es decir, cuando se estudia el tránsito de electrones desde el complejo I hasta el IV, el compuesto que tiene un mayor efecto sobre este flujo de electrones es el Bisabolol, sin embargo, los cuatro compuestos presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control con valores de disminución de actividad considerables pues dos de ellos comprometen la actividad enzimática en casi la mitad de su normal funcionamiento.

Cuando se usa succinato como sustrato dador de equivalentes reductores, (figura 28) el limoneno no presenta diferencias estadísticas con el control, pero los otros tres evaluados, Felandreno, Nerolidol y Bisabolol si son disímiles de forma significativa cuando se compara con el ensayo enzimático en ausencia de los tratamientos.

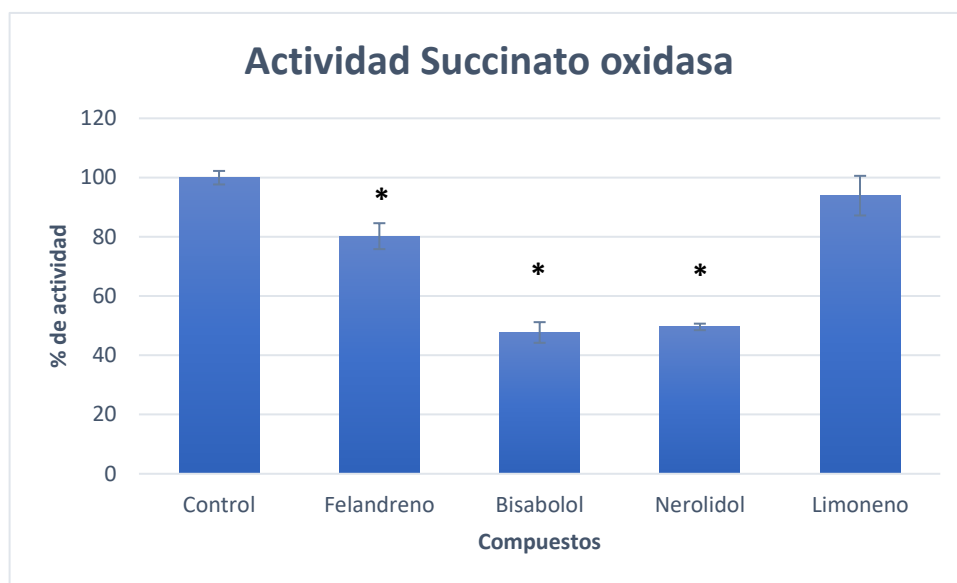


Figura 27. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) en sus correspondientes CL_{50} sobre el flujo de electrones desde el complejo II hasta el IV. Los valores representan el promedio de las mediciones con su correspondiente desviación estándar. El control fue tomado como el 100 % y corresponde a $103,28 \pm 2,28$ nmol O/min* mg de proteína. * son los resultados con diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$.

En este ensayo se puede evidenciar que los tres compuestos α -Felandreno, α -Bisabolol y Nerolidol que tuvieron efectos en la actividad enzimática medida en la NADH oxidasa, también lo presentan para la succinato oxidasa, sin embargo, para el Felandreno el valor no es tan marcado, lo que quiere decir que su mayor efecto inhibitorio presenta vía complejo I. Este compuesto presenta una disminución en la actividad enzimática alrededor del 20 % mientras que para el Nerolidol y el Bisabolol la reducción es de 51 y 53%, respectivamente. De nuevo el α -Bisabolol se presenta como el compuesto con mayores efectos inhibitorios en este tipo de ensayo. A pesar

de que el limoneno no tiene efectos sobre la actividad en la NADH y succinato oxidasas, no se debe descartar su efecto sobre la cadena energética mitocondrial ya que estos dos ensayos solo evaluaban el tránsito de electrones desde el complejo I y II hasta el IV, pero no estudian la actividad del también llamado V complejo la ATPasa.

5.6.2 NADH y succinato deshidrogenasa: Una vez estudiado el efecto de los compuestos sobre un tramo de la cadena energética se procedió a evaluar cada uno de los complejos enzimáticos que la conforman. A continuación, se presentan los valores de actividad para dos enzimas que sirven de entrada de los electrones en la fosforilación oxidativa.

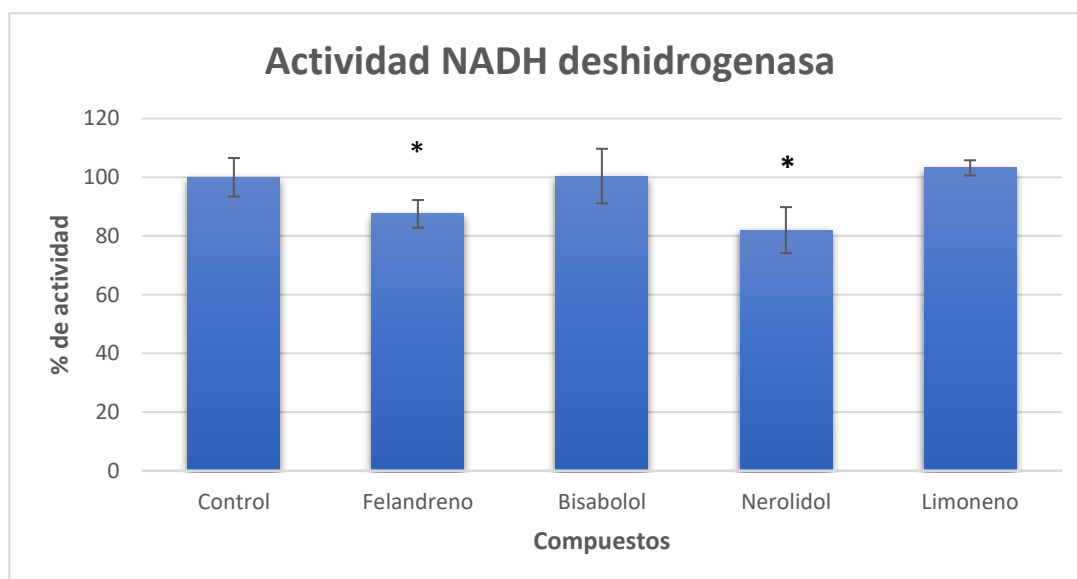


Figura 28. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) evaluados en las CL₅₀, sobre la actividad enzimática de NADH deshidrogenasa. Los valores representan el promedio de las mediciones con su correspondiente desviación estándar. El control fue tomado como el 100 % y corresponde a $0,156 \pm 0,001$ $\mu\text{moles/min} \cdot \text{mg}$ de proteína. Los resultados con diferencias estadísticamente significativas están representados * $p < 0,05$.

De los compuestos evaluados, el limoneno no indica tener algún efecto sobre la actividad enzimática del complejo I, este comportamiento es congruente con los resultados de la enzima NADH oxidasa confirmando que este metabolito no ejerce inhibición en el primer complejo. Para el Bisabolol los efectos son diferentes ya que contrario a los resultados de la NADH oxidasa, no muestra ningún efecto sobre el complejo NADH deshidrogenasa, lo cual quiere decir que el efecto que tiene sobre el flujo de electrones del complejo I al IV no se debe a la inhibición del primer complejo sino posiblemente debido a las enzimas relacionadas con el citocromo, cuyos resultados se presentan más adelante.

Los compuestos que si presentan actividad inhibitoria con diferencias estadísticamente significativas respecto al control son el Felandreno y el Nerolidol con 12 y 18 % respectivamente, siendo este último, el que mayor inhibición presenta. Si bien las diferencias no son tan marcadas comparado con los resultados de las oxidasas, se evidencia para el Felandreno y Nerolidol, que la entrada de electrones a la cadena energética por el complejo I se ve disminuida, lo en una mitocondria íntegra puede afectar la capacidad de generar ATP (Degli *et al.*, 1994).

Los resultados enzimáticos de la succinato deshidrogenasa (figura 30) evidencian que tres de los compuestos evaluados no presentan diferencias en su actividad cuando se comparan con el control.

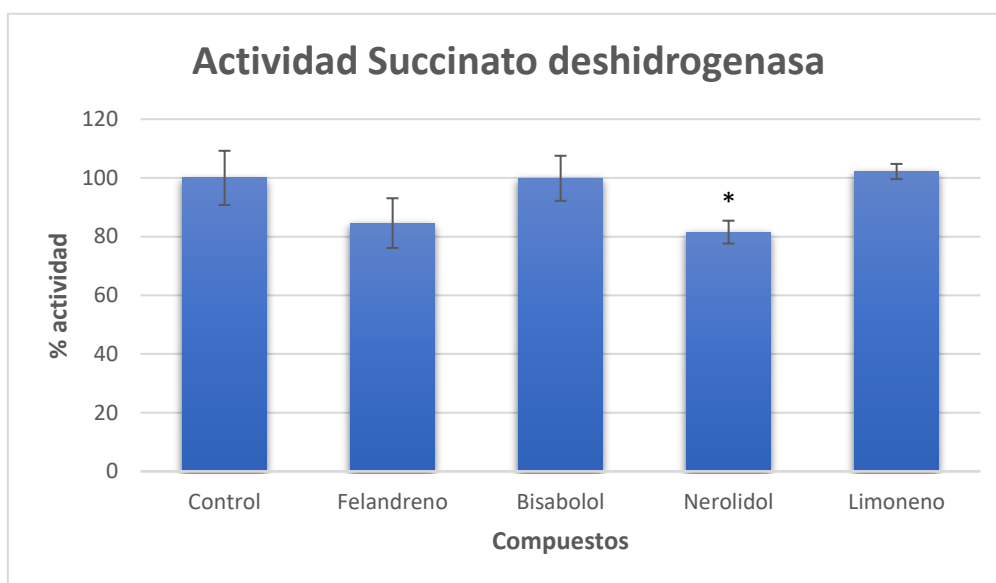


Figura 29. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) evaluados en las CL_{50} , sobre la actividad enzimática de Succinato deshidrogenasa. Los valores representan el promedio de las mediciones con su correspondiente desviación estándar. El control fue tomado como el 100 % y corresponde a $4,532 \pm 0,121$ nmoles/min*mg de proteína. Los resultados con diferencias estadísticamente significativas están representados * $p < 0,05$.

Sin embargo, el Nerolidol presenta una disminución en la actividad de esta enzima de alrededor de 19 %. Este metabolito afecta la entrada de los electrones vía complejo II además del complejo I como se vio anteriormente, lo cual puede relacionarse con los resultados obtenidos en la succinato y NADH oxidasa para este compuesto.

5.6.3 Succinato Citocromo c reductasa: Los resultados obtenidos para esta enzima muestran que ninguno de los compuestos evaluados tiene efecto inhibitorio sobre el complejo III (citocromo c reductasa), ya que los valores obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

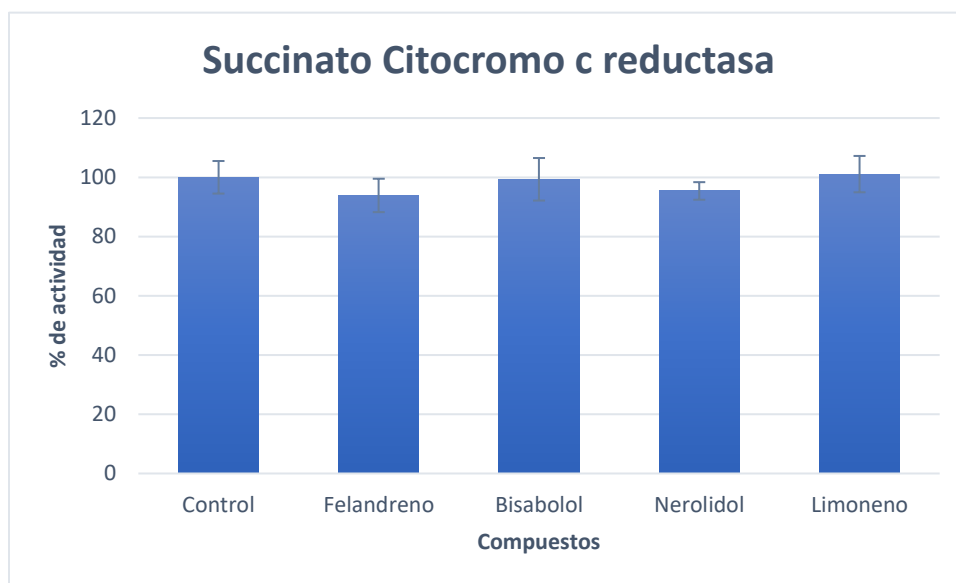


Figura 30. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) evaluados en las CL_{50} , sobre la actividad enzimática de Succinato citocromo c reductasa. Los valores representan el promedio de las mediciones con su correspondiente desviación estándar. El control fue tomado como el 100 % y corresponde a $363,819 \pm 3,414$ nmoles/min*mg de proteína.

Aun cuando se observó efectos en el flujo de electrones desde el complejo I y II hasta el complejo IV como lo muestran los ensayos de NADH y succinato oxidasa, estas alteraciones no están relacionadas con las inhibiciones en el paso de electrones en el complejo III según los resultados mostrados en la actividad de la enzima (figura 31).

5.6.4 Citocromo c oxidasa: Al evaluar la enzima citocromo c oxidasa o complejo IV (figura 32) se encontraron efectos causados por los compuestos α -Bisabolol y Nerolidol.

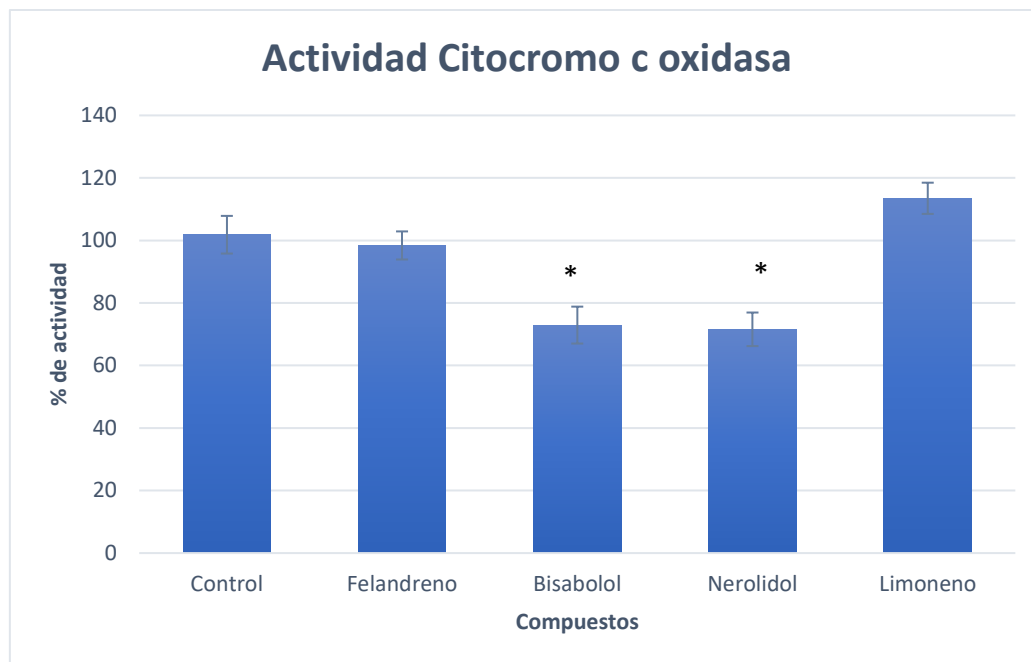


Figura 31. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) evaluados en las CL_{50} , sobre la actividad enzimática de la enzima citocromo c reductasa. Los valores representan el promedio de las mediciones con su correspondiente desviación estándar. El control fue tomado como el 100 % y corresponde a $81,632 \pm 1,342$ nmoles/min*mg de proteína. Los resultados con diferencias estadísticamente significativas están representados * $p < 0,05$.

Al observar los resultados se encuentra que los compuestos Bisabolol y Nerolidol tienen efectos inhibitorios sobre el complejo mitocondrial con valores alrededor de 28 y 29 % respectivamente. Por lo tanto, se puede sugerir que los resultados obtenidos con la NADH y Succinato oxidasa en

donde estos dos compuestos interrumpían el paso normal de los electrones del complejo I al IV se puede explicar debido a una inhibición sobre la citocromo c oxidasa. Nuevamente y conforme a los resultados obtenidos en la NADH y succinato oxidasa para el s-limoneno no se encuentra inhibición en el complejo IV, mientras que, para el Felandreno, los resultados obtenidos en las oxidasas se deben a la inhibición de este compuesto solo en la NADH deshidrogenasa, puesto que tampoco se obtuvo efectos sobre la citocromo c oxidasa.

5.6.5 Complejo enzimático ATPasa: Finalmente, el estudio de los complejos pertenecientes a la cadena de fosforilación oxidativa se culminó con el ensayo de la actividad enzimática de la ATPasa o definida por algunos autores como el complejo V. En esta enzima (figura 33) se puede evidenciar que solo el s-Limoneno presenta efectos inhibitorios con alrededor de 13%.

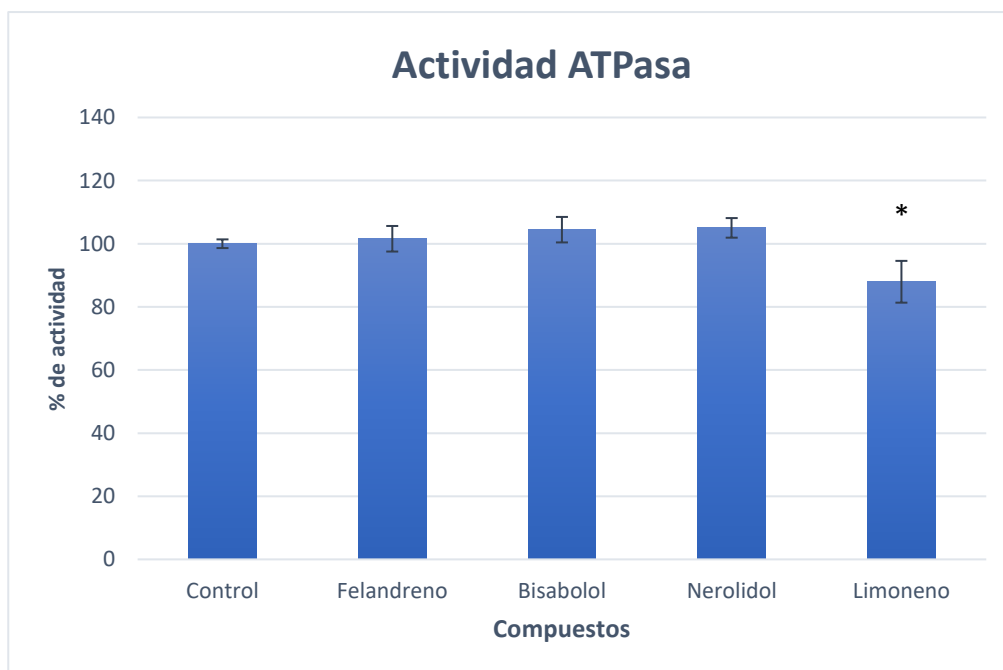


Figura 32. Efecto de α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm) evaluados en las CL_{50} , sobre la actividad enzimática de la enzima ATPasa. Los

valores representan el promedio de las mediciones con su correspondiente desviación estándar. El control fue tomado como el 100 % y corresponde a $8252,315 \pm 30,466$ nmoles/mg de proteína. Los resultados con diferencias estadísticamente significativas están representados *, $p < 0,05$.

Aun cuando el s-Limoneno no presentó ningún efecto en los cuatro primeros complejos de la cadena mitocondrial, si se evidencia inhibición sobre el complejo encargado de la regulación de la relación ATP/ADP con diferencias estadísticamente significativas según el valor correspondiente al 100%. La inhibición de este complejo enzimático tiene efectos considerables en la bioenergética de la célula; uno de ellos, es el colapso del gradiente de protones mantenido por esta enzima en el espacio intermembrana mitocondrial, ocasionando la disminución en la síntesis de ATP (Boominathan & Doran, 2003) y alterando la homeostasis de energía celular (Campanella *et al.*, 2009).

De los compuestos evaluados se puede observar al Nerolidol como el metabolito con efectos sobre un mayor número de complejos mitocondriales puesto que en los ensayos realizados, se obtuvo disminución en la actividad de las enzimas NADH y succinato oxidasa, NADH y succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa. No obstante, fue el segundo metabolito más eficaz o de mayor actividad en los ensayos larvicidas. Aun cuando no se tienen reportes en la literatura del efecto de este compuesto en mitocondrias de insecto, ensayos realizados sobre homogeneizado de mitocondrias de hígado de rata muestran concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la ATPasa. Peixoto y colaboradores no encontraron efectos sobre este complejo enzimático; sin embargo, este metabolito si presenta efectos sobre la mitocondria disminuyendo el potencial de membrana. Además, presenta efectos en la disminución de la tasa de respiración

desacoplada, y el incremento de la capacidad de la mitocondria para acumular calcio disminuyendo la susceptibilidad de este organelo a la apertura de poros de permeabilidad (Francisco *et al.*, 2008).

Los resultados de bioenergética mitocondrial muestran que α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-Limoneno alteran el consumo de oxígeno debido a la inhibición de complejos mitocondriales.

Para el α -Felandreno la disminución en el consumo de oxígeno evidenciado en los valores obtenidos en la evaluación de la NADH y succinato oxidasa, se debe a la inhibición ocasionada en el complejo I, es decir, ocurre una menor llegada de electrones hasta el complejo IV debido a que en el primero se reduce la entrada de equivalentes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos al evaluar la NADH deshidrogenasa o complejo número I, donde se evidencia la disminución de la actividad de este complejo enzimático. Además, no se observa efecto inhibitorio sobre los complejos III y IV, reforzando los indicios que la inhibición ocurre al comienzo de la cadena de fosforilación.

El α -Bisabolol también ocasiona la disminución de consumo de oxígeno, según resultados de la NADH y succinato oxidasa. Esta reducción del consumo de oxígeno estaría más relacionada con la inhibición ocasionada en el complejo IV, que en los complejos I y II, debido a que los ensayos de NADH y succinato deshidrogenasa no mostraron disminución de la actividad enzimática de estos complejos. Estos resultados indican que la interrupción en el flujo normal de electrones se da en la enzima citocromo c oxidasa y no por la disminución en la disponibilidad de electrones suministrados por el NADH o succinato como sustratos.

El Nerolidol, también ocasiona el descenso del consumo de oxígeno, según resultados obtenidos en los ensayos NADH y succinato oxidasa. Sin embargo, la disminución en el flujo de electrones estaría ocasionada en dos puntos de la cadena energética. Inicialmente, ocurre la reducción de la

transferencia de electrones a través de los complejos I y II, como lo evidencian los resultados obtenidos en la NADH y succinato deshidrogenasas. Finalmente se evidencia la disminución en la actividad enzimática del complejo IV, como lo muestran los resultados de la citocromo c oxidasa, esto sugiere que el descenso del consumo de oxígeno es resultado de un menor transporte de electrones vía complejo I y II lo cual ocasiona la menor actividad del complejo número IV.

El s-Limoneno no presenta actividad en ninguno de los cuatro complejos mitocondriales evaluados individualmente, lo cual se confirma con los resultados de las NADH y succinato oxidadas donde no se evidencia disminución en el consumo de oxígeno, indicando que la actividad de este compuesto se limita solo al complejo V o ATPasa.

5.7 Resultados de actividad insecticida de mezclas de metabolitos

Con el objetivo de potencializar los efectos en la mortalidad observados en los ensayos de actividad larvicida, se procedió a realizar mezclas de α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-Limoneno. Estas mezclas fueron realizadas en las CL₅₀ con todas las posibles combinaciones de los cuatro compuestos, posteriormente se evaluaron las combinaciones con solo tres de ellos y finalmente con dos (tabla 6). Los siguientes resultados muestran los porcentajes de mortalidad obtenidos a las 2 y 24 horas de exposición con las diferentes mezclas (figura 34 y 35).

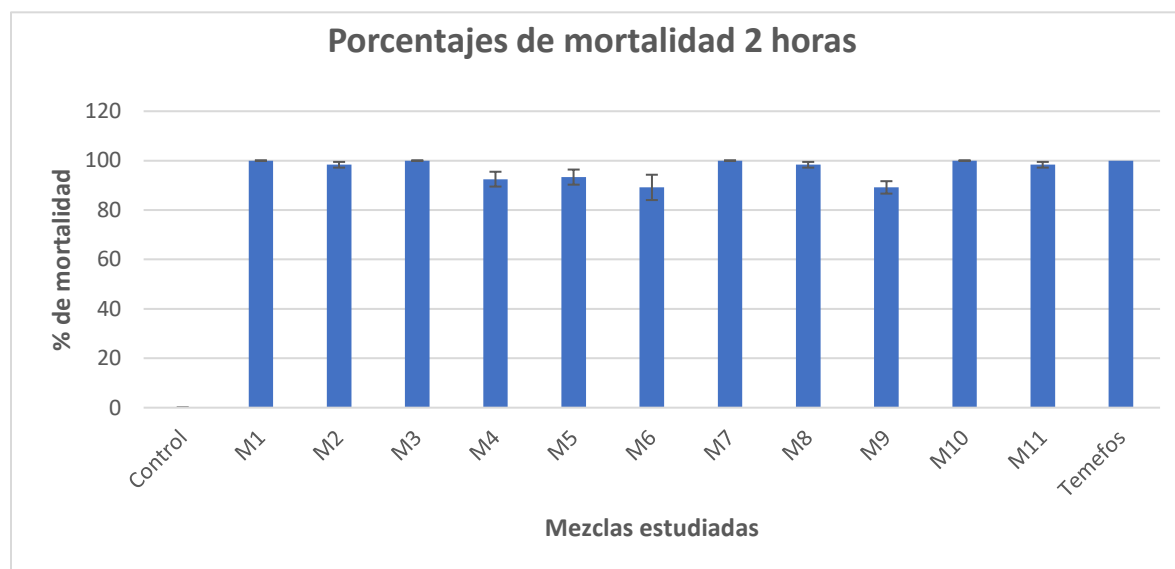
Tabla 2.

Mezclas de los compuestos y sus respectivas CL₅₀.

Mezclas	Compuestos (CL ₅₀)
---------	--------------------------------

M1	α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm) y s-Limoneno (6 ppm)
M2	α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm)
M3	α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm)
M4	α -Felandreno (44 ppm), Nerolidol (19 ppm) y s-Limoneno (6 ppm)
M5	α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm), s-Limoneno (6 ppm)
M6	α -Bisabolol (21 ppm), s-Limoneno (6 ppm)
M7	α -Felandreno (44 ppm), Nerolidol (19 ppm)
M8	α -Bisabolol (21 ppm), Nerolidol (19 ppm)
M9	α -Felandreno (44 ppm), s-Limoneno (6 ppm)
M10	α -Felandreno (44 ppm), α -Bisabolol (21 ppm)
M11	Nerolidol (19 ppm), s-Limoneno (6 ppm)

Figura 33. Porcentajes de mortalidad de larvas obtenidos con las diferentes mezclas de los 4



compuestos seleccionados, α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-Limoneno a dos horas de exposición. Los valores representan el promedio de las mediciones con su correspondiente desviación estándar. M1 (Felandreno, Bisabolol, Nerolidol y limoneno), M2 (Bisabolol, Nerolidol y limoneno), M3 (Felandreno, Bisabolol y Nerolidol), M4 (Felandreno, Nerolidol y limoneno), M5 (Felandreno, Bisabolol y limoneno), M6 (Bisabolol y limoneno), M7 (Felandreno y Nerolidol), M8 (Bisabolol y Nerolidol), M9 (Felandreno y limoneno), M10 (Felandreno y Bisabolol) y M11 (Nerolidol y limoneno), Temefos, control positivo.

Los resultados muestran que las mezclas M1, M3, M7 y M10 presentan el 100% de mortalidad a tan solo dos horas de tratamiento. El factor común de estas mezclas es la presencia del compuesto α -Felandreno, sin embargo, este metabolito no obtuvo la CL_{50} más baja cuando se probaron los compuestos individualmente, este resultado puede sugerir efecto sinergista de esta molécula. En

general a las dos horas de iniciado el tratamiento, aun con mezclas de solo dos compuestos se obtuvo valores altos de efectividad, con cifras que oscilan entre el 89 y 100% de mortalidad evidenciando la alta capacidad insecticida de las mezclas.

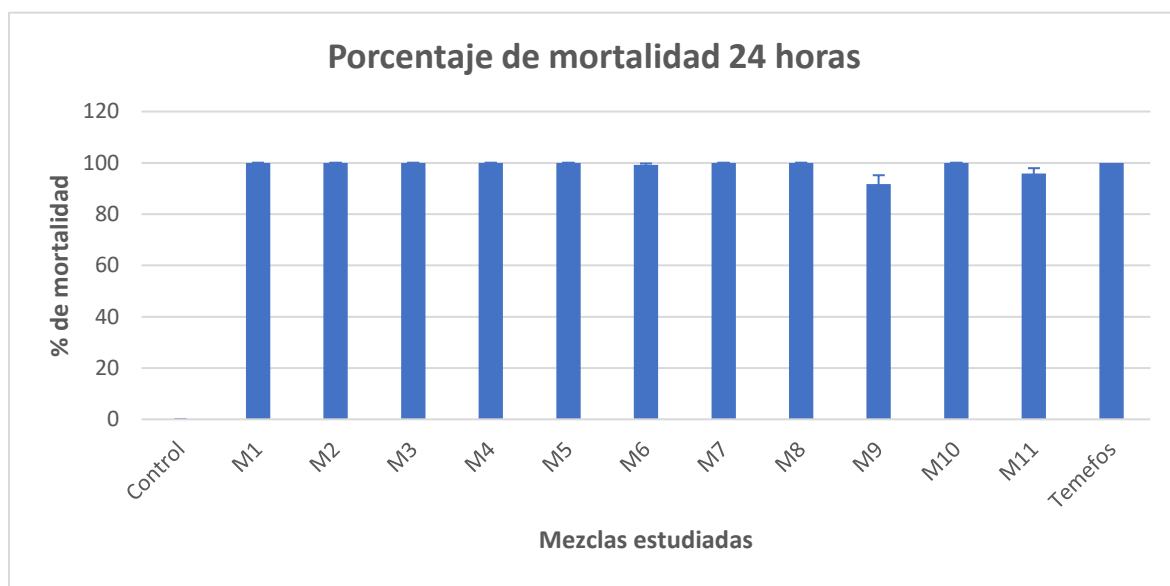


Figura 34. Porcentajes de mortalidad de larvas obtenidos con las diferentes mezclas de los 4 compuestos seleccionados, α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-limoneno a 24 horas de exposición. Los valores representan el promedio de las mediciones con su correspondiente desviación estándar. **M1** (Felandreno, Bisabolol, Nerolidol y limoneno), **M2** (Bisabolol, Nerolidol y limoneno), **M3** (Felandreno, Bisabolol y Nerolidol), **M4** (Felandreno, Nerolidol y limoneno), **M5** (Felandreno, Bisabolol y limoneno), **M6** (Bisabolol y limoneno), **M7** (Felandreno y Nerolidol), **M8** (Bisabolol y Nerolidol), **M9** (Felandreno y limoneno), **M10** (Felandreno y Bisabolol) y **M11** (Nerolidol y limoneno), Temefos control positivo.

Aunque no se puede afirmar que la actividad larvicida sea provocada exclusivamente por efectos en los sistemas que se estudiaron (mitocondria, AchE y ADN), si se puede sugerir que la efectividad de M1 a las 2 y 24 horas, esté involucrada con la suma de la actividad que cada

sustancia ejerció sobre los distintos targets en los cuales tuvo mayores efectos. Por ejemplo, el α -bisabolol fue el metabolito con mayor eficiencia para impedir el flujo normal de electrones desde el complejo I al IV usando NADH como sustrato, el α -Felandreno fue el responsable de la disminución del 47 % de la actividad de la enzima NADH deshidrogenasa, Nerolidol fue el metabolito con mayor efecto sobre la enzima citocromo c oxidasa (aproximadamente 29%) y finalmente el s-limoneno, demostró tener actividad inhibitoria sobre el complejo ATPasa.

Como ya se mencionó anteriormente, las CL₅₀ se definen como las concentraciones en las cuales se evidencia el 50% de mortalidad de los individuos evaluados. En las mezclas estudiadas se evaluaron los compuestos en dichas concentraciones obteniéndose en cada caso porcentajes de mortalidad más altos que el 50%, lo que sugiere que posiblemente en todas las mezclas se obtuvo un efecto sinergista entre los compuestos, es decir, se potencializó el efecto de cada compuesto. Las mezclas de estos metabolitos presentan una gran ventaja frente a otro tipo de productos ya que como lo menciona Mansour y colaboradores, los fitoquímicos podrían inhibir la capacidad del insecto de usar las enzimas de detoxificación que emplean contra productos sintéticos, además, por tratarse de una mezcla, proporciona mayor dificultad para el desarrollo de resistencia (Mansour *et al.*, 2015). Si se tiene en cuenta su efectividad y la baja toxicidad de estos compuestos en mamíferos, por ejemplo para el Nerolidol se estimó que en animales la dosis no tóxica es de 2000 mg/kg y para α -Felandreno en ratas el valor es de 5,7g/kg (Chan *et al.*, 2016), se pueden pensar en las anteriores mezclas de los compuestos como alternativas con uso potencial para el control del vector *A. aegypti*.

6 Conclusiones

Mediante el uso de las herramientas informáticas Osiris y Molinspirations, además del análisis estadístico por componentes principales, se pudo obtener una lista de 8 compuestos dentro de los cuales cuatro de ellos demostraron tener alta actividad en los ensayos de actividad larvicida.

En las pruebas realizadas con larvas, los compuestos α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-limoneno estudiados por separado mostraron CL_{50} de 44, 21, 19 y 6 ppm respectivamente, de los cuales se destaca el s-limoneno por su alta efectividad.

En los ensayos realizados con AchE, las cuatro sustancias α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-Limoneno, presentan efectos sobre la enzima disponible comercialmente (*Electrophorus electricus*) resaltando el α -Felandreno con un porcentaje de inhibición de 31 a 44 ppm. Sin embargo, estos mismos compuestos evaluados con la enzima contenida dentro del homogeneizado de las larvas no mostraron efectos con diferencias significativas cuando se comparan con el control, sugiriendo afectaciones debidas a la biodisponibilidad de los metabolitos en la suspensión de proteínas totales.

El α -felandreno ocasiona la disminución en el consumo de oxígeno debido a la inhibición del complejo I de la cadena energética mitocondrial, según los resultados obtenidos en el ensayo NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa, con valores de 47 y 12% de inhibición respecto al control.

Cuando se estudia el flujo normal de electrones desde el complejo I y II al IV, el α -Bisabolol es el metabolito con mayor inhibición en los ensayos NADH y succinato oxidasa con valores de 49 y 53 % respectivamente. Además, este compuesto presenta niveles de inhibición del complejo

IV de la cadena de fosforilación oxidativa, lo cual refuerza la disminución del consumo de oxígeno evidenciado en los ensayos NADH y succinato oxidasa.

El Nerolidol ocasionó la disminución en el consumo de oxígeno mitocondrial al inhibir los complejos I, II y IV (18, 19 y 29% respecto al control) de la cadena de transporte de electrones, siendo el compuesto con los valores más altos de reducción de la actividad enzimática de los 4 evaluados en este organelo.

A pesar de no haber mostrado efectos en los primeros cuatro complejos evaluados, el s-Limoneno fue el único compuesto en causar disminución de la actividad enzimática de la ATPasa (13%) de los cuatro compuestos evaluados. Mostrando así su capacidad para alterar la bioenergética de la mitocondria.

En todas las mezclas evaluadas se obtuvo altos porcentajes de mortalidad (más del 90 % de los individuos estudiados murieron al ser expuestos a los tratamientos) a las 2 y 24 horas de exposición a los compuestos, demostrando la alta eficacia de estos compuestos frente a larvas del vector *A. aegypti*.

7 Recomendaciones

Evaluar los efectos de la exposición a α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-Limoneno debido a la interacción de estas sustancias con la maquinaria relacionada al ciclo celular y la inducción de apoptosis.

Realizar ensayos de actividad larvica con mezclas de los compuestos disminuyendo las concentraciones, con el objetivo de encontrar el mínimo valor en el cual se sigue observando altos porcentajes de actividad, con el fin de exponer a los mosquitos a la menor cantidad de compuestos.

Una vez demostrada la eficacia larvica de la mezcla de compuestos, se recomienda la formulación de un insecticida, entiéndase como la elaboración de un producto que cuente con solventes, diluyentes, surfactantes etc. que pueda servir como mecanismo de control del vector antes de que logre su desarrollo a etapa adulta.

Realizar ensayos de repelencia para la mezcla de los 4 compuestos (α -Felandreno, α -Bisabolol, Nerolidol y s-Limoneno) con el objetivo de ampliar sus posibles aplicaciones no solo como insecticidas sino como protectores de las picaduras de los mosquitos *A. aegypti* en humanos.

Evaluar la actividad insecticida de los compuestos y sus mezclas en otras especies de vectores responsables de enfermedades en humanos como triatominos, insectos flebótomos entre otros.

8 Divulgación de resultados

Resultados de este trabajo titulados “Felandreno, Bisabolol y Nerolidol, compuestos con actividad insecticida en el vector *Aedes aegypti* y su actividad sobre la enzima acetilcolinesterasa” fueron presentados en el I encuentro internacional en ciencias de la salud: el saber y la tecnología al servicio de la vida. Realizado del 13 a 16 de junio de 2017. UIS Bucaramanga, Colombia.

Referencias Bibliográficas

- Arun, M., Satish, S., & Anima, P. (2016). Phytopharmacological Profile of *Jasminum grandiflorum* Linn. (Oleaceae). *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 22(4), 311–320.
<http://doi.org/10.1007/s11655-015-2051-3>
- Bacanli, M., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2015). The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 160–170.
<http://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.015>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
<http://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bhagavan, N., & Ha, C. (2011). *Essentials of Medical Biochemistry*. *Essentials of Medical Biochemistry*. <http://doi.org/10.1016/C2009-0-00064-6>
- Blomberg, M., & Siegbahn, P. E. M. (2012). The mechanism for proton pumping in cytochrome c oxidase from an electrostatic and quantum chemical perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(4), 495–505.
<http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.09.014>
- Boominathan, R., & Doran, P. M. (2003). Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *Journal of Biotechnology*, 101(2), 131–146. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00320-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00320-6)
- Burits, M., & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy*

Research, 14(5), 323–328. [http://doi.org/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q](http://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q)

Campanella, M., Seraphim, A., Abeti, R., Casswell, E., Echave, P., & Duchen, M. R. (2009).

IF1, the endogenous regulator of the F1Fo-ATP synthase, defines mitochondrial volume fraction in HeLa cells by regulating autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(5), 393–401. <http://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2009.02.023>

Carlier, P. R., Anderson, T. D., Wong, D. M., Hsu, D. C., Hartsel, J., Ma, M., Bloomquist, J. R.

(2008). Towards a species-selective acetylcholinesterase inhibitor to control the mosquito vector of malaria, *Anopheles gambiae*. *Chemico-Biological Interactions*, 175(1–3), 368–375. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.037>

Castillo, A. (2015). Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Salvia officinalis*

(Lamiaceae) frente a *Stegomyia aegypti* (Reinert et al., 2009) (DIPTERA: CULICIDAE). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

Cavalieri, E., Mariotto, S., Fabrizi, C., De Prati, A. C., Gottardo, R., Leone, S., Suzuki, H.

(2004). alpha Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(3), 589–594. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.088>

Chan, W. K., Tan, L. T. H., Chan, K. G., Lee, L. H., & Goh, B. H. (2016). *Nerolidol: A*

sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules* (Vol. 21). <http://doi.org/10.3390/molecules21050529>

Cruz, G. S., Wanderley-Teixeira, V., Oliveira, J. V., D'assunção, C. G., Cunha, F. M., Teixeira,

Á., Breda, M. O. (2017). Effect of trans-anethole, limonene and your combination in

- nutritional components and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemico-Biological Interactions*, 263, 74–80. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.12.013>
- Degli Esposti, M., Ghelli, A., Ratta, M., Cortes, D., & Estornell, E. (1994). Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochemical Journal*, 301(1), 161–167. <http://doi.org/10.1042/bj3010161>
- Demirci, B., Yusufoglu, H. S., Tabanca, N., Temel, H. E., Bernier, U. R., Agramonte, N. M., ... Demirci, F. (2017). *Rhanterium epapposum* Oliv. essential oil: Chemical composition and antimicrobial, insect-repellent and anticholinesterase activities. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(5), 703–708. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.10.009>
- Dharmagadda, V. S. S., Naik, S. N., Mittal, P. K., & Vasudevan, P. (2005). Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology*, 96, 1235–1240. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.020>
- Dias, C. N., & Moraes, D. F. C. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitology Research*, 113, 565–592. <http://doi.org/10.1007/s00436-013-3687-6>
- Dörsam, B., Wu, C. F., Efferth, T., Kaina, B., & Fahrner, J. (2015). The eucalyptus oil ingredient 1,8-cineol induces oxidative DNA damage. *Archives of Toxicology*, 89(5), 797–805. <http://doi.org/10.1007/s00204-014-1281-z>
- Dua, V. K., Kumar, a, Pandey, a C., & Kumar, S. (2013). Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. *Parasit*

Vectors, 6(1), 30. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-6-30>

Elumalai, K., Dhanasekaran, S., Anandan, a, Krishnappa, K., Gokulakrishnan, J., & Elangovan,

a. (2012). International Journal of Current Agricultural Sciences Issn : 2277 : 1026.

International Journal of Current Agricultural Sciences, 2, 28–33.

Enan, E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 130, 325–337.

[http://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00255-1](http://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00255-1)

Evergetis, E., Michaelakis, A., & Haroutounian, S. A. (2013). Exploitation of Apiaceae family

essential oils as potent biopesticides and rich source of phellandrenes. *Industrial Crops and*

Products, 41(1), 365–370. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.058>

Foster, W., Walker, E., & Fosterand, W. (2002). Mosquitoes (Culicidae). *Medical and*

Veterinary Entomology, 597. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012510451-](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012510451-7/50014-1)

[7/50014-1](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012510451-7/50014-1)

Francisco Peixoto, D. Santos, A. Barao, C. Parlmeira, S. Rocha, M. C. (2008). Nerolidol disturbs

mitochondrial bioenergetics but delays the permeability transition pore due a membrane

antioxidant protective effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*,

1777(2008), S63–S64. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.05.250>

Gade, S., Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Nukala, K. M., Aluvala, R., Giddigari, C.,

Upadhyayula, S. (2017). Acetylcholinesterase inhibitory activity of stigmasterol &

hexacosanol is responsible for larvicidal and repellent properties of *Chromolaena odorata*.

Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1861(3), 541–550.

<http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.044>

Geris, R., Ribeiro, P. R., Da Silva Brandão, M., Da Silva, H. H. G., & Da Silva, I. G. (2012).

Chapter 10 - Bioactive Natural Products as Potential Candidates to Control Aedes aegypti, the Vector of Dengue. Studies in Natural Products Chemistry (Vol. Volume 37).

<http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59514-0.00010-9>

Gonzalez-Coloma, a., Reina, M., Diaz, C. E., Fraga, B. M., & Santana-Meridas, O. (2013).

Natural Product-Based Biopesticides for Insect Control. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.02770-0>

Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswary, M., & Veerakumar, K. (2013). Mosquito larvicidal

activity of thymol from essential oil of *Coleus aromaticus* Benth. against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus*, and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae).

Parasitology Research, 112, 3713–3721. <http://doi.org/10.1007/s00436-013-3557-2>

Grisales, N., Poupardin, R., Gomez, S., Fonseca-Gonzalez, I., Ranson, H., & Lenhart, A. (2013).

Temephos Resistance in *Aedes aegypti* in Colombia Compromises Dengue Vector Control.

PLoS Neglected Tropical Diseases, 7(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002438>

Hellwig, P., Kriegel, S., & Friedrich, T. (2016). Infrared spectroscopic studies on reaction

induced conformational changes in the NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I).

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1857(7), 922–927.

<http://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2015.12.005>

Houghton, P., Ren, Y., & Howes, M.-J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and

fungi. *Nat Prod Rep*, 23, 181–199. <http://doi.org/10.1039/b508966m>

J. Lin, C. Wu, S. Hsu, S. Weng, Y. Ma, Y. Huang, J. Lin, J. C. (2015). Alpha-Phellandrene

induced DNA damage and affect DNA repair protein expression in WEHI-3 murine leukemia cells In vitro. *Environmental Toxicology*, 30(3), 1322–1330.

<http://doi.org/10.1002/tox.22003> C

Jansen, C. C., & Beebe, N. W. (2010). The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next.

Microbes and Infection, 12(4), 272–279. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.011>

Jantová, S., Hudec, R., Sekretár, S., Kučerák, J., & Melušová, M. (2014). *Salvia officinalis* L.

extract and its new food antioxidant formulations induce apoptosis through mitochondrial/caspase pathway in leukemia L1210 cells. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(3), 146–153.

<http://doi.org/10.2478/intox-2014-0020>

Kim, E., Erdos, G., Huang, S., Kenniston, T., Falo, L. D., & Gambotto, A. (2016). Preventative

Vaccines for Zika Virus Outbreak: Preliminary Evaluation. *EBioMedicine*, 13, 315–320.

<http://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.028>

Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., & Shaaya, E. (2002). Activation of

octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants:

Possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science*, 58(April), 1101–

1106. <http://doi.org/10.1002/ps.548>

Kramer, D. M., Roberts, A. G., Muller, F., Cape, J., & Bowman, M. K. (2004). Q-Cycle Bypass

Reactions at the Qo Site of the Cytochrome bc₁ (and Related) Complexes. *Methods in*

Enzymology, 382(2003), 21–45. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)82002-0](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)82002-0)

Kuhlbrandt, W., & Davies, K. M. (2016). Rotary ATPases: A New Twist to an Ancient Machine.

Trends in Biochemical Sciences, 41(1), 106–116. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.10.006>

- Le, N.-Q., Nguyen, T.-T., & Ou, Y.-Y. (2017). Identifying the molecular functions of electron transport proteins using radial basis function networks and biochemical properties. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 73, 166–178.
<http://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.01.003>
- Length, F. (2012). Chemical constituents, larvicidal effects and antioxidant activity of petroleum ether extract from seeds of *Coriandrum sativum* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(15), 2948–2954. <http://doi.org/10.5897/JMPR11.992>
- Li, H. P., Chang, J., Feng, T., & Gao, X. W. (2015). Differential effects of insecticides on mitochondrial membrane fluidity and ATPase activity between the wolf spider and the rice stem borer. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(12), 2574–2580.
[http://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61074-7](http://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61074-7)
- Lima, M. a a, Oliveira, F. F. M. De, Gomes, G. a, Patrícia, L. L., Santiago, G. M. P., Nagao-dias, A. T., Carvalho, M. G. De. (2011). Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *African Journal of Biotechnology*, 10 (SEPTEMBER), 11716–11720. <http://doi.org/10.5897/AJB11.1102>
- Maestre-Serrano, R., Gomez-Camargo, D., Ponce-Garcia, G., & Flores, A. E. (2014). Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 116, 63–73.
<http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.09.014>
- Manimaran, A., Jee, M. M., Cruz, J., Muthu, C., Vincent, S., & Ignacimuthu, S. (2012). Larvicidal and knockdown effects of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say, *Aedes aegypti* (L .) and *Anopheles stephensi* (Liston). *Advances in Bioscience and*

Biotechnology, 3, 855–862.

Mansour, S. A., El-Sharkawy, A. Z., & Abdel-Hamid, N. A. (2015). Toxicity of essential plant oils, in comparison with conventional insecticides, against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Industrial Crops and Products*, 63, 92–99.

<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.038>

Mas, I., La, J., Horva, E., Kubala, P., & Jakubi, J. (2004). Cytotoxic and DNA-Damaging Effects of Diterpenoid Quinones from the Roots of *Salvia officinalis* L. on Colonic and Hepatic Human Cells Cultured in vitro. *ova*, 282–290.

Molinspiration, (2015). Molinspiration Properties. Eslovenia. www.molinspiration.com/cgi-bin/properties

Montironi, I. D., Cariddi, L. N., & Reinoso, E. B. (2016). Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(3), 210–216. <http://doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.005>

Myers, D. K., & Slater, E. C. (1957). The enzymatic hydrolysis of adenosine triphosphate by live mitochondria. I. Activities at different pH values. *Biochemical Journal*, 67, 558–572.

Nayak, A., Gayen, P., Saini, P., Mukherjee, N., & Sinha Babu, S. P. (2012). Molecular evidence of curcumin-induced apoptosis in the filarial worm *Setaria cervi*. *Parasitology Research*, 111, 1173–1186. <http://doi.org/10.1007/s00436-012-2948-0>

Oliveira, F. de S., Freitas, T. S. de, Cruz, R. P. da, Costa, M. do S., Pereira, R. L. S., Quintans-Júnior, L. J., Coutinho, H. D. M. (2017). Evaluation of the antibacterial and modulatory

potential of α -bisabolol, β -cyclodextrin and α -bisabolol/ β -cyclodextrin complex.

Biomedicine and Pharmacotherapy, 92, 1111–1118.

<http://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.020>

OMS. (2009). Dengue guías para el diagnostico, tratamiento, prevencion y control. In OMS, *Programa Especial para Investigacion y capacitacion de Enfermedades Tropicales* (pp. 113–115).

OMS. (2017). Respuesta mundial para el control de vectores 2017 – 2030, 2030. Retrieved from http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA70/A70_26Rev1-sp.pdf

Organic Chemistry Portal. (2015). Osiris Property Explorer. Switzerland. Organic-chemistry.org. <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>

Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174–187. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>

Pavela, R., K, K., & M, K. (2014). Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils from Different *Mentha L.* and *Pulegium* Species against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera : Culicidae). *Plant Protection*, 50(1), 36–42.

Perry, N. S. L., Houghton, P. J., Jenner, P., Keith, a, & Perry, E. K. (2002). *Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase in vivo. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 9, 48–51. <http://doi.org/10.1078/0944-7113-00082>

Petersen, P. E. (1996). World Health Organization. Informe sobre la salud en el mundo.

- Combatar las enfermedades, promover el desarrollo. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 31(6), 471–471. <http://doi.org/10.1046/j.1600-0528.2003.00124.x>
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 39. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39>
- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datt, A., & Racker, E. (1960). Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 235(11), 3323–3329.
- Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29(9), 913–920. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>
- Russo, R., Ciociaro, A., Berliocchi, L., Valentina Cassiano, M. G., Rombol, L., Ragusa, S., Corasaniti, M. T. (2013). Implication of limonene and linalyl acetate in cytotoxicity induced by bergamot essential oil in human neuroblastoma cells. *Fitoterapia*, 89(1), 48–57. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.05.014>
- Saito, A. Y., Marin Rodriguez, A. A., Menchaca Vega, D. S., Sussmann, R. A. C., Kimura, E. A., & Katzin, A. M. (2016). Antimalarial activity of the terpene nerolidol. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(6), 641–646. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.017>
- Senthilkumar, A., Kannathasan, K., & Venkatesalu, V. (2008). Chemical constituents and larvicidal property of the essential oil of *Blumea mollis* (D. Don) Merr. against *Culex quinquefasciatus*. *Parasitology Research*, 103(June 2007), 959–962. <http://doi.org/10.1007/s00436-008-1085-2>

- Settas, N., Faucz, F. R., & Stratakis, C. A. (2017). Succinate dehydrogenase (SDH) deficiency, Carney triad and the epigenome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1–5.
<http://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.018>
- Shanmuganathan, B., Malar, D. S., Sathya, S., & Devi, K. P. (2015). Antiaggregation potential of padina gymnospora against the toxic Alzheimer's beta-amyloid peptide 25-35 and cholinesterase inhibitory property of its bioactive compounds. *PLoS ONE*, 10(11), 1–14.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0141708>
- Silva, B. G. da, Fileti, A. M. F., Foglio, M. A., Ruiz, A. L. T. G., & Rosa, P. de T. V. e. (2017). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds from Schinus terebinthifolius Raddi fruits: Effects of operating conditions on global yield, volatile compounds, and antiproliferative activity against human tumor cell lines. *The Journal of Supercritical Fluids*, 130(April), 10–16. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.07.006>
- Siqueira, H. D. A. S., Neto, B. S., Sousa, D. P., Gomes, B. S., da Silva, F. V., Cunha, F. Oliveira, F. A. (2016). α -Phellandrene, a cyclic monoterpene, attenuates inflammatory response through neutrophil migration inhibition and mast cell degranulation. *Life Sciences*, 160, 27–33. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.07.008>
- Smith, L. B., Kasai, S., & Scott, J. G. (2016). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.005>
- Somlo, M. (1965). Induction of Lactate-Cytochrome C Reductases (D- and L-) of Aerobic Yeast by Lactates (D- and L-). *Biochimica et Biophysica Acta*, 97, 183–201.
- Story, K., Baust, J., & Buescher, P. (1981). Determination of Water “ Bound ” by Soluble

Subcellular. *Cryobiology*, 321, 315–321.

Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review.

Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 108(August), 11–17. <http://doi.org/10.1590/0074-0276130395>

Teixeira, G. F. D., Vieira-Neto, A. E., da Costa, F. N., e Silva, A. R. A., & Campos, A. R.

(2017). Antinociceptive effect of (-)- α -bisabolol in nanocapsules. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 91, 946–950. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.024>

Terroso, T. F., Condotta, K. B., da Fonseca, F. N., Jornada, D. S., Ferreira, G. O., Ellwanger, J.

H., Guterres, S. S. (2016). In vivo prophylactic gastroprotection using α -bisabolol encapsulated in lipid-core nanocapsules and in cocoa-theospheres. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 36, 99–109. <http://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.10.002>

Ugarte, R. (2014). Interaction between glyphosate and mitochondrial succinate dehydrogenase.

Computational and Theoretical Chemistry, 1043, 54–63.

<http://doi.org/10.1016/j.comptc.2014.05.018>

Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T., & Norberg, E. (2017). The role of mitochondria in

metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 426–431. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>

Vera, S., Zambrano, D. F., Méndez-Sanchez, 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), 2647–54.

<http://doi.org/10.1007/s00436-014-3917-6>

- Vicuña, G. C., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2010). Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 81(5), 343–349. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.10.008>
- Vorburger, P., Lo, M., Choua, S., Bernard, M., Melin, F., Oueslati, N., ... Weiss, J. (2017). A question of flexibility in cytochrome c oxidase models. *Inorganica Chimica Acta*, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.ica.2017.04.052>
- Wang, J., Qi, L., Zheng, S., & Wu, T. (2009). Curcumin induces apoptosis through the mitochondria-mediated apoptotic pathway in HT-29 cells. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 10(2), 93–102. <http://doi.org/10.1631/jzus.B0820238>
- Xia, D., Esser, L., Tang, W. K., Zhou, F., Zhou, Y., Yu, L., & Yu, C. A. (2013). Structural analysis of cytochrome bc1 complexes: Implications to the mechanism of function. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(11–12), 1278–1294. <http://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2012.11.008>