

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

**Estudio *in silico* e *in vivo* de metabolitos secundarios de plantas con posible acción
inhibitoria sobre proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y la
acetilcolinesterasa de *Rhipicephalus microplus***

Bethsy Natalia Alfonso Núñez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez, (Ph. D)

Doctora en ciencias, bioquímica

Codirectora

Gloria Stefany Avendaño Mora, (Ms.C)

Candidata a doctora en química

Asesor

Jonny Edward Duque Luna, (Ph. D)

Doctor en Ciencias Biológicas con énfasis en Entomología Médica

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2024

La permanencia, perseverancia y persistencia a pesar de todos los obstáculos, desalientos e imposibilidades: es eso lo que distingue las almas fuertes de las débiles.

Thomas Carlyle

Dedicatoria

A mis padres, mis hermanas, mi tía y demás familiares que desde siempre creyeron y me hicieron creer que ninguno de mis proyectos es imposible.

Agradecimientos

A las cuatro razones de mi vida, mis padres y hermanas, porque gracias a su existencia quiero levantarme y ser mejor cada día.

A mi mami, por decirme desde pequeña que yo estaba hecha para lograr grandes cosas, por hacer crecer en mí la seguridad y confianza necesaria para no rendirme nunca y entender que tengo un gran propósito de vida. Gracias por acompañarme, a lograr cada una de las metas que me he propuesto, por animarme y escucharme cuando no pasaba momentos fáciles y sobre todo, por ser mi mayor inspiración.

A mi papá, por ser el hombre que más me ama y apoya en el mundo, por sus esfuerzos diarios para apoyarme anímica y económicamente, pero sobre todo por ser mi mayor ejemplo de perseverancia.

A mis hermanas porque siempre fueron mi compañía y espacio de confort cuándo necesitaba salir de la rutina, gracias por creer en mí y hacerme sentir siempre tan empoderada.

A mi tía por ser la primera persona que me acogió en su hogar, cuando llegué en busca de este sueño, por sus palabras de aliento, consejos, regaños e infinitos sacrificios.

A mi nona por estar siempre pendiente de mi bienestar, apoyándome, enseñándome el valor de la familia y por sentirse tan orgullosa de mí en cada paso que he dado a lo largo de mi vida.

A mis amigos de la universidad, Tatiana, Sofía, Martha, Angie, Valeria, Manuel y Elián, que también creyeron en mí y me dieron mucha fuerza, gracias por ser mis cómplices y confidentes, de los cuales aprendí muchísimo a nivel personal.

A la profesora Stelia y el profesor Jonny por contribuir tanto en mi vida académica y personal, porque me apoyaron en momentos difíciles y me enseñaron el valor de la persistencia y voluntad.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

A Gloria por ser mi consejera, maestra y guía durante mi proyecto, gracias por escucharme y orientarme siempre, impulsándome a mejorar y lograr lo que me proponía.

A cada uno de mis compañeros de los laboratorios 110 y 402 por sus infinitas enseñanzas, por su amabilidad y generosidad con todas las personas que llegamos a trabajar y aprender junto a ustedes.

Un agradecimiento especial a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) de la Universidad Industrial de Santander, por el financiamiento del proyecto 3739 “Formulación de un ixodicida y/o ixorepelente diseñado en laboratorio con validación en campo proyectado para la prevención de la infestación de garrapatas en bovinos”

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Marco de referencia y antecedentes	16
1.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	16
1.2 Distribución geográfica.....	17
1.3 Ciclo de vida de <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
1.3.1 Fase de vida parasitaria	19
1.3.1.1 Larva	19
1.3.1.2 Ninfa	20
1.3.1.3 Adulto	20
1.3.2 Fase de vida no parasitaria o de vida libre	20
1.3.2.1 Preoviposición.....	20
1.3.2.2 Oviposición	20
1.3.2.3 Post-oviposición.....	20
1.3.2.4 Incubación.....	21
1.3.2.5 Eclosión.....	21
1.3.3 Longevidad de las garrapatas de la especie <i>R. microplus</i>	21
1.4 ¿Cómo busca su huésped la garrapata?.....	21
1.5 Problemas económicos en la ganadería causados por <i>Rhipicephalus microplus</i>	22
1.5.1 Enfermedades transmitidas por <i>Rhipicephalus microplus</i>	23
1.6 Métodos de control usados para combatir la garrapata <i>R. microplus</i>	23
1.7 Mecanismos de acción de los acaricidas químicos convencionales contra garrapatas	25
1.8 Mitocondria, complejos de la cadena respiratoria y acetilcolinesterasa	29
1.9 Métodos comunes para bioensayos con garrapatas	37
1.10 Cribado de compuestos asistido por técnicas computacionales.....	38
1.11 Acoplamiento molecular	39
1.11.1 Maestro de Schrödinger	40
1.12 Modelos de homología y Alphafold	43
2. Objetivos.....	46

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

2.1	Objetivo General.....	46
2.2	Objetivos Específicos.....	46
3.	Metodología general del proyecto	46
3.1	Metodología fase preliminar	47
3.2	Metodología fase <i>in silico</i>	48
3.2.1	Secuencia primaria y modelos de homología	48
3.2.2	Preparación de ligandos y proteínas de interés.....	48
3.2.3	Posible sitio de interacción	48
3.2.4	Docking molecular de los ligandos.....	49
3.2.5	Visualización.....	50
3.3.	Metodología fase <i>in vivo</i>	50
3.3.1	Metodología para manejo de las garrapatas dentro y fuera del laboratorio.....	50
3.3.1.1	Colecta de garrapatas adultas ingurgitadas	51
3.3.1.2	Transporte de garrapatas ingurgitadas al laboratorio.....	51
3.3.1.3	Limpieza de garrapatas adultas ingurgitadas que ingresan al laboratorio	51
3.3.1.4	Incubación de garrapatas adultas ingurgitadas en el laboratorio	51
3.3.1.5	Colecta de huevos de garrapatas en el laboratorio.....	52
3.3.1.6	Incubación de huevos en el laboratorio	52
3.3.1.7	Incubación de larvas en el laboratorio	52
3.3.1.8	Protocolo para desechar garrapatas adultas y larvas.....	52
3.4	Paquete de larvas o test de paquete larval.....	52
3.5	Inmersión larval	54
3.6	Análisis estadístico:	55
4.	Resultados Fase <i>in silico</i>	57
4.1	Subunidad NAD4, Cadena 4 del complejo I.....	57
4.1.1	Resultados modelo de homología y docking molecular.	57
4.2	Subunidad hierro-azufre, mitocondrial del complejo II.....	61
4.2.1	Resultados modelo de homología y docking molecular.	61
4.3	Subunidad rieske mitocondrial del complejo III.....	65
4.3.1	Resultados modelo de homología y docking molecular.	65
4.4	Subunidad COX1 Subunidad 1 del complejo IV.....	69

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

4.4.1 Resultados modelo de homología y docking molecular.	69
4.5 Acetilcolinesterasa (AChE)	72
4.5.1 Resultados modelo de homología y docking molecular.	72
5. Resultados fase <i>in vivo</i>	77
5.1 Resultados de paquete larval.....	77
5.2 Resultados inmersión larval.....	84
6. Discusión de resultados.....	91
7. Conclusiones	98
8. Recomendaciones	99
9. Divulgación de resultados.....	100
Referencias Bibliográficas	101
Anexos	118

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Mecanismo de acción de los grupos de acaricidas comerciales más comunes para el control de <i>R. microplus</i> , estructuras químicas de las acaricidas	26
Tabla 2. Coordenadas de la caja arrojadas por site map para cada subunidad.	49
Tabla 3. Metabolitos con menor energía de afinidad para la subunidad NAD4, Cadena 4 del complejo I, luego de realizar el docking molecular.	58
Tabla 4. Metabolitos con menor energía de afinidad para la subunidad de hierro-azufre, mitocondrial del complejo II, luego de realizar el docking molecular	62
Tabla 5. Metabolitos con menor energía de afinidad para la subunidad rieske mitocondrial del complejo III , luego de realizar el docking molecular.	66
Tabla 6. Metabolitos con menor energía de afinidad para la subunidad COX1 Subunidad 1 del, complejo IV, luego de realizar el docking molecular	70
Tabla 7. Metabolitos con menor energía de afinidad para la acetilcolinesterasa (AChE), luego de realizar el docking molecular.	74
Tabla 8. Interacciones semejantes para los mejores metabolitos y los compuestos de referencia.76	76
Tabla 9. Datos de mortalidad obtenidos para cada metabolito por el método de paquete larval..	82
Tabla 10. Datos para concentraciones letales a 24, 48 y 72 horas para el carvacrol por paquete larval.	84
Tabla 11. Datos de mortalidad obtenidos para cada metabolito por el método de inmersión larval	89
Tabla 12. Datos para concentraciones letales a 24, 48 y 72 horas para el carvacrol por inmersión larval	91

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Morfología <i>R. microplus</i> A. Hembra B. Macho, con algunas modificaciones realizadas por la autora de este trabajo	16
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Rhipicephalus microplus</i> por departamentos en Colombia	17
Figura 3. Ciclo de vida de la garrapata <i>R. microplus</i>	18
Figura 4. Cadena respiratoria mitocondrial	29
Figura 5. Mecanismo de acción en la hidrólisis de la acetilcolina.....	34
Figura 6. Mecanismo de acción de la acetilcolinesterasa en la neurotransmisión.....	35
Figura 7. Esquema metodológico del proyecto.....	46
Figura 8. Protocolo experimental para ensayos de actividad acaricida por paquete de larvas	53
Figura 9. Protocolo experimental para ensayos de actividad acaricida por inmersión larval.....	55
Figura 10. Modelo de homología para la subunidad NAD4, Cadena 4 del complejo I, realizado por AlphaFold.	57
Figura 11. Posiciones de acoplamiento de las moléculas con posible actividad acaricida de la subunidad NAD4, Cadena 4 del complejo I en <i>Rhipicephalus microplus</i>	60
Figura 12. Modelo de homología para la subunidad de hierro-azufre, mitocondrial del complejo II realizado por AlphaFold	61
Figura 13. Posiciones de acoplamiento de los metabolitos con posible actividad acaricida de la subunidad hierro-azufre mitocondrial del complejo II en <i>R. microplus</i>	64
Figura 14. Modelo de homología para la subunidad rieske mitocondrial del complejo III, realizado por AlphaFold.....	65
Figura 15. Posiciones de acoplamiento de las moléculas con posible actividad acaricida para la subunidad rieske mitocondrial del complejo III en <i>R. microplus</i>	68
Figura 16. Modelo de homología para la subunidad COX1 Subunidad 1 del, complejo IV, realizado por AlphaFold	69
Figura 17. Posiciones de acoplamiento de las moléculas con posible actividad acaricida para la subunidad COX1 Subunidad 1 del complejo IV en <i>R. microplus</i>	72
Figura 18. Modelo de homología para la subunidad AChE2 de la acetilcolinesterasa, realizado por AlphaFold	73
Figura 19. Posiciones de acoplamiento de las moléculas con posible actividad acaricida para la acetilcolinesterasa (AChE) en <i>R. microplus</i>	75
Figura 20. Porcentaje de mortalidad para el ensayo de paquete larval con: A) quercetina B) carvacrol C) linalool D) eugenol.....	78
Figura 21. Porcentaje de mortalidad para el ensayo de paquete larval con: A) linalool B) eugenol	78
Figura 22. Porcentaje de mortalidad para el ensayo de paquete larval con A) citral B) ácido gálico C) naringenina.....	80

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Figura 23. Porcentaje de mortalidad para el ensayo de paquete larval con carvacrol a siete concentraciones diferentes.....	83
Figura 24. Porcentaje de mortalidad para el ensayo de inmersión larval con A) quercetina B) carvacrol.....	85
Figura 25. Porcentaje de mortalidad para el ensayo de inmersión larval con A) linalool B) eugenol, a tres concentraciones diferentes	86
Figura 26. Porcentaje de mortalidad para el ensayo de inmersión larval con A) citral B) ácido gálico C) naringenina	87
Figura 27. Porcentaje de mortalidad para el ensayo de inmersión larval con carvacrol+etanol 10% a siete concentraciones diferentes.....	90
Figura 28. Estructura química de los metabolitos probados en la fase <i>in vivo</i>	98

Lista de Anexos

	pág.
Anexo 1. Base de datos de 300 metabolitos secundarios de extractos de plantas, con posible actividad acaricida en <i>Rhipicephalus microplus</i>	118
Anexo 2. Certificado de participación en el V Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 y la XI Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis SLAMTB, 2023.....	137

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Resumen

Título: Estudio *in silico* e *in vivo* de metabolitos secundarios de plantas con posible acción inhibitoria sobre proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa de *Rhipicephalus microplus*

Autor: Bethsy Natalia Alfonso Núñez

Palabras Clave: Metabolitos secundarios, cadena respiratoria, acetilcolinesterasa, *Rhipicephalus microplus*, acoplamiento molecular, acaricida.

Descripción:

La especie de garrapata *Rhipicephalus microplus* es responsable de pérdidas económicas en la ganadería colombiana por aproximadamente 146 millones de dólares por año; además, es vector de enfermedades como la babesiosis y anaplasmosis que generan en el ganado anemia, pérdida de peso y pueden llegar a causar finalmente la muerte. El método de control más común entre los ganaderos es el control químico, con acaricidas del grupo de los organofosforados, piretroides y lactonas macrocíclicas. Sin embargo, las garrapatas desarrollan resistencia rápidamente a estos productos sintéticos, en consecuencia, los ganaderos elevan la concentración del producto, combinan varios compuestos y aumentan la frecuencia en los baños, incrementando a su vez el problema de resistencia. Es necesario estudiar una alternativa eficaz y asequible económicamente para el control de esta garrapata, es por eso que este proyecto tiene como objetivo identificar metabolitos de plantas con posible actividad acaricida contra *R. microplus* con eficacia comparada o mejorada a las moléculas sintéticas y especificidad en este organismo. Por lo que se realizó un estudio de acoplamiento molecular con 300 metabolitos secundarios, usando como dianas farmacológicas, subunidades de los primeros cuatro complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa. Para el análisis *in silico* se obtuvieron modelos de homología con el software Alphafold de las proteínas de interés, se prepararon proteínas y ligandos usando Protein Preparation Wizard, Ligprep y un campo de fuerza OPLS3e en Maestro de Schrödinger. Se predijo el sitio drogable con Site Map y Receptor Grid generation. El Docking molecular se realizó con el módulo Glide bajo los criterios de precisión estándar (SP) y extra precisión (XP). Finalmente, se examinaron las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) y se seleccionaron aquellos metabolitos con interacciones, docking score y energía de afinidad más favorable para su validación mediante ensayos *in vivo*.

La actividad acaricida se realizó usando dos métodos comunes en este campo, el paquete larval e inmersión larval. Los metabolitos mejor ranqueados y que se evaluaron en estos ensayos fueron: carvacrol, quercetina, naringenina, ácido gálico, linalool, eugenol y citral. Para el método de paquete larval se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con $p \leq 0,05$ para el carvacrol en las concentraciones diagnósticas, y por medio de un análisis Probit usando concentraciones múltiples se obtuvo una CL_{50} de 683 ppm a 72h. En el método de inmersión larval se encontraron diferencias estadísticamente significativas con $p \leq 0,05$ para el carvacrol, eugenol y citral en las concentraciones diagnósticas. Debido a que el carvacrol presentó resultados prometedores en ambos métodos, fue este el candidato para determinar la CL_{50} en inmersión, cuyo valor obtenido fue de 570 ppm a 72h. El eugenol y el citral se catalogaron como moléculas promisorias con actividad ixodicida, próximas a evaluar en el grupo de investigación. De este trabajo de investigación se concluye que un sistema de análisis *in silico* validado *in vivo* permitió identificar metabolitos secundarios con actividad acaricida, cuyo posible mecanismo de acción podría estar direccionado a dianas farmacológicas como proteínas específicas de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa de la especie *R. microplus*.

* Trabajo de Grado

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Química. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez. Ph. D.

Codirector: Gloria Stefany Avendaño Mora. MS. C.

Abstract

Title: *In silico* and *in vivo* study of plant secondary metabolites with possible inhibitory action on mitochondrial respiratory chain proteins and acetylcholinesterase of *Rhipicephalus microplus*

Author: Bethsy Natalia Alfonso Núñez

Keywords: Secondary metabolites, respiratory chain, acetylcholinesterase, *Rhipicephalus microplus*, molecular docking, acaricide.

Description:

The tick species *Rhipicephalus microplus* causes significant economic losses in Colombian livestock, estimated at approximately US\$146 million annually. Additionally, this tick also acts as a vector for diseases such as babesiosis and anaplasmosis, which can lead to anemia, weight loss, and potentially fatal outcomes in cattle. The predominant control method employed by livestock farmers is the use of chemical agents, including organophosphate acaricides, pyrethroids, and macrocyclic lactones. However, the rapid development of resistance to these synthetic chemicals by ticks has prompted farmers to increase the concentration of these products, combine multiple compounds, and enhance the frequency of treatments, thereby exacerbating the resistance issue. There is a pressing need to explore effective and economically viable alternatives for tick control. This work aims to identify plant metabolites that exhibit potential acaricidal activity against *R. microplus*, with efficacy comparable to or exceeding that of synthetic compounds, while also demonstrating specificity for this organism. To achieve this, a molecular docking study was conducted involving 300 secondary metabolites, targeting subunits of the first four complexes of the mitochondrial respiratory chain and acetylcholinesterase. For the *in silico* analysis, homology models of the proteins of interest were generated using AlphaFold software, and the proteins and ligands were prepared utilizing Protein Preparation Wizard, Ligprep, and the OPLS3e force field within Schrödinger's Master. The druggable sites were predicted using Site Map, followed by receptor grid generation. Molecular docking was executed with the Glide module, adhering to both standard precision (SP) and extra precision (XP) criteria.

The acaricidal activity was assessed through two widely recognized methodologies in this domain: the larval packet method and the larval immersion method. The metabolites that exhibited the highest efficacy in these evaluations included carvacrol, quercetin, naringenin, gallic acid, linalool, eugenol, and citral. In the larval packet method, carvacrol demonstrated statistically significant differences at diagnostic concentrations, with a p-value of ≤ 0.05 . A Probit analysis conducted with various concentrations yielded an LC_{50} value of 683 ppm after 72 hours. Similarly, in the larval immersion method, significant differences were observed for carvacrol, eugenol, and citral at diagnostic concentrations, with a p-value of ≤ 0.05 . Given its favorable outcomes in both methodologies, carvacrol was selected for further LC_{50} determination in the immersion method, resulting in a value of 570 ppm at 72 hours. Additionally, eugenol and citral were identified as promising candidates with ixodicidal properties, warranting further investigation by the research team. This study concludes that an *in silico* analysis system, validated through *in vivo* experiments, facilitated the identification of secondary metabolites with acaricidal potential, likely targeting pharmacological mechanisms associated with specific proteins in the mitochondrial respiratory chain and acetylcholinesterase of the *R. microplus* species.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

* Degree work

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Chemistry. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez. Ph. D. Co-director: Gloria Stefany Avendaño Mora. Master's degree

Introducción

Las garrapatas son parásitos hematófagos que se pueden encontrar en diferentes tipos de climas, desde secos hasta los más húmedos, pueden sobrevivir incluso años sin alimentarse, esperando encontrar un hospedero (Boulangier et al., 2019). Los hospederos pueden ser desde aves y reptiles, hasta mamíferos. Dentro del grupo de mamíferos más afectados se encuentran los bovinos, en Colombia, la especie de garrapata que más los afecta es *R. microplus* (Rodríguez et al., 2014a). Se estima que esta especie infesta alrededor del 80% del ganado bovino en el mundo, además, les genera problemas debido a la transmisión de microorganismos causantes de la babesiosis y anaplasmosis (Polanco & Ríos, 2016). Estas enfermedades tienen consecuencias que van desde alergias en la piel, disminución de peso, anemia, disminución de leche y carne, hasta la muerte (Adenubi et al., 2016). Se reporta que una sola garrapata adulta ingurgitada puede reducir la ganancia de peso en promedio de 0.6 g y reducir 8.9 mL de leche diariamente en un bovino (Sutherst et al., 1983), por lo cual un número de 20 garrapatas adultas en un solo animal se considera un riesgo para su salud (Sepúlveda et al., 2017). En Colombia, las pérdidas económicas para el sector ganadero alcanzan los 146 millones de dólares y a nivel mundial se estiman alrededor de 7 billones de dólares por año (Benavides et al., 2018). Además, Colombia es el tercer productor ganadero más grande de Sudamérica, representando el 51,5% del PIB pecuario y 1,1 millones de empleos en nuestro país (Fedegan, 2024).

Actualmente, existen varios métodos de control para esta especie de garrapata, como el uso de acaricidas sintéticos, vacunas, hongos entomopatógenos (Weber & Selzer, 2016), rotación de

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

praderas (Rosario et al., 2010), uso de pasturas con propiedades repelentes (Del Hoyo Primitivo et al., 2012) y extractos de plantas (Jaramillo et al., 2020). Sin embargo, el método de control más común es el método químico, donde se usan acaricidas con principios activos de tipo organofosforados, piretroides sintéticos y lactonas macrocíclicas. Su desventaja es que pierden eficacia rápidamente y en consecuencia, los ganaderos aumentan las concentraciones de uso recomendado en las etiquetas, realizan baños con mayor frecuencia, cambios aleatorios en el acaricida o combinan varios compuestos para el tratamiento en los bovinos, por tanto, incrementan el desarrollo de resistencia de las garrapatas a estos compuestos (Lopez et al., 2015; Velázquez & Otegui, 2016). Estos productos también son tóxicos y dañinos con el medio ambiente, incluso pueden ser perjudiciales para el personal que los manipula (Avellaneda Bustos et al., 2020). Siendo los organofosforados, el grupo de acaricidas que ocasionan con mayor frecuencia intoxicación aguda en las personas (Roa & del Pilar, 2021). Además, los acaricidas sintéticos producen bioacumulación en tejidos, contaminando los subproductos bovinos como la leche y carne (Bravo & Bravo, 2023; Yaima & Díaz, 2022)

Debido a la urgente necesidad de encontrar compuestos con acción acaricida, eficaces a lo largo del tiempo, más amigables con el ambiente y las personas que los manipulan, en este estudio se tuvo como objetivo identificar y seleccionar metabolitos secundarios de plantas con posible acción acaricida contra *R. microplus*. Por lo cual, se llevó a cabo una búsqueda en literatura de 300 metabolitos secundarios de plantas. Posteriormente, se usaron modelos de homología y docking molecular para filtrar las mejores moléculas; finalmente se seleccionaron 7 compuestos para evaluar actividad acaricida en larvas de *R. microplus*, mediante dos ensayos que se describen en la metodología de este proyecto. También se muestra en este proyecto una revisión de la problemática actual por la infestación de garrapatas en el sector ganadero colombiano, las pérdidas

económicas producidas, la poca información sobre mecanismos de acción acaricida de las moléculas de origen natural y, por tanto, la necesidad de estudiarlos para diseñar acaricidas contra *R. microplus* de manera rápida, eficiente y asequible.

1. Marco de referencia y antecedentes

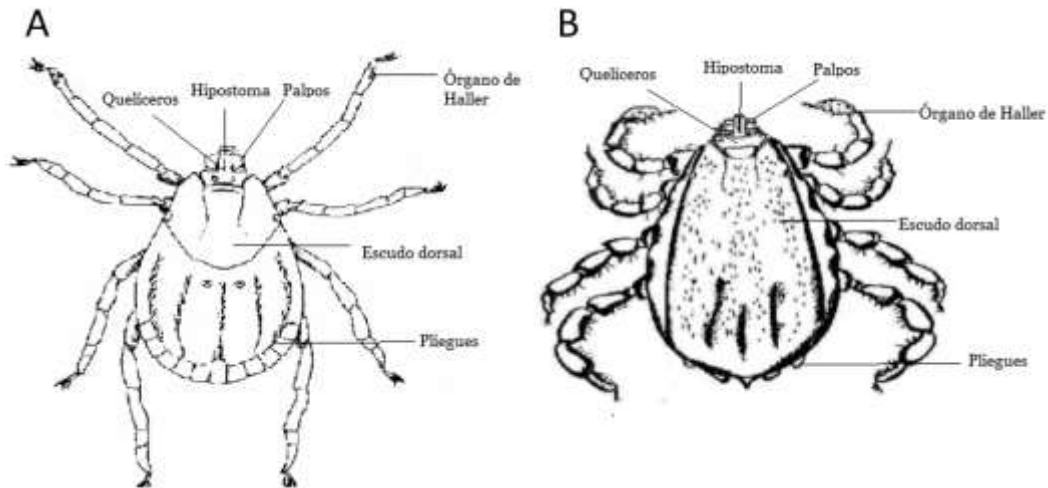
1.1 *Rhipicephalus microplus*

Es una especie de garrapata de un solo hospedero, lo cual quiere decir que completa todo su ciclo de vida parasitario sobre un solo animal. Esta especie pertenece a la familia **ixodidae** y es la familia de garrapatas con el mayor número de especies reportadas en el mundo (Acevedo et al., 2020).

Las garrapatas de la familia ixodidae o familia de garrapatas duras presentan un escudo quitinizado que cubre parcialmente su dorso en hembras y totalmente en machos (figura 1), de ahí que las hembras tengan la facilidad de aumentar varias veces su tamaño al alimentarse para completar su ciclo de vida parasítico (Avellaneda et al., 2020). El aparato bucal de la garrapata está formado por palpos (sensoriales), quelíceros (para cortar y perforar la piel del hospedero) y el hipostoma que cuenta con una hilera de dientes que facilitan la fijación a la piel (Archila, 2014).

Figura 1.

Morfología R. microplus A. Hembra B. Macho (Zarate, 2016) con algunas modificaciones realizadas por la autora de este trabajo.

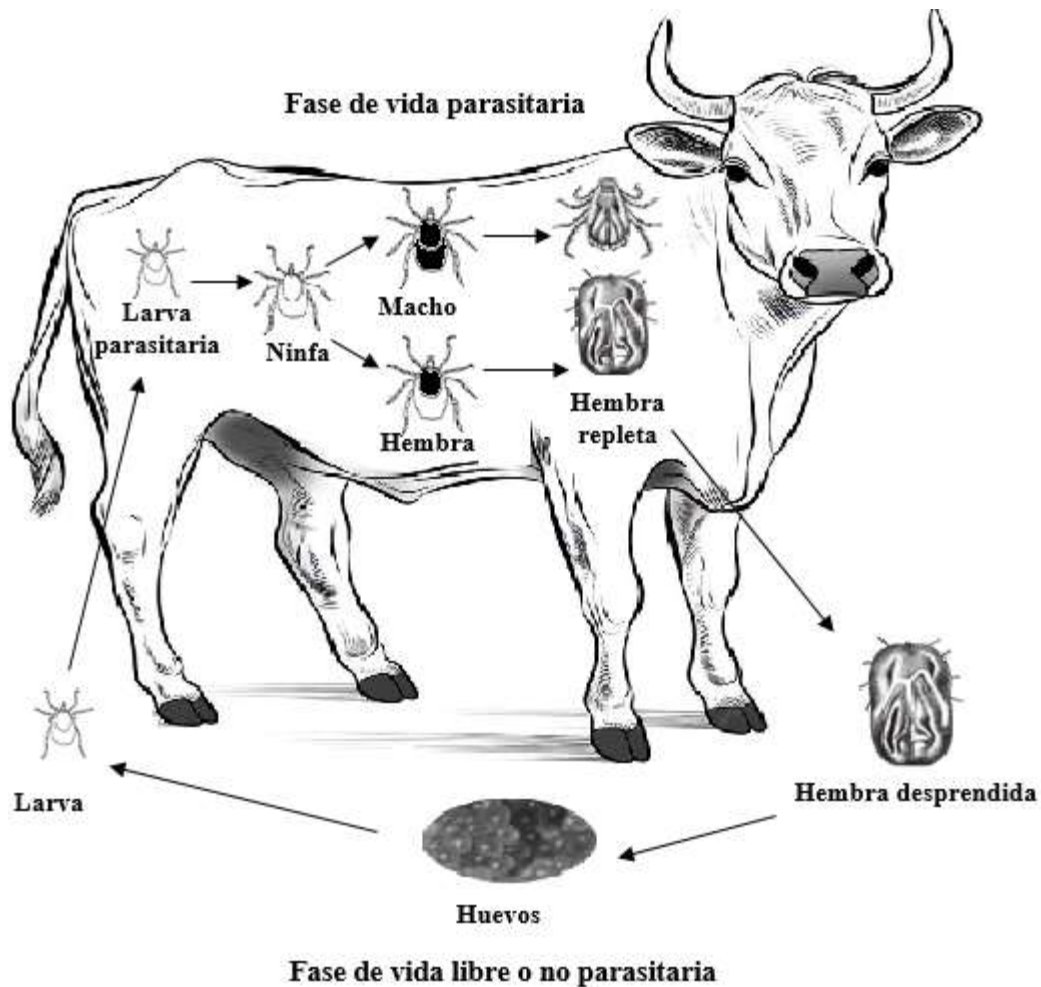


1.2 Distribución geográfica

R. microplus es la especie de garrapata de mayor incidencia en el corredor biológico del caribe, principalmente en Colombia y Venezuela. En Colombia, se puede encontrar distribuida en altitudes desde 0 hasta los 2.200 metros sobre el nivel del mar, un rango de temperatura desde los 28 hasta los 32°C y humedad entre 80-90%. En la figura 2 se puede observar la distribución geográfica, por departamentos, en Colombia para la garrapata *R. microplus*. Las zonas marcadas con un punto negro indican presencia de esta especie de garrapata (Acevedo et al., 2020)

Figura 2.

Distribución geográfica de Rhipicephalus microplus por departamentos en Colombia con algunas modificaciones realizadas por la autora de este trabajo.



A continuación, se detallan los periodos de las dos (2) fases de vida mencionadas anteriormente para *R. microplus*.

1.3.1 Fase de vida parasitaria

Comprende el momento desde de la fijación de la larva al bovino hasta el desprendimiento de la adulta ingurgitada (Alonso & Fernandez, 2022).

1.3.1.1 Larva

La larva se alimenta de sangre hasta pasar a ninfa, este periodo dura de 5 a 14 días luego de que la larva se ha fijado al hospedero (Alonso & Fernandez, 2022)

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

1.3.1.2 Ninfa

La ninfa se alimenta y pasa a estado adulto, esto tarda de 13 a 21 días después de la fijación de la larva al hospedero (Alonso & Fernandez, 2022)

1.3.1.3 Adulto

En este estado se realiza la diferenciación sexual, las hembras emiten feromonas y atraen al macho, sucede el apareamiento, luego la hembra se alimenta hasta estar completamente llena, aumentado hasta 100 veces su tamaño original y se desprende del bovino, esta acción tiene una duración promedio de 5 a 12 días. El macho se alimenta intermitentemente y puede permanecer varios meses sobre el bovino copulando a más de una hembra (Polanco & Ríos, 2016).

1.3.2 Fase de vida no parasitaria o de vida libre

1.3.2.1 Preoviposición

Cuando la garrapata ingurgitada se desprende del bovino, busca un lugar húmedo, cálido y resguardado de los rayos solares dónde pueda depositar sus huevos, esta etapa en condiciones favorables tiene un intervalo de 2 a 4 días y en climas fríos puede durar aproximadamente 97 días (Alonso & Fernandez, 2022)

1.3.2.2 Oviposición

Esta etapa comprende desde el momento en que la garrapata pone el primer huevo hasta que pone el último, en condiciones favorables tiene un tiempo de 21 a 60 días y en climas fríos puede durar hasta 120 días. Una sola hembra ingurgitada de *R. microplus* puede poner de 1500 a 5000 huevos (Alonso & Fernandez, 2022)

1.3.2.3 Post-oviposición

Periodo en el cual sucede la oviposición del último huevo hasta la muerte de la garrapata, la cual ocurre de 2 a 15 días después de poner el último huevo (Alonso & Fernandez, 2022)

1.3.2.4 Incubación

Comprende el fin de la oviposición y el inicio de la eclosión larvaria, en condiciones de temperatura y humedad favorables puede tomar de 20 a 50 días, en invierno puede tomar el doble de tiempo (Alonso & Fernandez, 2022)

1.3.2.5 Eclosión

En esta etapa las larvas emergen del huevo, en condiciones favorables toma de 14 a 60 días y pueden eclosionar más de 80% de los huevos (Alonso & Fernandez, 2022)

1.3.3 Longevidad de las garrapatas de la especie *R. microplus*

Generalmente, las garrapatas duras viven menos de un año, desde su estado larval hasta encontrar hospedero, las larvas viven menos que las ninfas y las ninfas menos que las adultas. La longevidad depende de factores climáticos debido a que las garrapatas necesitan humedad para colocar sus huevos, aunque un exceso de humedad puede causar infestación de hongos y muerte (Polanco & Ríos, 2016). El lugar en el cual se encuentren también es primordial, las condiciones de temperatura, humedad y la vegetación determinan la facilidad para detectar un hospedero y desarrollar su ciclo de vida completo. Según estudios, la supervivencia de las larvas de *R. microplus* en los Llanos Orientales de Colombia fue de 52 a 174 días, lo que le proporciona a la larva un intervalo de tiempo de entre dos y seis meses para tener contacto con su hospedador e infestarlo, siendo capaz de sobrevivir sin ingerir sangre (Polanco & Ríos, 2016).

1.4 ¿Cómo busca su huésped la garrapata?

Las garrapatas de la familia ixodidae esperan pasivamente entre la vegetación, ascendiendo y descendiendo entre hierbas y arbustos. Esto implica gran pérdida de humedad para ellas, por lo cual durante su estadio larval se hidratan en la parte más baja de la vegetación. Cuando suben por la vegetación, normalmente a una altura de entre unos centímetros a un metro, extienden sus patas

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

delanteras y detectan a sus hospederos usando el órgano de Haller. Este órgano se ubica en el extremo dorsal del primer par de patas y es una estructura que tiene pequeñas cavidades donde se encuentran unas setas con perforaciones microscópicas que facilitan el paso de ciertas moléculas que estimulan las conexiones nerviosas conectadas a los poros (Estrada, 2015). De esta manera, logra saltar e infestar a su hospedero y alimentarse.

1.5 Problemas económicos en la ganadería causados por *Rhipicephalus microplus*

En Colombia la ganadería es el principal sistema de producción pecuario, en el 2023 este sector representó el 25,22% del total del PIB Agropecuario y el 1,46% del PIB Nacional (DANE, 2023), teniendo en cuenta estas cifras mencionadas, la afección a la ganadería implica pérdidas económicas importantes a nivel nacional. Ahora, examinando el problema a pequeña escala, por garrapata *R. microplus* que completa su ciclo de vida parasitario, un solo bovino puede perder desde 0,3 g hasta 1 g diariamente, esto afecta la ganancia de peso adecuado para su desarrollo (Sánchez & Masiel, 2021). Además, una sola garrapata adulta puede reducir hasta 8.7 mL de la producción de leche diaria (Sutherst et al., 1983).

Esta especie también es capaz de debilitar el sistema inmune de los bovinos, haciéndolos propensos a infección por microorganismos que causan enfermedades graves. Las heridas causadas en la piel por la infestación de garrapatas, pueden ser tan severas que atraen moscas y se produce miasis (Sánchez & Masiel, 2021). Además, las pérdidas económicas crecen por el costo de tratamientos de las enfermedades y problemas reproductivos ocasionados por *R. microplus*. Esta especie es considerada la garrapata con mayor impacto económico en Suramérica y Centroamérica (Polanco & Ríos, 2016)

1.5.1 Enfermedades transmitidas por *Rhipicephalus microplus*

La babesiosis y anaplasmosis son las dos enfermedades más comunes en los bovinos a causa de las garrapatas, la babesiosis es causada por los protozoos *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* y la anaplasmosis es una enfermedad causada por la bacteria *Anaplasma marginale* (Ferreira et al., 2022). Los organismos causantes de estas enfermedades destruyen los eritrocitos debido a su afección intracelular, ocasionando hemoglobinuria (sangre en orina), fiebre, ictericia (aumento en la concentración de bilirrubina en sangre), anemia, pérdida de peso, deshidratación, temblor muscular, debilidad, disminución en la tasa reproductiva, abortos, reducción de leche, carne y aumento de los costos de producción del ganado (Martínez et al., 2019).

Se estima que más de 1,2 billones de bovinos en el mundo son propensos a contraer estos patógenos transmitidos por garrapatas. América Latina es un área de riesgo permanente, debido a las condiciones climáticas tropicales, las cuales favorecen el desarrollo de garrapatas y la transmisión de estas enfermedades, con más de 264 millones de bovinos amenazados en países de Sudamérica, siendo en Colombia todas las zonas de trópico bajo y medio consideradas de alto riesgo (Vargas et al., 2019).

1.6 Métodos de control usados para combatir la garrapata *R. microplus*

Actualmente, existen varios métodos de control de garrapatas en bovinos como: el uso de acaricidas sintéticos (método de control más usado por los ganaderos) (Lopez & Betancourt, 2024), hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, que atacan todas las etapas del desarrollo de la garrapata e inhiben la oviposición (Adames et al., 2011; Fernandes et al. 2012; Sun et al., 2011), bacterias, nemátodos entomopatógenos y hasta hormigas para controlar la población de garrapatas (Agudelo et al., 2021). También se emplea la rotación de praderas (Lopez & Betancourt, 2024), las pasturas *Melinis minutiflora* y *Brachiaria brizantha* que

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

cuentan con propiedades repelentes y vellosidades para dificultar que la larva suba al pasto, así mismo también se usan vacunas como Gavac™, Bovimune Ixovac® y Go-Tick® para controlar las enfermedades transmitidas por *R. microplus* (Hernández, 2022). Además, en los últimos años se han realizado estudios con plantas que han demostrado tener actividad acaricida (Rodríguez et al., 2022; Valcarcel et al., 2020),

También se ha optado por realizar un control integrado de garrapatas, el cual consta de la combinación de varios de los métodos mencionados anteriormente con el fin de disminuir población y la resistencia de las garrapatas debido al uso indiscriminado de acaricidas (Cuore, 2022; Rodriguez et al., 2016; Rodriguez et al., 2014b). Los estudios con plantas se han enfocado mayoritariamente en intervenir en el ciclo de vida parasítico de *R. microplus*, usado extractos de distintas partes de las plantas para realizar pruebas acaricidas en diferentes estadios del ciclo de vida de este ectoparásito. Tal como lo reportan algunos autores que serán mencionados a continuación:

En un estudio Ocampo y col. (2023), evaluaron el extracto acuoso de *Solanum mammosum* L. a tres concentraciones diferentes y concluyeron que la concentración de 27% tiene mayor porcentaje de inhibición en oviposición y mayor porcentaje de mortalidad en adultas *R. microplus*, reportando mortalidades de 66, 74 y 83% a 24, 48 y 72 horas, respectivamente.

En el trabajo realizado por Rodríguez y col. (2022) también se reportó que el extracto etanólico puro de *A. acuminata* mostró un porcentaje de mortalidad de 53,33% a las 96 horas. Mientras que el extracto etanólico puro de *P. bogotensis* tuvo una mortalidad de 80% a las 96 horas y las disoluciones del extracto etanólico 1:2 y 1:4 usando agua como solvente de *P. bogotensis* presentaron mortalidades de 66,6% y 40% respectivamente

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

En otro estudio con los extractos hídricos de plantas *Allium sativum* y *Larrea tridentata* se reportan porcentajes de mortalidad entre 45% y 58% respectivamente, en concentraciones de 3000 ppm en cuatro poblaciones diferentes de garrapatas adultas *R. microplus*, por el ensayo de inmersión de adultas en condiciones de laboratorio (Vasquez, 2022). Para el trabajo reportado por Rosado y col. (2010) se indica que los extractos metanólicos puros de hojas y tallos de la especie de planta *Petiveria alliacea* mostraron una mortalidad del 100% en inmersión de larvas de *R. microplus*, los extractos metanólicos puros de hojas y tallo en la prueba de inmersión de adultas mostraron un 26% y un 86% de mortalidad, respectivamente. Se evaluó la disminución de huevos puestos por las adultas, obteniendo inhibición de 40% para extractos de hojas y del 91% para extractos de tallos y una inhibición de la eclosión de huevos del 26% y del 17%, respectivamente.

Finalmente, Rodríguez y col. (2014) también indican que los aceites esenciales de las hojas de orégano (*Lippia graveolens*), hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*) y bulbos de ajo (*Allium sativum*) se evaluaron en larvas de *R. microplus* mediante la prueba de paquete larval. Obteniendo un porcentaje de mortalidad aproximado de 85% para el aceite de romero a concentraciones entre 10 y 20%, mientras que para los aceites de orégano y ajo a concentraciones de 1,25 a 20% se obtuvo una mortalidad entre 90 y 100%.

A continuación, se describirán los mecanismos de acción de los principales componentes químicos en los acaricidas convencionales.

1.7 Mecanismos de acción de los acaricidas químicos convencionales contra garrapatas



El mecanismo de acción se define como el proceso que explica la intervención de una molécula o compuesto sobre un sitio o una ruta metabólica, de manera que pueda bloquear o incrementar su funcionamiento y causar algún efecto sobre un individuo (Tashjian & Armstrong, 2011)



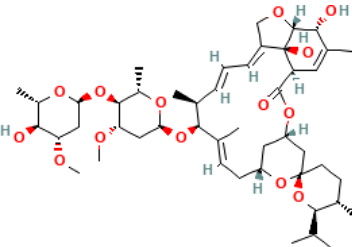
METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

En la tabla 1, se explican los mecanismos de acción de algunos de los grupos de compuestos sintéticos más usados en el tratamiento de la infestación por garrapatas en bovinos.

Tabla 1.

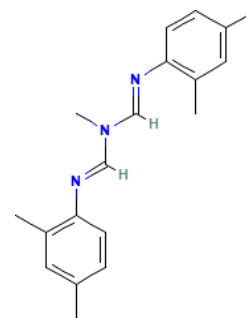
Mecanismo de acción de los grupos de acaricidas comerciales más comunes para el control de R. microplus, estructuras químicas de las acaricidas tomadas de la pubchem.

<i>Acaricida</i>	<i>Mecanismo de acción</i>	<i>Estructura química</i>
Organofosforados	Actúan principalmente inactivando la acetilcolinesterasa y bloqueando la degradación de acetilcolina, por lo cual, las concentraciones de acetilcolina aumentan y se produce hiperexcitación en el sistema nervioso central (SNC) (Moreno, 2023). Algunos ejemplos de acaricidas para este grupo son: etión, Coumafos, Crotoxifos, Diazinon, Fentión, Malatión, Triclorfon.	etión 
Carbamatos	Actúan principalmente inactivando la acetilcolinesterasa y bloqueando la degradación de acetilcolina, por lo cual, las concentraciones de acetilcolina aumentan y se produce hiperexcitación en el sistema nervioso central (SNC) (Alvarez, 2016; Rivera, 2012). Algunos ejemplos de acaricidas para este grupo son: Carbaril, Propoxur, Butocarb, Carbanolato y Fenoxicarb	Propoxur 

Piretroides	<p>Tienen un efecto neurotóxico sobre las garrapatas, uniéndose a los canales de sodio y prolongan la apertura de estas proteínas transmembrana, retrasa el mecanismo de inactivación del impulso nervioso, de esta manera se establece la configuración abierta del canal, produciendo hiperexcitación, parálisis y muerte (González, 2012). Algunos acaricidas de este grupo son: deltametrina, cipermetrina y flumetrina</p>	Deltametrina	
	Fenilpirazoles	<p>Actúan bloqueando los canales del cloro, los cuales están controlados por receptores del ácido gama-amino butírico (GABA), los acaricidas pertenecientes a este grupo, se unen a estos receptores inhibiendo el GABA y permitiendo que los iones cloro sigan entrando, paralizand y matando a la garrapata (Cabrera, 2022). Un compuesto muy común en la ganadería perteneciente a este grupo es el fipronil</p>	Fipronil
	Lactonas macrocíclicas	<p>Estos compuestos se unen a un receptor de glutamato ligado a canales del cloruro, impidiendo el cierre de canales cloruro, aumentando la permeabilidad y desencadenando la hiperpolarización de la membrana, frenando el estímulo nervioso y dando lugar a una parálisis flácida (Aguilar et al., 2016). A este grupo de acaricidas pertenecen: la ivermectina, abamectina, doramectina y eprinomectina</p>	Ivermectina
			

Formamidinas Son compuestos que imitan la acción de la octopamina, tiene su efecto tóxico en el SNC, donde impide la acción reguladora de la octopamina, generando sobreestimulación de las sinapsis octopaminérgicas, acompañados de temblores, convulsiones, anorexia, desprendimientos e interrupción de la reproducción (Rivera, 2012). Un compuesto muy común en la ganadería perteneciente a este grupo es el **amitraz**.

Amitraz



Como se mencionó anteriormente, es importante conocer cómo está ingresando una molécula al individuo, es decir, el modo de acción; y entender de qué manera lo podría estar afectando en una ruta específica. Pero en los metabolitos de plantas aún no se conocen los mecanismos de acción por los cuales se genera actividad acaricida sobre las garrapatas, se espera que al conocer su interacción con la diana farmacológica y comprobar su actividad, se pueda avanzar en estudios posteriores para conocer su mecanismo de acción.

En este estudio se usaron los primeros 4 complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) como diana farmacológica, debido a la importancia en el transporte de electrones para la respiración celular y la producción de energía necesaria para el funcionamiento de la célula. Se usó también la acetilcolinesterasa (AChE) como diana farmacológica, porque como se puede observar en la tabla 1 es la enzima inhibida por varios grupos de los compuestos acaricidas usados actualmente (organofosforados y carbamatos). Además de ser un blanco farmacológico por el cual, una molécula afecta rápidamente el sistema nervioso central de un organismo, ocasionando sobreestimulación muscular, parálisis muscular, ataxia y muerte (Trang & Khandhar, 2019).

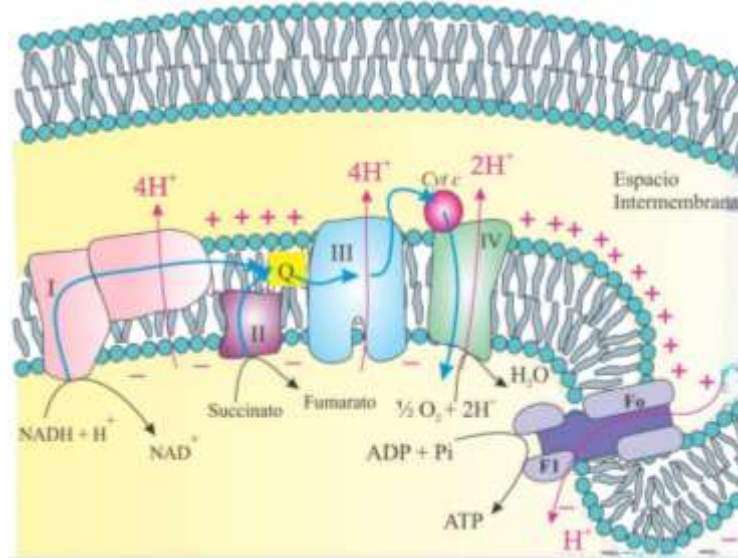
1.8 Mitocondria, complejos de la cadena respiratoria y acetilcolinesterasa

La mitocondria es la encargada de producir la mayoría del adenosin trifosfato (ATP) necesario para los procesos celulares, esta producción de energía se da gracias a la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), la cual se localiza en la membrana mitocondrial interna. Está formada por cinco complejos de proteínas grandes y por dos pequeños componentes independientes, la ubiquinona y el citocromo c. Del complejo I al IV, se encargan del flujo de electrones y la generación de un potencial de membrana que es usado por la ATP sintasa o complejo V para la síntesis del ATP (Sousa et al., 2018).

El transporte de electrones empieza en el complejo I, donde el NADH se oxida y dona electrones, gracias a esta energía proveniente de la donación de electrones se bombean cuatro (4) protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana y luego los electrones son transportados del complejo I a la coenzima Q (aceptor de electrones más común para el complejo I y II). En el caso del complejo II, el FADH₂ es oxidado a FAD⁺ y transfiere electrones a la ubiquinona (coenzima Q) que se reduce a ubiquinol (QH₂), el cual conduce los electrones al complejo III y este finalmente transporta los electrones al citocromo c (Cyt c). Posteriormente, el complejo IV oxida al (Cyt c) y entrega los electrones al oxígeno, permitiendo la formación de moléculas de agua y un potencial electroquímico que será usado por la ATP sintasa para transformar el ADP en ATP (figura 4) (Sousa et al., 2018).

Figura 4.

Cadena respiratoria mitocondrial. En donde se observa: el complejo I (rosado), complejo II (morado), coenzima Q (amarillo), complejo III (azul), citocromo (fucsia), complejo IV (verde) y ATP sintasa (morado oscuro). (Imagen adaptada de (Nelson & Cox 2009



A continuación, se explica detalladamente la función de los primeros cuatro (4) complejos respiratorios como dianas farmacológicas usadas en este estudio.

Complejo I: El complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) está compuesto por 42 subunidades y ocho (8) centros hierro-azufre, tiene un papel central en el metabolismo celular, es conocida como una bomba de protones impulsada por la energía de la transferencia electrónica. Debido a que cataliza dos (2) procesos acoplados simultáneamente: el primero, la transferencia exergónica de un H^+ desde el NADH hacia la ubiquinona, como se presenta en la siguiente ecuación (Lehninger, 2006; Rich & Marechal, 2010)

Ecuación 1.

Reacción redox llevada a cabo en el complejo I durante la transferencia de electrones



y el segundo, la transferencia endergónica de cuatro (4) protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana (Ecuación 1).

Es importante mencionar que, un inhibidor reportado para el complejo I es la rotenona, la cual disminuye la oxidación del malato y el lactato por NAD^+ , además de inhibir notablemente la

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

captación de oxígeno. La inhibición del complejo I por la rotenona causa la reducción de todos los componentes previos al punto de inhibición, inhibiendo la oxidación de NADH por el complejo I y aumentando la producción de H₂O₂ en las mitocondrias (Baynes & Dominiczak, 2006; King et al. 2009)

Complejo II: También llamado succinato deshidrogenasa está compuesto por cuatro (4) subunidades proteicas, un sitio de unión del succinato, tres (3) centros Fe-S y un (1) grupo hemo b que no participa directamente en la ruta de transferencia de electrones, pero ayuda a reducir la pérdida de electrones fuera del sistema. Es más sencillo en comparación al complejo I, pero funciona como un segundo punto de entrada de un cofactor en la cadena de transporte de electrones. Este proceso se da cuando los electrones que proporciona el succinato (por su oxidación a fumarato) van al FAD, luego a los centros Fe-S y finalmente al aceptor de ubiquinona (Lehninger, 2006; Maimó et al. 2024) Cuando se genera una interrupción en este complejo el NADH y el FADH₂ no pueden ceder sus electrones, por lo que se da un aumento en la concentración de estas dos moléculas y disminuye la concentración de NAD⁺ y FAD, interrumpiendo también el funcionamiento de las deshidrogenasas que las usan como cofactores (Guerra, 2014). Un inhibidor reportado para el complejo II es el dimetilmalonato (DMM), que actúa interrumpiendo el flujo de electrones hacia la ubiquinona, además fue usado recientemente en estudios enzimáticos para inhibir el complejo II en la cadena respiratoria de *R. microplus*. Donde examinaron los efectos del poliP en la cadena de transporte de electrones y F1Fo ATP sintasa de garrapatas durante su desarrollo embrionario (Domingues et al., 2023).

Complejo III: También llamado citocromo bc1 o ubiquinona: citocromo c reductasa. Está conformado por dos monómeros de 11 subunidades, es el encargado de catalizar la transferencia de electrones desde el ubiquinol (QH₂) hacia el citocromo c por medio del transporte de cuatro (4)

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. (Covian & Trumpower, 2006). Está conformado por cuatro grupos prostéticos redox activos y un centro Fe-S, un citocromo c1 con un grupo hemo c, y un citocromo b con dos grupos hemo b (Yu et al. 2013).

En el complejo III se da el ciclo Q, el cual comienza con la oxidación del ubiquinol a ubiquinona en el sitio Q_o, donde dos electrones son cedidos a dos cadenas de componentes redox: una cadena de alto potencial (Fe₂-S₂, citocromo c1) y una de bajo potencial (citocromos b). Paralelamente, dos H⁺ se liberan hacia el lado positivo de la membrana, es decir, hacia el espacio intermembrana. El primer electrón se transfiere al centro Fe₂-S₂ de la proteína de Rieske para transformarse en semi-ubiquinona (un estado intermediario), que cede un electrón y pasa al citocromo c1, después al citocromo c, y finalmente al complejo IV (Iglesias, 2018; Macedo, 2012). Cuando se inhibe el complejo III, se evita el uso de la energía libre que da el paso de los electrones para translocar protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana.

Un inhibidor reportado para el complejo III es la Antimicina A, la cual impide la transmisión de electrones procedentes del complejo I o las flavoproteínas que contengan FADH₂ hacia el citocromo c, ocasionando que los componentes que preceden al complejo III se reduzcan y los posteriores al complejo III se oxiden (Baynes & Dominiczak, 2006)

Complejo IV: Llamado también citocromo oxidasa, es un complejo que consta de 13 subunidades, el último paso de la cadena respiratoria, es el encargado de transportar electrones del citocromo C al oxígeno molecular O₂ y reducirlo a H₂O y bombear H⁺ al espacio intermembrana. Proceso que comienza con la transferencia de electrones uno a uno desde el citocromo C al centro de cobre del primer grupo hemo que contiene hierro. Después pasan al segundo grupo hemo y al tercer átomo de cobre (Nave, 2005).

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Luego de recibir los dos primeros electrones, se puede unir una molécula de oxígeno al centro del complejo. Cuando llegan otros dos citocromos y, por tanto, otros dos electrones, se extraen dos hidrógenos de la matriz. Seguidamente, la entrada de dos protones desde la matriz mitocondrial permite la formación de dos moléculas de agua (Nave, 2005).

Este proceso redox actúa como una bomba de H^+ , extrayendo 8 protones de la matriz y entregando 4 al espacio intermembrana, donde son fundamentales en el proceso de fosforilación oxidativa para producir ATP (molécula de alta energía (Nave, 2005).

Para este complejo existen varios inhibidores reportados como la azida (N_3^-), el monóxido de carbono(CO) y el cianuro (CN^-). La inhibición del complejo IV es crucial, pues los componentes que preceden este complejo se reducen, pero al inhibirlo, el oxígeno no puede reducirse y ninguno de los complejos puede bombear protones para que se dé la producción de ATP. El CN^- y el CO, se fijan también a la hemoglobina y, por tanto, no pueden transportar oxígeno (Baynes & Dominiczak, 2006).

Como se mencionó anteriormente, para este estudio se seleccionaron subunidades para cada complejo con las que se realizaron los análisis *in silico*, a continuación, se explica la importancia de cada subunidad en el transporte de electrones:

Para el complejo I: se eligió la NAD4, Cadena 4 del complejo I porque es crucial para que el NADH se oxide y se transfieran electrones a la ubiquinona (Lehninger, 2006).

Para el complejo II: se eligió subunidad de hierro-azufre, mitocondrial, la cual transporta los electrones que vienen del FAD hacia la ubiquinona (Lehninger, 2006).

Para el complejo III: se eligió Cytochrome b-c1 Rieske, mitocondrial, la cual transfiere un electrón al centro Fe-S y ese electrón se libera al Fe del grupo hemo presente en el citocromo c (Iglesias, 2018).

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

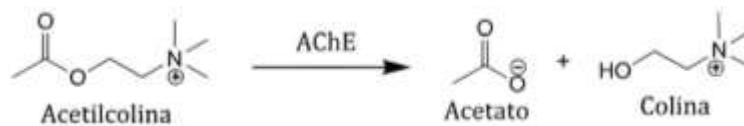
Para el complejo IV: se eligió la COX1 Subunidad 1, la cual forma el núcleo de complejo IV, junto con COX2 y COX3, COX1 es la encargada de coordinar un centro metálico binuclear formado por un átomo de Cu (Cu_B) y un átomo de hemo a_3 .

Por otro lado, la segunda diana farmacológica que se eligió para este estudio fue la acetilcolinesterasa, la cual se explicará con detalle a continuación:

Acetilcolinesterasa: La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima que pertenece al grupo de las hidrolasas y está presente en la mayoría de los seres vivos, tanto vertebrados como invertebrados. Se encuentra en el sistema nervioso y en los músculos (en el sitio de unión de una neurona motora y una fibra muscular), esta enzima se encarga de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (ACh) en acetato y colina (Trang & Khandhar, 2019) (figura 5).

Figura 5.

Mecanismo de acción en la hidrólisis de la acetilcolina.



La ACh es un neurotransmisor que participa en la sinapsis colinérgica en el sistema nervioso, el proceso de sinapsis permite la transmisión de la señal nerviosa hacia el sistema nervioso central y periférico. La acetilcolina es sintetizada a partir de colina y acetyl CoA, a nivel neuronal, juega un papel fundamental en la neurotransmisión, porque una vez liberada al espacio sináptico, puede ejercer sus efectos sobre los receptores postsinápticos, donde la acetilcolinesterasa rompe la acetilcolina para formar acetato y colina, deteniendo la señal del neurotransmisor en la

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

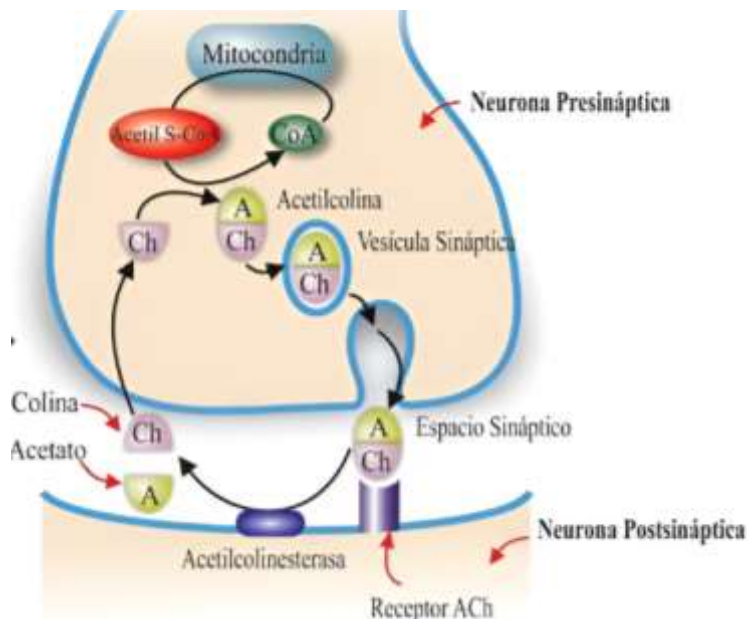
célula sináptica. La colina se absorbe de nuevo a nivel neuronal, permitiendo la formación de moléculas de acetilcolina que pueden ser usadas en la siguiente señal (Trang & Khandhar, 2019).

Los compuestos químicos que inhiben la AchE cuando ingresan al organismo pierden un grupo sulfuro, que es reemplazado por oxígeno y se forma un oxón (compuesto químico dónde se reemplazó un enlace fósforo-azufre por un enlace fósforo-oxígeno), el cual inhibe potentemente la AchE (Arroyo & Fernández, 2013).

Las interacciones que afectan el proceso llevado a cabo por la ACh pueden ocasionar pérdida parcial o completa de la actividad enzimática (Arroyo & Fernández, 2013; C. Castillo & Andrés, 2014). En resumen, como la acetilcolinesterasa participa en la hidrólisis de colina que es un mensajero de la sinapsis entre nervios y músculos, al ser inhibida se da una acumulación de acetilcolina, lo que conduce a una sobre estimulación de impulsos nervio-músculo, llevando a una parálisis muscular y finalmente la muerte (figura 6) (Rodríguez et al. 2018)

Figura 6.

Mecanismo de acción de la acetilcolinesterasa en la neurotransmisión. (Borrero, 2018)



En cuanto a inhibidores reportados de la AChE existen varias moléculas reportadas sobre esta diana, que además, son usadas como acaricidas en bovinos para tratar la infestación por garrapatas, como se puede ver en la tabla 1.

En síntesis, las dianas farmacológicas seleccionadas para este estudio son cruciales en un organismo vivo, debido a que su inhibición afecta procesos de producción de energía en el caso de los complejos respiratorios y señales nervio-músculo en el caso de la acetilcolinesterasa. La acetilcolinesterasa es una diana farmacológica estudiada ampliamente, existe un grupo importante de acaricidas comerciales como los organofosforados que afectan esta enzima.

Algunos estudios en garrapatas con énfasis particularmente en la AChE y algunos pocos en la mitocondria, permitirán tener un punto de partida y comparación con este estudio. A continuación, se relacionan dos investigaciones recientes:

Domingues y col. (2023), examinaron los efectos del polifosfato inorgánico (poliP) en enzimas de la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa en huevos de *R. microplus*, encontrando que los poliP que contienen cadenas medias y largas (poliP₁₅ y poliP₆₅) mejoraron la actividad de complejo I, III y F1Fo ATP sintasa, pero las cadenas cortas de poliP (poliP₃) no

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

tuvieron efecto. También se estudió el efecto del poliP en la permeabilidad mitocondrial, encontrando que causa hinchazón mitocondrial al aumentar los efectos del calcio en el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, lo que permite aumentar la comprensión de la función del poliP en el metabolismo mitocondrial de garrapatas. Si bien el estudio de Domingues y col. (2023) toma como diana farmacológica la mitocondria, el enfoque es entender el papel del poliP en la cadena respiratoria, no inhibirla, como es el caso del proyecto de investigación presentado aquí.

Por otro lado, en el estudio reportado por García (2020) se caracterizó la actividad enzimática de la AchE con el fin de evaluar la resistencia a organofosforados de dos poblaciones de garrapatas *R. microplus* y también se evaluaron las actividades acaricidas *in vitro* de extractos metanólicos de hojas de las plantas *Artemisia ludoviciana* y *Cordia boissieri* y de la semilla de *Litchi chinensis* a tres concentraciones (50, 100 y 150 mg/mL). Observando que el extracto de *L. chinensis*, mostró una mortalidad de 99.44% en la población uno y 99.73% en la población 2. El extracto de *A. ludoviciana*, mostró mortalidad de 89.34% y 89.21% para las poblaciones uno y dos, respectivamente y el extracto de *C. boissieri* tuvo un porcentaje de mortalidad del 33.04% y 10.33% para las poblaciones uno y dos respectivamente. Sin embargo, en este estudio no se conocen los metabolitos responsables de la actividad acaricida sobre *R. microplus* ni su mecanismo de acción.

1.9 Métodos comunes para bioensayos con garrapatas

El método por paquete larval y el método de inmersión larval son muy frecuentes cuándo se evalúa actividad acaricida en garrapatas, muchos estudios han reportado su uso en estadio larval (Barrios, 2021; Bogado 2022; Contreras et al. 2024; Saines 2022;). Además, la prueba de paquete larval ha recibido reconocimiento internacional debido a su gran utilidad práctica, considerándose

una de las técnicas más reproducibles en bioensayos con artrópodos (Robertos & Perez, 2017). En cuanto a la prueba de inmersión larval, el objetivo es similar al del paquete larval, se obtienen resultados rápidos y reproducibles, estudios comparativos indican que los resultados de esta prueba pueden ser comparados con los resultados de la prueba de paquete larval (Robertos & Perez, 2017). Por tanto, se consideran ensayos convenientes y bien soportados para emplear en este trabajo de investigación.

Estos métodos son útiles para evaluar actividad *in vivo*, luego de realizar un previo análisis *in silico*. Una herramienta muy usada en la actualidad para el análisis *in silico* es el cribado computacional, el cual se explicará con detalle a continuación:

1.10 Cribado de compuestos asistido por técnicas computacionales

El cribado virtual consiste en identificar, diseñar y analizar el potencial farmacológico de una molécula usando métodos computacionales (Prieto & Medina, 2019). Es por ello, que la industria del desarrollo e investigación de fármacos ha invertido grandes cantidades de dinero y tiempo para identificar potenciales productos, se estima que la inversión para el desarrollo de un fármaco oscila los 800 millones de dólares y puede tardar entre 10 y 15 años (Saldívar et al., 2017). Hoy en día, gracias a los avances tecnológicos es posible predecir procesos biológicos, calcular propiedades y comparar estructuras químicas en masa de manera sistemática, ahorrando tiempo y dinero en las posibles pruebas de laboratorio que se realicen posteriormente, acelerando la búsqueda de compuestos bioactivos y teniendo resultados muy eficientes y precisos (Prieto & Medina, 2019). Se puede decir que el diseño de fármacos asistido por computadora es exitoso, pues hay varios ejemplos representativos de fármacos que han sido identificados por este método como: captropil, oseltamivir, dorzolamida, aliskiren, boceprevir (Prieto & Medina, 2019). Además, los estudios computacionales han permitido entender el modo de acción de los principios activos de

los compuestos y la mejora en las propiedades de fármacos sintéticos, así como la reducción de sus efectos secundarios, por medio de compuestos químicos aislados de plantas.

El diseño e identificación de nuevos fármacos o compuestos con bioactividad usando métodos computacionales se puede dividir en dos tipos según la disponibilidad de información experimental: SBDD (Structure Based on Drug Design) y LBDD (Ligand Based on Drug Design). Para emplear SBDD es necesario conocer la estructura tridimensional y funciones biológicas de la proteína diana para estimar los compuestos que tienen capacidad de interactuar con una proteína, con alta selectividad y afinidad (Shanmugam & Jeon, 2017).

Para LBDD se usan las características estructurales y químicas que deben tener las moléculas que se vayan a unir a la proteína, para ello lo que se hace es construir un modelo farmacóforo. Este modelo de farmacóforo emplea la alineación de múltiples ligandos que puedan determinar las características químicas que le confieren bioactividad (Shanmugam & Jeon, 2017).

En el caso puntual de este estudio no se conoce la estructura tridimensional de todas las proteínas a evaluar, pero se conocen las dianas farmacológicas de interés y los metabolitos que se van a usar, por lo cual se empleó el método LBDD para predecir las interacciones proteína-ligando.

1.11 Acoplamiento molecular

El docking o acoplamiento molecular es una estrategia bioinformática usada para predecir y calcular de forma computacional la pose más favorable en la que pueden interactuar un ligando y una proteína, esto se logra por medio de representaciones tridimensionales. Además, se trata de una herramienta bioinformática que no cuenta con una regla general para llegar a un resultado óptimo, debido a que cada programa cuenta con sus propios criterios y métodos de selección (Ballón & Grados, 2019)

1.11.1 Maestro de Schrödinger

Dentro de los programas usados hoy en día para la predicción computacional se encuentra el software Maestro de Schrödinger, el cual cuenta con una interfaz gráfica que permite generar modelos, visualizar sistemas 3D, realizar análisis estructural cuantitativo, encontrar información sobre propiedades moleculares, gestionar y analizar datos de propiedades de la estructura (Letelier, 2021) Además, Maestro ha sido usado por compañías como Bayer en el estudio y descubrimiento de fármacos candidatos a desarrollo clínico (Powell, 2020). Sus principales ventajas son: Visualización molecular, diseño de fármacos basado en la estructura, modelado cuantitativo de la relación estructura-actividad, cribado de alto rendimiento, integración y automatización del flujo de trabajo (Schrodinger software, 2023).

El uso de esta técnica computacional permite estudiar compuestos con potencial farmacológico de una manera más rápida y económica porque permite filtrar los compuestos más favorables para los posteriores análisis experimentales dentro de un gran número de moléculas iniciales.

A continuación, se presenta el orden de herramientas que se usan en maestro para realizar docking molecular: Para minimizar errores y garantizar resultados mucho más precisos en el docking molecular es importante refinar y precisar las estructuras de proteínas y ligandos. Maestro de Schrödinger, cuenta con la herramienta **Protein Preparation Wizard** que permite preparar las proteínas objetivas, con el fin de optimizar enlaces de hidrógeno, agregar átomos de hidrógeno, eliminar choques atómicos y llevar a cabo operaciones que no forman parte del proceso de refinamiento de la estructura cristalina de rayos X (Schrodinger, 2021).

Para la preparación de ligandos, Maestro posee la herramienta **Ligprep** que convierte las estructuras moleculares 2D a 3D, con una alta precisión y energía minimizada, corrigiendo estructuras de Lewis con el fin de minimizar errores en el proceso computacional (Hernandez, 2019). En la preparación, se tiene en cuenta la configuración de la quiralidad y estereoisomería, la

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

generación de todos los posibles estados de protonación en un rango de pH de $7,2 \pm 0,2$, y la generación de tautómeros, así como la búsqueda de los estados de menor energía basados en el cálculo teórico del valor de pKa (Prieto & Ulloa, 2016).

Para obtener una mejor estructura molecular del ligando, con energías libres de solvatación y enlace, se usa el campo de fuerza que consiste en un conjunto de parámetros que permiten calcular las fuerzas interatómicas, para que el sistema evolucione durante una simulación atómica (Conflitti et al., 2023). El campo de fuerza ideal en el diseño de fármacos es **OPLS3e**, porque comparado con el campo **OPLS3**, incrementa la cobertura del espacio químico significativo medicinalmente (Roos et al., 2019).

Cuando el sitio drogable (sitio de interacción) de la proteína que se estudia es desconocido, se puede predecir computacionalmente usando la herramienta **Site Map**, la cual permite distinguir las subregiones del sitio de unión y evaluar fácilmente la complementariedad de un ligando y un receptor. Presentando un conjunto de datos cuantitativos con coordenadas que son energéticamente favorables en el espacio tridimensional x,y,z y magnitud de cada coordenada, permitiendo seleccionar el mejor sitio de interacción de la proteína. El valor del puntaje del sitio o puntaje $D \geq 1$, si los ligandos tienen potencial farmacológico (Halgren, 2009). La herramienta **Grid generation** se usa para definir el área específica de la proteína objetivo en la que se realizará el acoplamiento proteína-ligando (Letelier, 2021).

La herramienta que ofrece el software Maestro para realizar el acoplamiento molecular se llama **Glide** y permite realizar un acoplamiento de ligando-receptor de alto rendimiento para acelerar el diseño de fármacos basado en estructuras. Cuenta con modos de precisión desde **HTVS** (detección virtual de alto rendimiento) que permite analizar millones de compuestos limitando el muestreo conformacional, pasando por **SP** (precisión estándar) que tiene en cuenta interacciones lipófilas,

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

puentes de hidrógeno entre átomos neutros, puentes de hidrógeno entre un átomo neutro y un átomo cargado, interacciones entre metales y átomos aceptores aniónicos, incorpora las contribuciones energéticas Coulombianas y de van der Waals de la interacción ligando –receptor, e introduce un modelo de solvatación al medir la exposición del ligando a posibles moléculas de agua en el sitio de unión y finalmente **XP** (extra precisión) permite evaluar un mayor número de posiciones del ligando dentro del sitio de unión (Ruiz, 2018).

Después de realizar el acoplamiento ligando-receptor, Maestro arroja valores de docking score, lo cual predice la afinidad del ligando por la proteína para cada pose o acoplamiento (cuánto más negativo sea este valor, mejor es la interacción ligando-proteína). Maestro también permite calcular energías de afinidad de las mejores poses seleccionadas luego de usar el modo XP, para esto emplea la herramienta **prime MM-GBSA**, donde una mejor energía de afinidad se relaciona con valores más negativos porque una energía libre de unión más negativa (ΔG), se refiere a una conformación más estable (Schrodinger software, 2023).

Después de filtrar las moléculas con mejores interacciones y puntuaciones, Maestro ofrece la herramienta **Qikpro**, que permite determinar las propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas de una molécula, luego de un análisis exhaustivo, con el fin de predecir de manera rápida su perfil farmacológico, así como el cumplimiento de las reglas de Lipinski: Peso molecular ≤ 500 Número de donadores de hidrógeno (NDH) ≤ 5 ; Número de aceptores de hidrógeno (NAH) ≤ 10 ; coeficiente octanol/agua (LogP_0) ≤ 5 (Natarajan et al., 2015).

En la selección de compuestos promisorios también es importante analizar las propiedades ADME, las cuales se refieren a los procesos farmacocinéticos por los que debe pasar un fármaco desde que inicia su recorrido por la vía de administración hasta que llega al sitio de unión o diana farmacológica, la sigla **ADME** indica absorción, distribución, metabolismo y excreción (Buxton

& Benet, 2012). Para estudiar las propiedades ADME de cada molécula se usó la herramienta virtual gratuita SwissADME. También se tuvieron en cuenta sus concentraciones tóxicas a nivel cutáneo, inhalatorio y oral.

Garantizar el cumplimiento de las propiedades ADME y reglas de lipinski a la hora de elegir una molécula para realizar estudios *in vivo* es de suma importancia debido a que permiten predecir y detectar el comportamiento de las moléculas desde la entrada al organismo hasta la permeación de membranas biológicas (Castillo & Acelotl, 2018), también son útiles al buscar moléculas que sean seguras tanto para el bovino como para la persona que las manipula u otras especies no objetivo.

Por otro lado, es importante mencionar que para el estudio molecular de proteínas que no se conoce su estructura tridimensional, es posible construir modelos de homología, los cuales son predicciones tridimensionales en los que se obtiene un modelo preciso (Chalarca & Gaviria, 2020).

1.12 Modelos de homología y Alphafold

Cuando se estudia una proteína es de suma importancia conocer su funcionamiento y esto es posible cuándo se conoce su estructura 3D, porque se pueden estudiar los aminoácidos que contribuyen a su estabilidad, los que forman su superficie, los que participan en su funcionamiento y los que interaccionan con otra molécula (John & Sali, 2003). No todas las estructuras cristalinas de las proteínas identificadas en un organismo se encuentran reportadas en bases de datos, aquí es cuando el modelado de homología es útil. Cuando no se tiene información de la estructura 3D de la proteína, se realiza un modelo de homología basado en la similitud de secuencias primarias de la proteína objetivo con una estructura homóloga. La precisión de estos modelos predichos depende de la plantilla seleccionada, normalmente los modelos de homología con porcentaje de identidad superior a 70% se consideran confiables en aplicaciones farmacológicas (Robinson et al., 2014).

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Para realizar este proceso de modelado comparativo primero se hace una búsqueda en la base de datos BLAST buscando una plantilla adecuada y se eligen las secuencias que son más semejantes con la secuencia primaria de la proteína de interés, buscando un porcentaje de similitud mayor a 30% para reducir errores computacionales. Luego se construye la estructura tridimensional con base en los segmentos y posiciones de los átomos que coinciden en la plantilla y la proteína modelada (David et al., 2022; Fiser & Sali, 2003).

Hoy en día existen herramientas que permiten realizar modelados de manera rápida y precisa, cómo lo es la inteligencia artificial (IA), debido a que ha sido usada desde la década de los 50 en diversas áreas de la química y sobre todo en la química farmacéutica (Gasteiger, 2020). Gracias a los avances tecnológicos y el desarrollo paralelo de teorías y modelos se ha acelerado su aplicación en los últimos años. El objetivo de continuar adoptando la IA en el proceso de desarrollo de fármacos es aumentar las tasas de éxito de las moléculas que puedan llegar a ser probadas en fase clínica (Saldivar et al., 2023)

En la actualidad, se cuenta con la herramienta Alphafold, que usa redes neuronales de aprendizaje profundo y procedimientos de entrenamientos basados en las estructuras tridimensionales de las proteínas establecidas experimentalmente, permitiendo la construcción de estructuras 3D de cualquier proteína no caracterizada usando solo su secuencia primaria (Matsingos et al., 2021). Comparado con otros métodos de modelado, Alphafold es considerado un programa de alta precisión, mostrando un valor de RMSD (medida de la distancia promedio entre un grupo de átomos) alrededor de 0.96, en comparación con otros enfoques que alcanzan 2.80 (Senior et al., 2020). A partir de la secuencia primaria de una proteína, Alphafold realiza una búsqueda profunda de secuencias relacionadas en bases de datos y modela las posiciones 3D de

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

los aminoácidos, calculando las distancias entre aminoácidos adyacentes y los ángulos correspondientes de los enlaces peptídicos para predecir su estructura 3D (Senior et al., 2020).

Cuando se tiene el modelo de homología construido, se emplea el acoplamiento o docking molecular para evaluar interacciones importantes, obteniendo las conformaciones más estables del complejo proteína-ligando.

Actualmente, varios estudios han empleado Alphafold y han encontrado resultados interesantes, como el de Capuñay y col. (2024), quienes reportan un estudio con RmlA de *K. pneumoniae* resistente a antibióticos, donde se construyó un modelo con Alphafold y se evaluó su interacción con 14100 ligandos, se eligieron los ligandos con mejores puntuaciones luego del docking molecular para encontrar una alternativa terapéutica a los antibióticos. Luego del análisis computacional se encontraron valores de energía libre de interacción para fármacos con el sitio enzimático de RmlA de *Klebsiella pneumoniae spp.* Dentro de los fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) se encuentran: Dolutegravir (-97.170 kcal/mol), Altol (-95.650 kcal/mol) y Omeprazole (-95.550 kcal/mol). Otro estudio realizado por Aguer (2023) indica el modelado de *Trichoderma* con Alphafold usando como plantilla *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de evaluar interacciones aminoacídicas y entender las adaptaciones funcionales que ha desarrollado esta especie de hongo, que es muy usado en el control biológico de cultivos de arroz, cebada, soya, trigo, maíz, etc. Se encontró que la enzima β -1,3-glucanosiltransferasa interviene en la remodelación de la pared celular y patogenicidad del hongo. Estos estudios respaldan la viabilidad en el uso de los modelos obtenidos por la herramienta Alphafold y la posibilidad de obtener resultados confiables y precisos.

Con base en lo expuesto anteriormente, a continuación, se describen los objetivos que se plantearon en este trabajo de investigación:

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Seleccionar metabolitos secundarios de plantas con posible actividad acaricida en *Rhipicephalus microplus* tomando como diana farmacológica proteínas mitocondriales y la acetilcolinesterasa.

2.2 Objetivos Específicos

Diseñar una base de datos con metabolitos secundarios provenientes de plantas.

Identificar metabolitos secundarios con posible actividad acaricida en *Rhipicephalus microplus* mediante un screening virtual o docking molecular teniendo en cuenta disposición comercial y propiedades ADME.

Validar la actividad acaricida *in vivo* de los compuestos seleccionados mediante screening virtual, en larvas de garrapatas *Rhipicephalus microplus*.

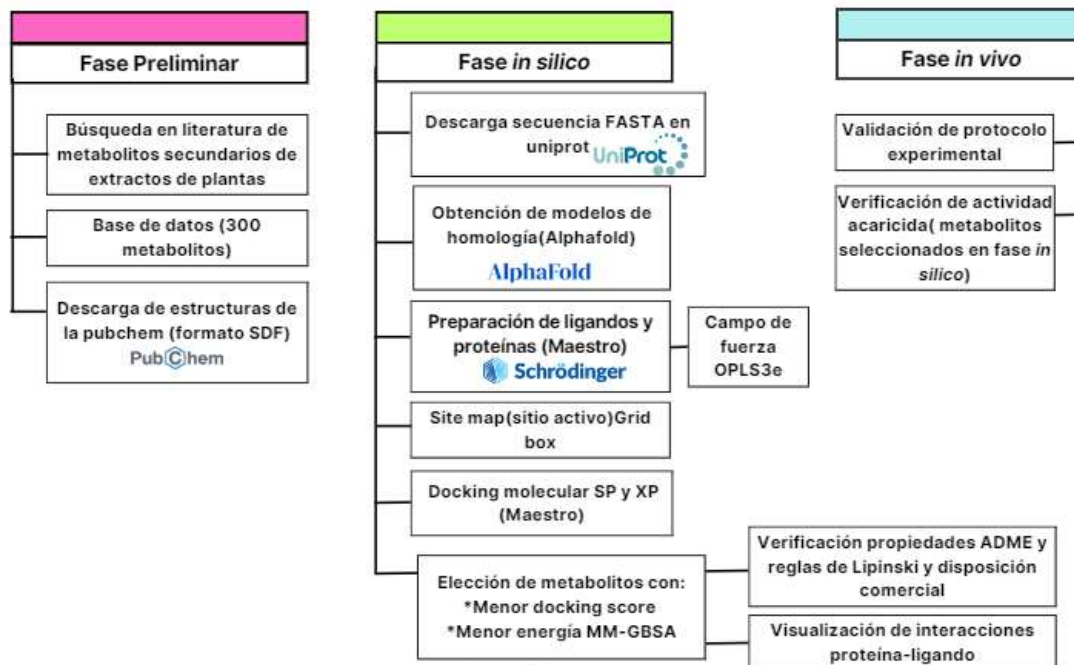
3. Metodología general del proyecto

A continuación, se describe en orden cronológico la metodología usada a lo largo del proyecto. Como se puede observar en la figura 7, para este estudio se llevaron a cabo tres fases: una fase preliminar, seguida de la fase *in silico* y por último una fase *in vivo*.

Figura 7.

Esquema metodológico del proyecto.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*



En la siguiente sesión se explica la metodología empleada para llevar a cabo el análisis computacional y la discriminación de moléculas, partiendo de una base de datos de 300 metabolitos hasta llegar a un total de 7 moléculas con posible actividad acaricida.

Para la fase *in silico* se hizo un análisis computacional usando docking molecular una técnica ampliamente usada en la bioinformática debido a que permite observar las interacciones entre ligandos y proteínas, así como conocer las energías de cada interacción, para este estudio se empleó el software Maestro de Schodinger.

3.1 Metodología fase preliminar

Para esta fase se hizo una búsqueda y selección de 300 metabolitos secundarios presentes en extractos de plantas (Anexo 1). Los extractos de plantas se encuentran reportados en la literatura con actividad acaricida, sin embargo, no se especifica que metabolitos secundarios son responsables de su actividad, para lo cual se consultó en otras publicaciones la caracterización química de dichos extractos para conocer las moléculas involucradas en su composición. Luego se realizó una búsqueda de la estructura química de cada una de estas moléculas con ayuda de la

plataforma de uso libre Pubchem, con esta información se organizó y construyó la base de datos de este estudio.

3.2 Metodología fase *in silico*

3.2.1 Secuencia primaria y modelos de homología

Las estructuras tridimensionales de las subunidades proteicas no se encuentran caracterizadas en la literatura, por lo que se realizó un modelado de homología con ayuda del software Alphafold y la estructura primaria o secuencia FASTA proporcionada en la Uniprot.

3.2.2 Preparación de ligandos y proteínas de interés

Para preparar los 300 ligandos (metabolitos) seleccionados en este estudio se usó la herramienta Ligprep de Schrödinger, Inc.

Luego de preparar los ligandos, se revisaron sus propiedades ADME con ayuda de la herramienta Qikpro de Maestro, Schrödinger, Inc. Para preparar las proteínas se usó la herramienta Protein Preparation Wizard.

3.2.3 Posible sitio de interacción

Para determinar el posible sitio de interacción entre las proteínas de interés y los ligandos se utilizó la herramienta Sitemap en Maestro de Schrödinger. En este estudio se seleccionaron las coordenadas con mejor precisión dentro del grupo de las coordenadas energéticamente favorables arrojadas por Sitemap, para el caso de esta herramienta las coordenadas más precisas son las que se muestran en el mapping site 1. Luego, con la herramienta Grid generation se definió el área específica de la caja en la que realizó el acoplamiento proteína-ligando para cada subunidad, como se indica a continuación:

En este estudio los ligandos se acoplaron en una grid box de 20 Å.

Tabla 2.

Coordenadas de la caja arrojadas por site map para cada subunidad.

Subunidad	Coordenada X	Coordenada Y	Coordenada Z
Subunidad NAD4, Cadena 4 del complejo I	219	161	146
Subunidad hierro-azufre, mitocondrial	-9	-17	-47
Subunidad Rieske mitocondrial	33	34	37
Subunidad COX1 Subunidad 1	10	3	7
AchE	10	75	47

3.2.4 Docking molecular de los ligandos

Se usó la herramienta Glide de Maestro para realizar el acoplamiento de alto rendimiento proteína-ligando basado en estructuras, primero se aplicó el modo de precisión estándar (SP) a los 300 metabolitos de la base de datos inicial, luego se eligieron las mejores poses por ligando y se realizó un acoplamiento de extra precisión (XP) con 120 metabolitos. Para los 2 modos de precisión se generaron al menos 10 poses por ligando, luego se empleó la herramienta Prime MM-GBSA, que permitió optimizar los parámetros de energía de afinidad calculada mediante la interacción proteína-ligando, eliminar iones metálicos, presencia de puentes de hidrógeno y moléculas de solvente.

Después de generar el docking molecular, se eligieron los compuestos con mejor docking score. A este grupo de moléculas con mejores valores *in silico* se le verificaron las propiedades de Lipinski y ADME.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

El factor costo, que hace referencia al valor comercial del metabolito puro, fue el parámetro final que se tuvo en cuenta para la elección de los compuestos que se evaluaron en la fase *in vivo*.

3.2.5 Visualización

Las poses de acoplamiento que se generaron con el software Maestro de Schrödinger se cargaron directamente al programa PyMOL en formato PDB y se visualizaron las interacciones de cada ligando y compuestos de referencia con la proteína trabajada.

3.3. Metodología fase in vivo

En esta fase se comprobó la actividad acaricida de los siete (7) metabolitos seleccionados por docking molecular. Para esto, se usaron dos (2) metodologías, una llamada paquete larval y el otro llamado inmersión larval. Para los dos métodos se usó el etión como control positivo debido a que pertenece al grupo de los organofosforados, los organofosforados se catalogan como el grupo de compuestos químicos más utilizados como acaricidas en el sector ganadero (Roa & del Pilar, 2021) . Además, uno de los acaricidas comerciales más usados hoy en día por los ganaderos colombianos (Montero et al., 2024).

A continuación, se explicará la metodología usada para cada ensayo realizado para la fase *in vivo*:

3.3.1 Metodología para manejo de las garrapatas dentro y fuera del laboratorio

Para el trabajo de investigación se manipuló la especie de garrapata *R. microplus* en tres (3) estadios de su ciclo de vida (huevo, larva y adultas ingurgitadas). A continuación, se muestra una breve descripción del protocolo que se empleó para todo su tratamiento dentro y fuera del laboratorio.

3.3.1.1 Colecta de garrapatas adultas ingurgitadas

Las garrapatas hembras ingurgitadas se colectaron en la empresa el Paraíso Agroecoturístico, en su finca ubicada en el municipio de Betulia, Santander, Colombia. Las garrapatas, se desprendieron a contrapelo de la piel de los bovinos, sujetándolas y haciendo presión constante hacia arriba hasta retirarla completamente, de esta manera se garantiza que no quede el hipostoma de la garrapata dentro de la piel de la vaca, pues esto podría ocasionar quistes e infecciones en el bovino (Zotal Laboratorios, 2018).

3.3.1.2 Transporte de garrapatas ingurgitadas al laboratorio

Las garrapatas desprendidas se almacenaron en tarros sellados con un pedazo de tul de tela de poro fino y una tapa plástica con una malla fina de alambre, con el fin de evitar fugas de las garrapatas y suministrar oxígeno suficiente para ser llevadas al laboratorio de forma íntegra.

3.3.1.3 Limpieza de garrapatas adultas ingurgitadas que ingresan al laboratorio

Las garrapatas al ingresar al laboratorio fueron limpiadas usando un protocolo de higienización sencillo que consistió en retirar manualmente los posibles pelos o restos de estiércol bovino (cuando las garrapatas que se retiraron se encontraban en la cola), luego se dispusieron en papel absorbente y se lavaron con agua destilada. Luego se secaron sobre una servilleta para eliminar el exceso de humedad y así evitar proliferación de hongos en su superficie.

3.3.1.4 Incubación de garrapatas adultas ingurgitadas en el laboratorio

Una vez adecuadas las garrapatas ingurgitadas, se dispusieron ventralmente sobre un trozo de papel filtro, asegurando que no se muevan con ayuda de un trozo de cinta doble faz y dentro de una caja de Petri. Se almacenaron en el insectario del laboratorio del CINTROP, donde hay un periodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, con una humedad de 80-90% y temperatura de 27-29 °C

3.3.1.5 Colecta de huevos de garrapatas en el laboratorio

El periodo de oviposición suele ser de 21-26 días bajo las condiciones de temperatura y humedad mencionadas anteriormente, por lo que se realizaron dos colectas de huevos durante este periodo.

3.3.1.6 Incubación de huevos en el laboratorio

Los huevos colectados se almacenaron (en grupos pequeños de aproximadamente 50-60 mg por cada recipiente) en viales de vidrio de 10 mL provistos de una tapa de algodón, con el fin de mantener los requerimientos de humedad diariamente. Estos huevos se monitorearon constantemente bajo el estereoscopio para determinar la fecha de eclosión de las larvas.

3.3.1.7 Incubación de larvas en el laboratorio

Una vez iniciado el período de eclosión de las larvas, se contabilizaron de 7 a 14 días de edad para poder realizar los ensayos experimentales. La manipulación de las larvas se realizó con ayuda de un pincel No.0 de punta suave.

3.3.1.8 Protocolo para desechar garrapatas adultas y larvas

Las garrapatas adultas y larvas, posterior a su uso en los ensayos se llevaron a una bolsa plástica sellada y debidamente marcada al congelador por un período de 24 h; pasado este tiempo se dispuso en la caneca de residuos biológicos.

3.4 Paquete de larvas o test de paquete larval

Este ensayo se basó en el protocolo reportado por Adenubi y colaboradores (2018), realizando algunas modificaciones para adaptarlo a las condiciones del laboratorio CINTROP como se describe en la figura 8. Como control positivo se usó etión a 750 ppm, debido a que esta es la concentración que indica la etiqueta para el tratamiento de garrapatas en bovinos y se usó

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

agua tipo I como solvente. Se usó también un blanco negativo que corresponde al solvente de las soluciones de trabajo para los ensayos experimentales. En el caso de los ensayos de paquete de larvas se usó la acetona, aprovechando su volatilidad, de manera que al depositar las larvas sobre el paquete solo se encuentre presente el metabolito. Para cada paquete se usaron 15 larvas de 7 a 14 días de edad, realizando 4 réplicas por concentración de cada compuesto, y posteriormente se contaron larvas vivas y muertas cada 24, 48 y 72 horas para determinar el porcentaje de mortalidad. Se realizaron réplicas también en tres días diferentes bajo las mismas condiciones, para un total de 180 individuos por concentración de trabajo.

En estos ensayos se evaluaron inicialmente tres (3) concentraciones diagnósticas para cada metabolito (100, 365 y 1000 ppm), con el fin de obtener una aproximación a la CL₅₀ (concentración de letalidad del 50% de los organismos). Para el metabolito con mejor porcentaje de mortalidad en la prueba diagnóstica, se evaluaron siete (7) concentraciones (50, 100, 350, 500, 750, 1000 y 1300 ppm) con el fin de obtener un valor de CL₅₀ a través de un análisis Probit.

Figura 8.

Protocolo experimental para ensayos de actividad acaricida por paquete de larvas modificado (Adenubi et al., 2018)

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*



NOTA: Esquema realizado por la autora en el software Biorender

3.5 Inmersión larval

El segundo ensayo que se realizó en este trabajo de investigación fue la prueba de inmersión larval, para el cual se usaron 25 larvas por réplica y se realizaron cuatro réplicas por concentración de compuesto, contando larvas vivas y muertas cada 24, 48 y 72 horas. De igual manera, se realizaron réplicas en tres días diferentes para un total de 400 individuos por cada análisis. Se tuvo en cuenta el protocolo de (Klafke et al., 2021), realizando algunas modificaciones para adaptarlo a las condiciones del laboratorio CINTROP, como se puede observar en la figura 9.

Para los ensayos de inmersión se usó el etanol al 10% como solvente o blanco negativo, debido a que la acetona presentaba alta mortalidad al sumergir las larvas por 10 minutos, diferentes estudios reportan el desarrollo de protocolos de inmersión larval usando concentraciones de etanol/agua que van desde 1%, 8% hasta 50% (Novato et al., 2022; Ramírez et al., 2016; Sousa et al., 2022). Por tanto, se evaluaron los siete metabolitos a una concentración de 10% etanol/agua.

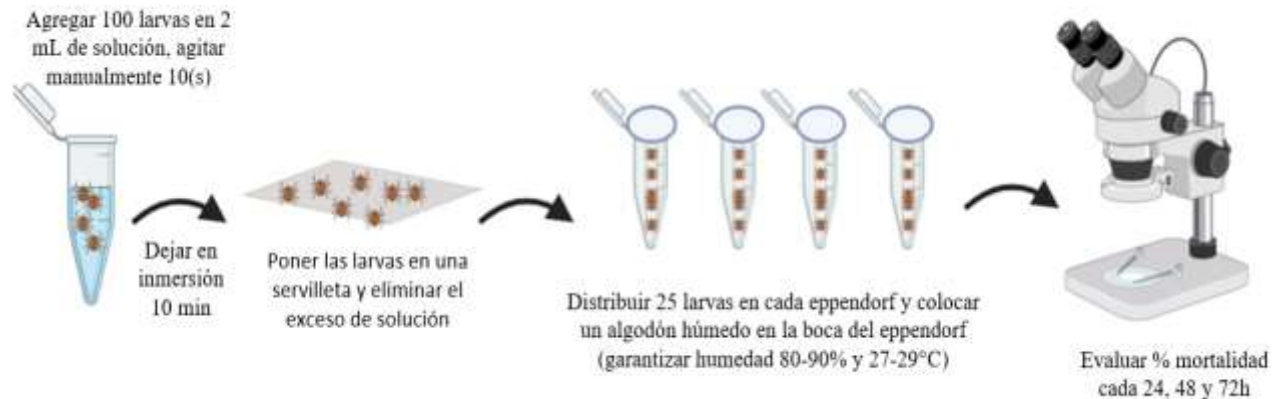
En estos ensayos se evaluaron inicialmente tres concentraciones diagnósticas para cada metabolito (100, 365 y 1000 ppm), con el fin de obtener una aproximación a la CL_{50} y para el

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

metabolito con mejor porcentaje de mortalidad se evaluaron siete concentraciones (150, 320, 450, 550, 750, 900 y 1000 ppm) para obtener un valor de la CL₅₀ por medio del análisis Probit.

Figura 9.

Protocolo experimental para ensayos de actividad acaricida por inmersión larval modificado. basado en (Klafke et al., 2021)



NOTA: Esquema realizado por la autora en el software Biorender.

3.6 Análisis estadístico:

Para calcular el porcentaje de mortalidad de cada concentración de metabolito se utilizó la fórmula descrita a continuación:

Ecuación 4.

*Cálculo del porcentaje de mortalidad de larvas *Rhipicephalus microplus**

$$\% \text{Mortalidad} = \frac{\text{número de larvas muertas}}{\text{número de larvas totales}} * 100$$

Se hizo un análisis usando diagramas de dispersión, los cuales permitieron obtener información sobre el tipo de relación existente entre las concentraciones y el porcentaje de

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

mortalidad de cada réplica, posibilitando la detección de valores atípicos o extremos (Laguna, 2014). En este estudio los valores de cada réplica se mostraban dentro de una curva de dispersión respecto a la media, la cual tenía una precisión del 95%. Los valores fuera de esta curva no se consideraron como válidos y se eliminaron máximo 4 valores de las 12 réplicas totales que se realizaron por cada concentración durante los tres días diferentes.

Para cada metabolito se examinó la normalidad de los datos de mortalidad obtenidos, usando la prueba de Kolmogórov-Smirnov debido a que el número de datos de mortalidad para cada metabolito era mayor a 50 ($n > 50$). Para todos los metabolitos se encontraron valores $p < 0.05$, lo cual indica que los datos no seguían una distribución normal y que sí había diferencias significativas entre el conjunto de datos introducidos.

Como los datos no seguían una distribución normal, se aplicaron las pruebas no paramétricas Krustal-wallis y comparaciones múltiples, usando el programa Statistica versión 10 (Statistica, 2024). Para los resultados del Krustal-wallis, se analizaron los p-value: $p > 0.05$, el cual indica que no existen diferencias estadísticamente significativas. Mientras que $p \leq 0,05$, indica diferencias estadísticamente significativas. Se usó la prueba post-hoc por comparaciones múltiples, que permitió averiguar entre qué grupos de datos existían diferencias significativas y la magnitud de esas diferencias. Para este estudio se compararon todas las concentraciones diagnósticas y múltiples con el grupo control negativo.

Para analizar los datos de mortalidad por concentraciones múltiples y hallar las concentraciones letales, por los métodos de inmersión larval y paquete larval se usó el programa Polo para ajustar los datos a un modelo Probit, el cual es un tipo de regresión donde la variable dependiente puede tomar dos valores.

4. Resultados Fase *in silico*

En esta sección se presentan los modelos de homología obtenidos por medio del software Alphafold para las subunidades escogidas para cada complejo de la cadena respiratoria. Para observar la confiabilidad de cada modelo, Alphafold proporciona rangos de confianza de cada parte de la proteína modelada, esos rangos se representan por código de colores, el color azul representa una confiabilidad de más del 90%, el color celeste representa una confiabilidad entre 90 y 70%, el color amarillo representa una confiabilidad del 70 al 50% y el color naranja representa una confiabilidad por debajo del 50%.

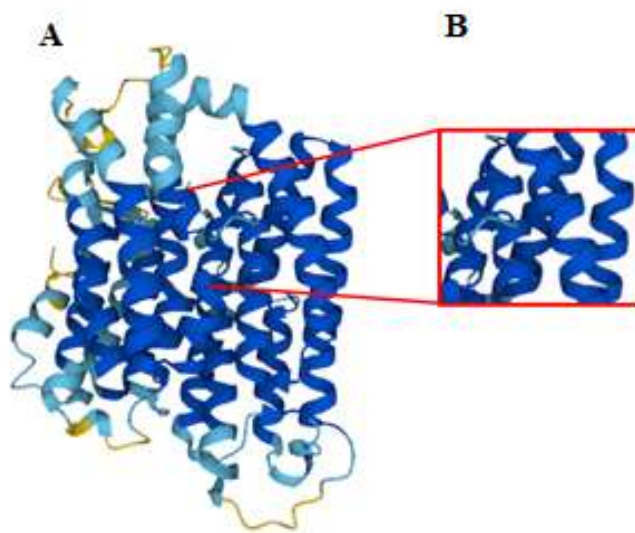
4.1 Subunidad NAD4, Cadena 4 del complejo I

4.1.1 Resultados modelo de homología y docking molecular: El software Alphafold, proporcionó una confiabilidad del 86.55% para la estructura completa del modelo predicho, para la subunidad NAD4, Cadena 4 del complejo I (figura 10), usando la secuencia de aminoácidos descargada de vector base con ID 18250943, verificada por la base de datos Uniprot con código V9MMD6.

La confiabilidad del modelo por secciones está entre 90 y 50%, como se observa en la figura 10A, hay varios rangos de confianza en la estructura (azul 90%, celeste 90-70% y amarillo 70-50%), además el posible sitio de interacción de la proteína (Figura 10B) se encuentra en un rango de confiabilidad mayor al 90%, demostrando ser apto para continuar con los demás análisis computacionales.

Figura 10.

Modelo de homología para la subunidad NAD4, Cadena 4 del complejo I, realizado por Alphafold



Luego de realizar el docking molecular se obtuvieron los metabolitos observados en la tabla 3, como los mejores posicionados según los parámetros de docking score (DS) y energía de afinidad (EA). La tabla 3 se presenta de manera ascendente según el valor de energía de afinidad. Los primeros metabolitos son la agnúsida y nepitrina, tienen la mejor EA del grupo (la más negativa) sin embargo, se descartan para el análisis *in vivo* debido a que presentan dos (2) violaciones de las reglas de Lipinski. Número de aceptores de hidrógeno (NAH>10) y el número de donadores de hidrógeno (NDH>5). Por otro lado, el ácido rosmarínico, epicatequina, catequina y ácido caféico también se descartaron debido a que están por encima del factor costo máximo para este estudio (100 dólares x 10 g de compuesto). La aucubina y el ácido cloregénico presentan 1 violación en reglas de Lipinski (NDH>5), todos los metabolitos mencionados anteriormente se descartaron para posteriores análisis. Por tanto, de los metabolitos presentes en la tabla 2, los que cumplen reglas de (Lipinski), propiedades (ADME) y factor costo son: la quercetina y el ácido gálico, por lo que se puede decir que son viables para uso en análisis *in vivo*.

Tabla 3.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Metabolitos con menor energía de afinidad para la subunidad NAD4, Cadena 4 del complejo I, luego de realizar el docking molecular

Metabolito	EA (kcal/mol)	LogP ₀	PM(g/mol)	DS	AH	DH
Agnúsida	-59.30	-0.79	466.44	-9.96	11	6
Nepitrina	-57.29	0.12	478.40	-7.40	12	7
Acido rosmarínico	-49.16	1.2	360.31	-6.82	8	5
Epicatequina	-44.20	0.85	290.27	-7.82	6	5
Catequina	-38.86	0.85	290.27	-7.82	6	5
Aucubina	-36.56	-1.89	346.33	-7.08	9	6
Ácido clorogénico	-32.96	-0.38	354.31	-8.76	9	6
Quercetina	-24.09	1.23	302.24	-7.05	7	5
Acido gálico	-25.51	0.21	170.12	-6.84	5	4
Ácido caféico	-8.89	0.93	180.16	-6.58	4	3

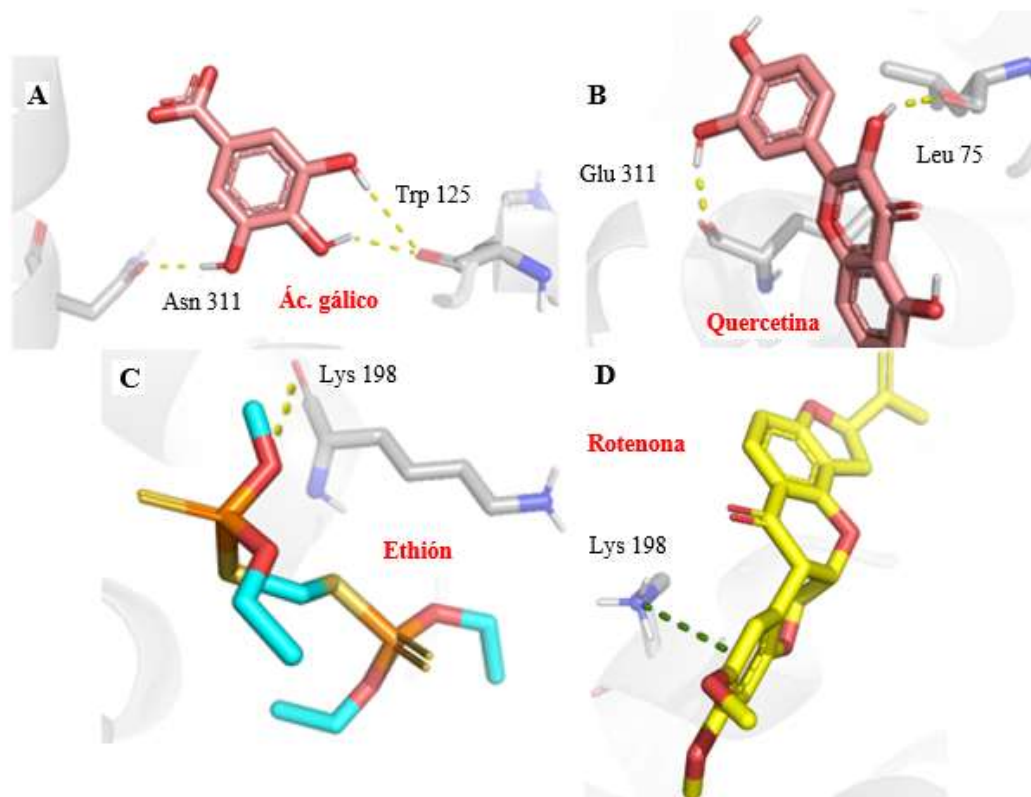
Nota: Las abreviaturas de los resultados en estas tablas corresponden a DS: docking score; EA: energía de afinidad; Los rangos de valores sugeridos para los siguientes parámetros se muestran entre paréntesis. PM: peso molecular (130 – 500), Log P₀: coeficiente de octanol-agua (≤ 5), DH: número de donadores de puentes de hidrógeno (0 – 5) y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno (0– 10).

Ahora es importante estudiar el modo de unión de los 2 metabolitos (ácido gálico y quercetina) elegidos para continuar con la fase *in vivo*, con respecto al compuesto de referencia que es el etión (figura 11C) con valor de DS: -1.97 y una EA: -38.21, para esta subunidad se presenta una interacción polar de tipo puente de hidrógeno entre el aminoácido Lys 198 y el oxígeno del grupo éster del etión. Para la rotenona (inhibidor reportado en literatura) (figura 11D) DS: -2.82 y una EA: -40.63 se observa una interacción tipo π - catión para el aminoácido Lys 198 y su grupo quinona.

Para el ácido gálico (figura 11A) con un DS: -6.84 y una EA: -25.51, se observa que tiene interacción con la proteína por medio de dos enlaces de tipo puente de hidrógeno, una en el aminoácido Asn 311 con uno de sus grupos hidroxilo y otra con el aminoácido Trp 125 y otros dos de sus grupos hidroxilo. Para la quercetina (figura 11B) con un DS: -7.05 y una EA: -24.09, se observan también dos interacciones de tipo puente de hidrógeno con los aminoácidos Glu 315 y Leu 75 y dos de sus grupos hidroxilo.

Figura 11.

Posiciones de acoplamiento de las moléculas con posible actividad acaricida de la subunidad NAD4, Cadena 4 del complejo I en Rhipicephalus microplus. A. Ac. gálico B. Quercetina C. etión (compuesto de referencia) D. Rotenona (Inhibidor reportado para el complejo I)



NOTA: Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, gris; oxígeno, rojo; nitrógeno; azul, azufre; amarillo, fósforo; naranja, los carbonos del etión se presentan en celeste). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas: las interacciones tipo puente de hidrógeno se colorean en amarillo y en verde las interacciones tipo π - catión. Imágenes realizadas por la autora de trabajo en el software Pymol.

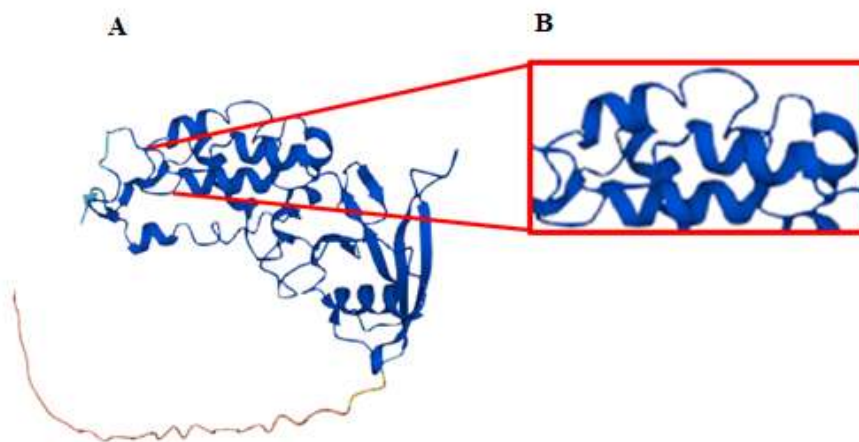
4.2 Subunidad hierro-azufre, mitocondrial del complejo II

4.2.1 Resultados modelo de homología y docking molecular: Para el modelo construido con Alphafold, el software arrojó un porcentaje de confiabilidad de 90.53% para la estructura completa de la subunidad hierro-azufre, mitocondrial del complejo II (figura 12), usando la secuencia de aminoácidos descargada de vector base con ID LOC119179326, verificada por la base de datos Uniprot con código A0A6M2CRB1.

La confiabilidad del modelo por secciones de la proteína está entre 90 y menos del 50%, como se observa en la figura 12A, hay varios rangos de confianza en la estructura (azul: 90%, celeste: 90-70%, amarillo:70-50% y naranja: menos del 50%), además el posible sitio de interacción de la proteína (Figura 12B) se encuentra en un rango de confiabilidad mayor al 90%, lo cual es un buen porcentaje para la continuidad de un análisis computacional.

Figura 12.

Modelo de homología para la subunidad de hierro-azufre, mitocondrial del complejo II realizado por Alphafold



Del screening virtual se obtuvieron los metabolitos observados en la tabla 4 como los mejores según los parámetros de docking score (DS) y energía de afinidad (EA). La tabla 4 se

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

encuentra organizada de manera ascendente según el valor de energía. La nepitrina tiene 2 violaciones en las reglas de Lipinski (NAH>10, NDH>5), la epicatequina, el ácido rosmarínico, el eriodictiol, la dihidroplartina, la atropina y la catequina se encuentran por encima del factor costo máximo para este estudio, en ese orden de ideas los metabolitos mencionados anteriormente se descartaron. Por tanto, de los metabolitos presentes en la tabla 4 que cumplen reglas de Lipinski, propiedades ADME y factor costo son: la quercetina, el ácido gálico y la naringenina, seleccionados para continuar el análisis *in vivo*.

Tabla 4.

Metabolitos con menor energía de afinidad para la subunidad de hierro-azufre, mitocondrial del complejo II, luego de realizar el docking molecular

Metabolito	EA (kcal/mol)	LogP ₀	PM	DS	AH	DH
Nepitrina	-69.85	0.12	478.40	-8.92	12	7
Epicatequina	-54.93	0.85	290.27	-8.13	6	5
Acido rosmarínico	-53.13	1.52	360.31	-7.08	8	5
Eriodictiol	-47.40	1.45	288.25	-6.38	6	4
Catequina	-45.15	0.85	290.27	-6.06	6	5
Quercetina	-45.06	1.23	302.24	-6.68	7	5
Naringenina	-44.98	1.84	272.25	-5.14	5	3
Atropina	-44.76	2.06	289.37	-5.69	4	1
Ácido gálico	-43.95	0.21	170.12	-5.39	5	4
Dihidroplartina	-41.87	3.23	353.41	-5.14	4	0

Nota: Las abreviaturas de los resultados en estas tablas corresponden a DS: docking score; EA: energía de afinidad; Los rangos de valores sugeridos para los siguientes parámetros se muestran entre paréntesis. PM: peso molecular (130 – 500), Log Po: coeficiente de octanol-agua (≤ 5), DH: número de donadores de puentes de hidrógeno (0 – 5) y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno (0– 10).

Después del acoplamiento molecular para la subunidad hierro-azufre, mitocondrial del complejo II de *R. microplus*, se obtuvieron tres metabolitos con posible actividad acaricida: ácido gálico, quercetina y naringenina. Ahora es importante comparar el modo de unión de los tres metabolitos con respecto al compuesto de referencia que es el etión (figura 13C) DS: -1.52 y una EA: -20.56, el cual presenta una interacción polar de tipo puente de hidrógeno entre el aminoácido Tyr 199 de la proteína y el oxígeno del grupo éster del etión. Para el inhibidor del complejo II

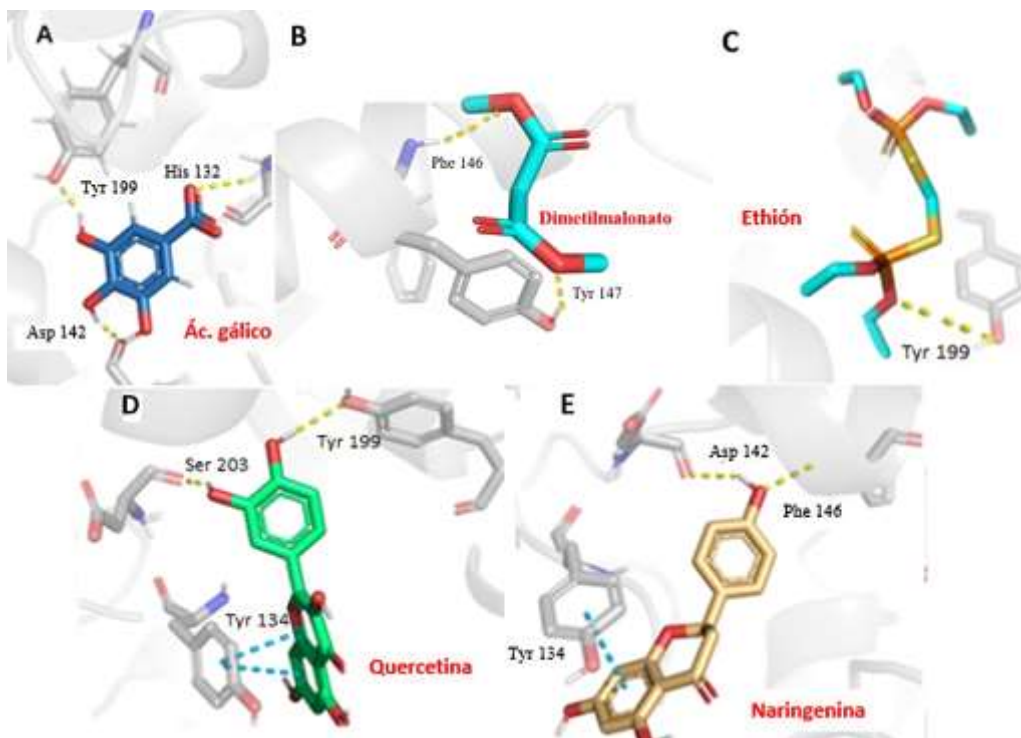
METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

dimetil malonato (figura 13B) con DS: -3.23 y una EA: -38.53, se observa dos interacciones tipo puente de hidrógeno con los aminoácidos Phe 146 y Tyr 147, ambas interacciones se presentan con sus grupos carboxilos.

Para el ácido gálico (figura 13A) con un DS: -5.39 y una EA: -43.95, se observa que tiene interacción con la proteína por medio de tres enlaces de tipo puente de hidrógeno, con los aminoácidos His 132 y su grupo carbonilo, Tyr 199 con uno de sus grupos hidroxilo y Asp 142 interacciona con dos de sus grupos hidroxilo. Para la quercetina (figura 13B) con un DS: -6.68 y una EA: -45.06, se observan también dos interacciones de tipo puente de hidrógeno con los aminoácidos Tyr 199 y Ser 203 con dos de los grupos hidroxilo de la quercetina, también se observan dos interacciones de tipo π - π con la Tyr 134 y finalmente para la naringenina (figura 13D) con un DS: -5.14 y una EA: -44.98, se observan dos interacciones de tipo puente de hidrógeno con los aminoácidos Phe 146 y Asp 142 con uno de sus grupos hidroxilo, y presenta una interacción tipo π - π con la Tyr 134.

Figura 13.

Posiciones de acoplamiento de los metabolitos con posible actividad acaricida de la subunidad hierro-azufre mitocondrial del complejo II en R. microplus. A. Ac. gálico B. Dimetilmalonato (inhibidor reportado para el complejo II) C. Etión (compuesto de referencia)



NOTA: Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, gris; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul, azufre, amarillo; fósforo, naranja, los carbonos del etión se presentan en celeste). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas: las interacciones tipo puente de hidrógeno se colorean en amarillo y en azul las interacciones tipo π - π . Imágenes realizadas por la autora de trabajo en el software Pymol.

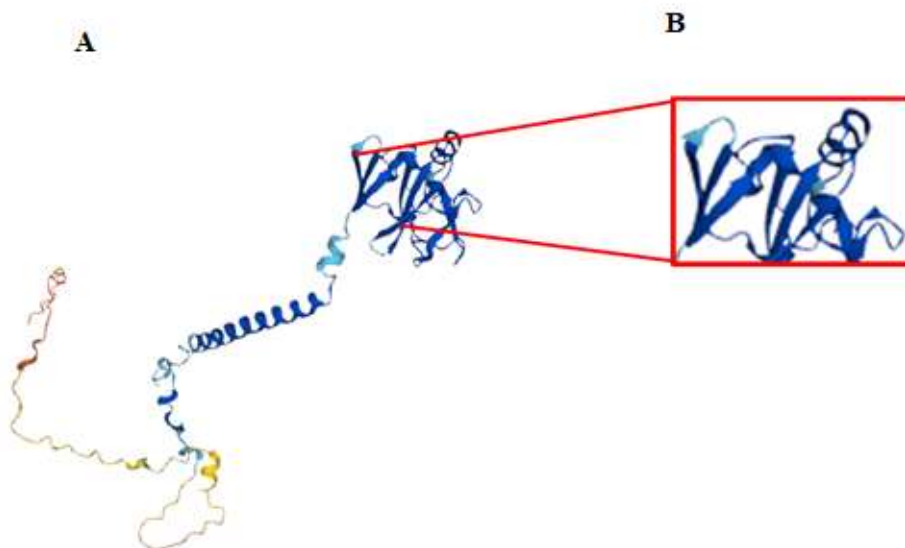
4.3 Subunidad rieske mitocondrial del complejo III

4.3.1 Resultados modelo de homología y docking molecular: Para el modelo construido con Alphafold, el software arrojó un porcentaje de confiabilidad de 82.02% para la estructura completa de la rieske mitocondrial del complejo III (figura 12A), usando la secuencia de aminoácidos descargada de vector base con ID LOC119176285, verificada por la base de datos Uniprot con código A0A6M2CSX0.

La confiabilidad del modelo por secciones de la proteína está entre 90 y menos del 50% como se observa en la figura 14A, hay varios rangos de confianza en la estructura (azul: 90%, celeste: 90-70%, amarillo:70-50% y naranja: menos del 50%), además el posible sitio de interacción de la proteína (Figura 14B) se encuentra en un rango de confiabilidad entre 90%-70%, lo cual es un buen porcentaje para la continuidad de un screening virtual.

Figura 14.

Modelo de homología para la subunidad rieske mitocondrial del complejo III, realizado por Alphafold.



METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Luego de realizar el docking molecular se obtuvieron los metabolitos que se observan en la tabla 5, como los mejores según los parámetros de docking score (DS) y energía de afinidad (EA). La tabla 5 se encuentra organizada de manera ascendente según el valor de energía. La aucubina presenta una violación a las reglas de Lipinski (NDH>5) por lo que se descarta, la patuletina, epicatequina, luteolina, pinocembrina y eriodictiol se descartan también debido a que exceden el factor costo para este estudio. Por lo tanto, los metabolitos seleccionados para continuar el análisis *in vivo* son: la quercetina, naringenina, ácido gálico y el carvacrol, basados en que cumplen reglas de Lipinski, propiedades ADME y factor costo.

Tabla 5.

Metabolitos con menor energía de afinidad para la subunidad rieske mitocondrial del complejo III, luego de realizar el docking molecular.

Metabolito	EA (kcal/mol)	LogP ₀	PM	DS	AH	DH
Patuletina	-40.58	1.38	322.26	-4.41	8	5
Quercetina	-35.81	1.23	302.24	-4.83	7	5
Epicatequina	-33.24	0.85	290.27	-4.09	6	5
Naringenina	-33.19	1.84	272.25	-6.04	5	3
Luteolina	-32.54	1.73	286.24	-4.51	6	4
Pinocembrina	-32.32	2.26	256.25	-5.76	4	2
Eriodictiol	-31.31	1.45	288.25	-4.22	6	4
Carvacrol	-28.74	2.8	150.22	-4.18	1	1
Aucubina	-27.27	-1.89	346.33	-3.89	9	6
Ácido gálico	-21.74	0.21	170.12	-3.88	5	4

Nota: Las abreviaturas de los resultados en estas tablas corresponden a DS: docking score; EA: energía de afinidad; Los rangos de valores sugeridos para los siguientes parámetros se muestran entre paréntesis. PM: peso molecular (130 – 500), Log Po: coeficiente de octanol-agua (≤ 5), DH: número de donadores de puentes de hidrógeno (0 – 5) y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno (0– 10).

Del acoplamiento molecular para la subunidad rieske mitocondrial del complejo III de *R. microplus*, se obtuvieron cuatro metabolitos con posible actividad acaricida: ácido gálico, quercetina, naringenina y carvacrol. Es muy importante estudiar el modo de unión de los cuatro metabolitos con la proteína de interés, con respecto al compuesto de referencia que es el etión

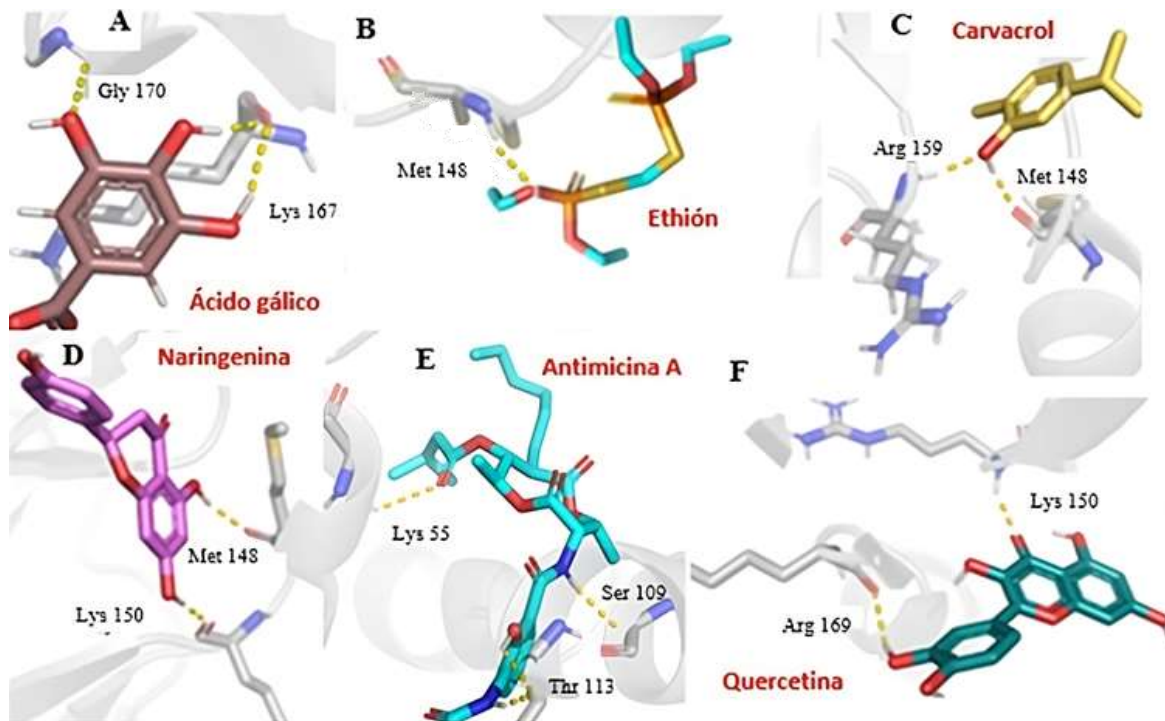
METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

(figura 13B) DS: -2.04 y una EA: -35.47 el cual presenta una interacción de tipo puente de hidrógeno entre el aminoácido Met 148 y el oxígeno del grupo éster del ligando. Para el inhibidor del complejo III, antimicina A (figura 15E) DS: -4.12 y una EA: -38.91, se observan dos interacciones puente de hidrógeno entre el aminoácido Thr 113, un nitrógeno de su grupo amida y un oxígeno con uno de sus grupos hidroxilo, una interacción tipo puente de hidrógeno entre Ser 109 y el nitrógeno de su anillo aromático, por último, otra interacción puente de hidrógeno entre la Lys 55 y el oxígeno de su grupo cetona

Para el ácido gálico (figura 15A) con un DS: -3.88 y una EA: -21.74, se observa que tiene interacción polar con la proteína por medio de tres enlaces de tipo puente de hidrógeno, una con el aminoácido Gly 170 con su grupo hidroxilo y otras 2 interacciones con el aminoácido Lys 167 y uno de sus grupos hidroxilo. Para la quercetina (figura 15F) con un DS: -4.83 y una EA: -35.81, se observan también dos interacciones polares de tipo puente de hidrógeno con los aminoácidos Arg 169 y su grupo hidroxilo y Lys 150 interacciona con su grupo carbonilo, la naringenina (figura 15D) con un DS: -6.04 y una EA: -33.14, presenta dos interacciones de tipo puente de hidrógeno con los aminoácidos Lys 150 y Met 148 interaccionan con dos de sus grupos hidroxilo. Por último, el carvacrol (figura 15C) con un DS: -4.18 y una EA: -28.74 presenta dos interacciones polares de tipo puente de hidrógeno con los aminoácidos Arg 169 y Met 148 y uno de sus grupos hidroxilo.

Figura 15.

Posiciones de acoplamiento de las moléculas con posible actividad acaricida para la subunidad rieske mitocondrial del complejo III en R. microplus. A. Ac. gálico B. eti3n (compuesto de referencia) C. Carvacrol D. Naringenina E. Antimicina A (inhibidor reportado para el complejo III)



NOTA: Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, gris; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul, azufre, amarillo, f3sforo; naranja, los carbonos del eti3n se presentan en celeste). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas: las interacciones tipo puente de hidrógeno se colorean en amarillo y en azul las interacciones tipo π - π . Imágenes realizadas por la autora de trabajo en el software Pymol.

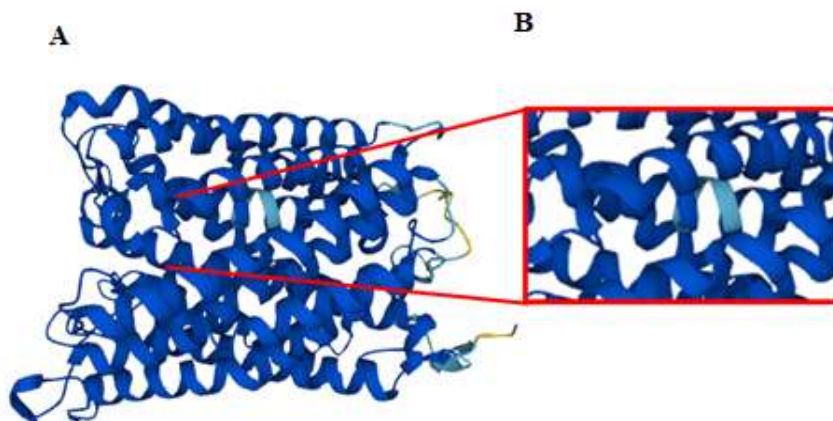
4.4 Subunidad COX1 Subunidad 1 del complejo IV

4.4.1 Resultados modelo de homología y docking molecular: Del modelo construido con Alphafold, el software arrojó un porcentaje de confiabilidad de 87.40% para la estructura completa subunidad COX1 Subunidad 1 del complejo IV (figura 16A), usando la secuencia de aminoácidos descargada de vector base con ID 18250935, verificada por la base de datos Uniprot con código V9MLX4.

La confiabilidad del modelo por secciones de la proteína está entre 90-70%, como se observa en la figura 16A, hay varios rangos de confianza en la estructura modelada (azul: 90%, celeste: 90-70% y amarillo:70-50% además el posible sitio de interacción de la proteína (Figura 16B) se encuentra en un rango de confiabilidad entre 90%-70%, lo cual es un buen porcentaje para los posteriores análisis computacionales.

Figura 16.

Modelo de homología para la subunidad COX1 Subunidad 1 del, complejo IV, realizado por Alphafold



Luego de realizar el docking molecular se obtuvieron los metabolitos que se observan en la tabla 6, como los mejores según los parámetros de docking score (DS) y energía de afinidad (EA), la tabla 6 se encuentra organizada de manera ascendente según valor de energía. El ácido

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

caféico y el ácido 3,4-dihidroxifenilacético superan el valor de costo establecido para este proyecto, el estilbena presenta una violación a una regla de lipinski ($MLogP_0 > 5$), el geraniol y el limoneno cumplían los parámetros farmacocinéticos, pero no cumplían los parámetros de costo, por lo cual fueron descartados.

Por lo que los metabolitos seleccionados para continuar el análisis *in vivo* para este complejo fueron: Ácido gálico, carvacrol, linalool, eugenol y citral debido a que cumplen las reglas de Lipinski, propiedades ADME y factor costo.

Tabla 6.

Metabolitos con menor energía de afinidad para la subunidad COX1 Subunidad 1

Metabolito	EA (kcal/mol)	LogP ₀	PM	DS	AH	DH
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	-36.63	0.71	168.15	-6.57	4	3
Ácido gálico	-30.82	0.21	170.12	-7.20	5	4
Estilbena	-30.66	5.55	380.48	-3.70	4	0
Linalool	-30.16	2.66	154.25	-4.39	1	1
Eugenol	-29.16	2.66	154.25	-4.39	1	1
Citral	-28.96	2.66	154.25	-4.39	1	1
Carvacrol	-28.45	2.25	164.2	-4.35	2	1
Ácido cafeico	-27.67	2.8	150.22	-3.74	1	1
Geraniol	-25.72	2.71	152.23	-3.77	1	0
Limoneno	-21.27	0.93	180.16	-5.01	4	3

Nota: Las abreviaturas de los resultados en estas tablas corresponden a DS: docking score; EA: energía de afinidad; Los rangos de valores sugeridos para los siguientes parámetros se muestran entre paréntesis. PM: peso molecular (130 – 500), Log Po: coeficiente de octanol-agua (≤ 5), DH: número de donadores de puentes de hidrógeno (0 – 5) y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno (0– 10).

Del acoplamiento molecular para la subunidad COX1 Subunidad 1 del complejo IV de *R. microplus*, se obtuvieron cuatro metabolitos con posible actividad acaricida: ácido gálico, carvacrol, linalool, eugenol y citral. Es relevante revisar el modo de unión de estos cinco metabolitos con la proteína de interés, con respecto al compuesto de referencia que es el etión (figura 15F) DS: -2.64 y una EA: -43.18, el cual presenta una interacción polar de tipo puente de

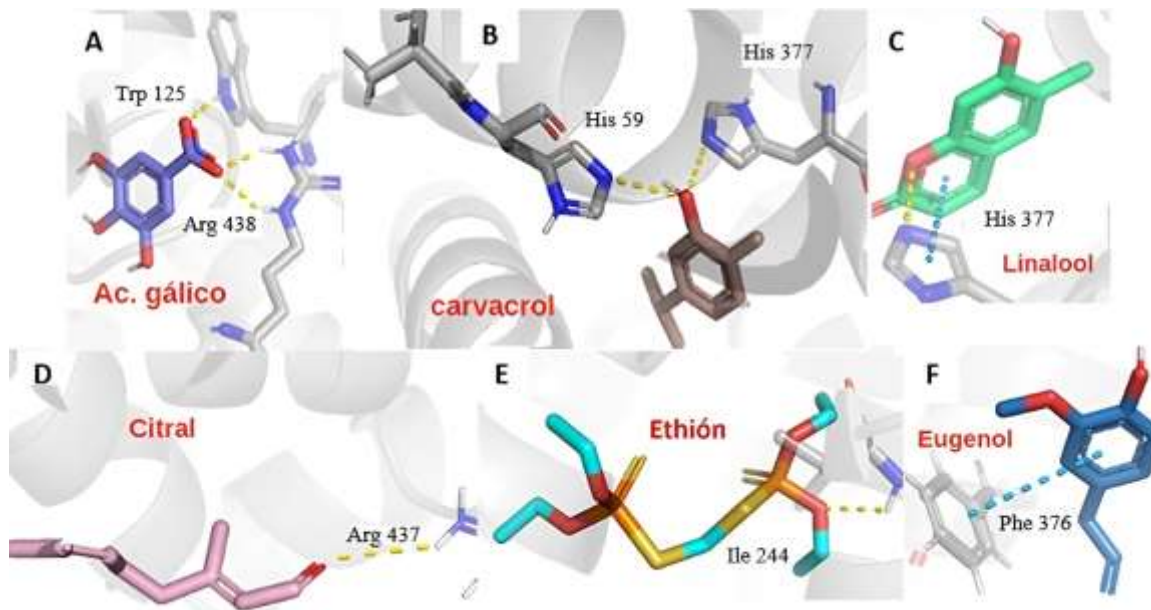
METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

hidrógeno con el aminoácido Ile 244 de la estructura de la proteína y el oxígeno del grupo éster. Para la subunidad del complejo IV se hizo docking con los inhibidores reportados en literatura, pero su estructura es muy pequeña y no se presentaron interacciones con la subunidad proteica evaluada, sin embargo, se conoce que los inhibidores reportados inhiben el paso del oxígeno al complejo IV (Baynes & Dominiczak, 2006)

Para el ácido gálico (figura 17A) con un DS: -3.88 y una EA: -21.74, se observa que tiene interacción polar con la proteína por medio de tres enlaces de tipo puente de hidrógeno, una con el aminoácido Trp 125 y su grupo hidroxilo y otras dos interacciones con el aminoácido Arg 438 y su grupo hidroxilo. Para el carvacrol (figura 17B) con un DS: -4.83 y una EA: -35.81, se observan también dos interacciones polares de tipo puente de hidrógeno con los aminoácidos His 59 y Hys 377 y su grupo hidroxilo. El linalool (figura 17C) con un DS: -6.04 y una EA: -33.14, presenta dos interacciones, una polar de tipo puente de hidrógeno con la His 377 y presentó también un acoplamiento tipo π - π con el mismo aminoácido His 377. El eugenol (figura 17D) con un DS: -4.18 y una EA: -28.74 tiene una interacción de carácter π - π con la Phe 376. Por último el citral (figura 17E) presenta una interacción polar de tipo puente de hidrógeno con la Arg 437 y su hidroxilo.

Figura 17.

Posiciones de acoplamiento de las moléculas con posible actividad acaricida para la subunidad COX1 Subunidad 1 del complejo IV en R. microplus. A. Ac. gálico B. Carvacrol C. Linalool D. Eugenol E. citral y el compuesto de referencia F. etión.



NOTA: Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, gris; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul, azufre, amarillo, fósforo, naranja, los carbonos del etión se presentan en celeste). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas: las interacciones tipo puente de hidrógeno se colorean en amarillo y en azul las interacciones tipo π - π . Imágenes realizadas por la autora de trabajo en el software Pymol.

4.5 Acetilcolinesterasa (AChE)

4.5.1 Resultados modelo de homología y docking molecular: El modelo construido por Alphafold arrojó un porcentaje de confiabilidad de 95.51% para la estructura completa de la AChE, (figura 18A), usando la secuencia de aminoácidos descargada de vector base con ID LOC119164425, verificada por la base de datos Uniprot con código M1U2A0.

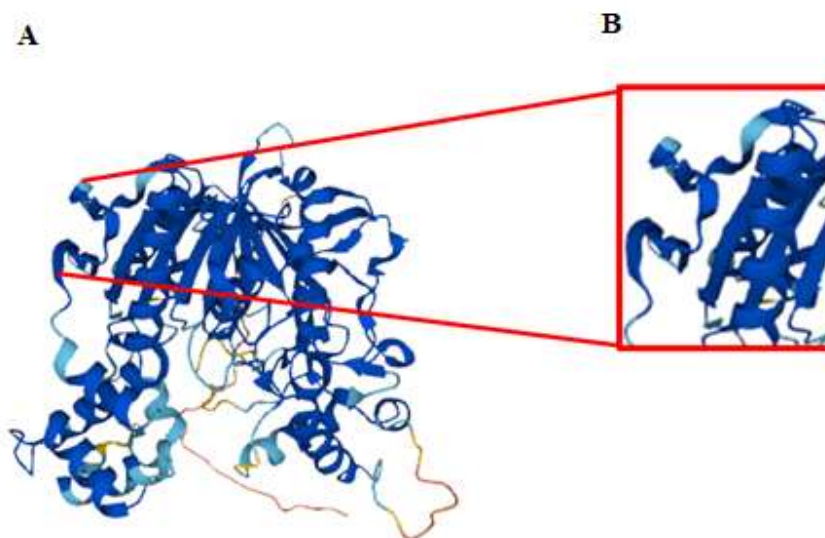
La confiabilidad del modelo por secciones de la proteína está entre 90-70%, como se observa en la figura 18A, hay varios rangos de confianza en la estructura modelada (azul: 90%, celeste: 90-

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

70% y amarillo:70-50% además el posible sitio de interacción de la proteína (Figura 18B) se encuentra en un rango de confiabilidad entre 90%-70%, lo cual es un buen porcentaje para los posteriores análisis computacionales.

Figura 18.

Modelo de homología para la acetilcolinesterasa, (AChE), realizado por Alphafold



Después de realizar el docking molecular se obtuvieron los metabolitos que se observan en la tabla 7, como los mejores según los parámetros de docking score (DS) y energía de afinidad (EA), la tabla 7 se encuentra organizada de manera ascendente según el valor de energía.

El agnúsido es el metabolito que tiene mejor energía de afinidad, sin embargo, presenta dos violaciones a las reglas de lipinski (NAH>10, NDH>5). La aloicoisoflavona A, catequina, luteolina, epicatequina y juninpenina A se descartaron debido a que excedían el factor costo para este proyecto. La aucubina tiene una violación a las reglas de lipinski (1 violation: NDH>5). Por lo tanto, los 3 metabolitos elegidos para continuar la fase *in vivo* fueron: ácido gálico, quercetina y naringenina, ya que cumplieron las reglas de Lipinski, propiedades ADME y factor costo.

Tabla 7.

Metabolitos con menor energía de afinidad para la acetilcolinesterasa (AChE), luego de realizar el docking molecular.

Metabolito	EA (kcal/mol)	LogP ₀	PM	DS	AH	DH
Agnúsido	-47.84	-0.79	466.44	-6.23	11	6
Alolicoisoflavona A	-37.53	3.11	354.35	-4.69	6	4
Junipegenina A	-35.47	1.72	316.26	-5.43	7	4
Quercetina	-32.45	1.23	302.24	-6.55	7	5
Aucubina	-31.96	-1.89	346.33	-8.05	9	6
Catequina	-29.85	0.85	290.27	-4.90	6	5
Luteolina	-28.63	1.73	286.24	-5.49	6	4
Epicatequina	-26.84	0.85	290.27	-6.46	6	5
Naringenina	-24.91	1.84	272.25	-5.16	5	3
Ácido gálico	-7.41	0.21	170.12	-4.34	5	4

Nota: Las abreviaturas de los resultados en estas tablas corresponden a DS: docking score; EA: energía de afinidad; Los rangos de valores sugeridos para los siguientes parámetros se muestran entre paréntesis. PM: peso molecular(130 – 500), Log P₀: coeficiente de octanol-agua (≤ 5), DH: número de donadores de puentes de hidrógeno(0 – 5) y AH: número de aceptores de puentes de hidrógeno (0– 10).

A continuación, se describe el posible modo de unión de los 3 metabolitos elegidos con la proteína de interés, con respecto al compuesto de referencia que es el etión (figura 19D) DS: -3.59 y una EA: -45.93. Para la acetilcolinesterasa se presenta una interacción polar de tipo puente de hidrógeno entre la Lys 467 y el azufre del grupo tiol en la estructura del etión.

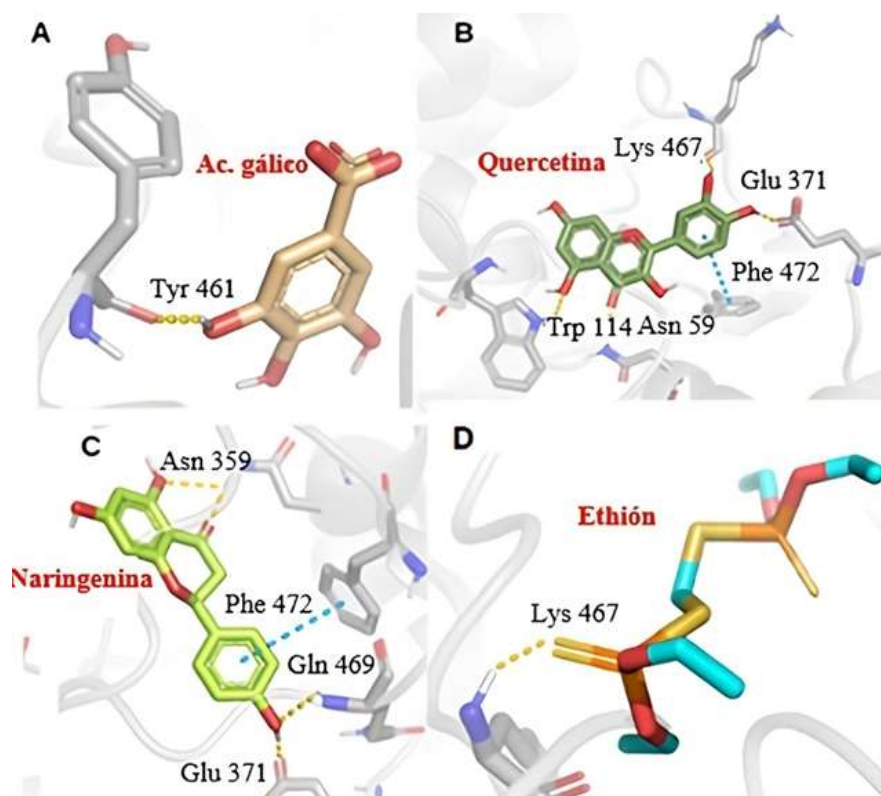
Para el ácido gálico (figura 19A) con un DS: -4.34 y una EA: -7.41, se observa que tiene interacción polar con la proteína por medio de tres enlaces de tipo puente de hidrógeno, una con el aminoácido Tyr 461 y su grupo hidroxilo. Para la quercetina (figura 19B) con un DS:-6.55 y una EA: -32.45, se observan también dos interacciones polares de tipo puente de hidrógeno con los aminoácidos Lys 467, Glu 371, Trp 114, Asn 359 y sus grupos hidroxilo, adicionalmente en la quercetina se presenta un acoplamiento tipo π - π con Phe 472. La naringenina (figura 19C) con un DS: -5.16 y una EA: -24.91, presenta cuatro interacciones polares de tipo puente de hidrógeno dos interacciones con la Asn 359 una con su grupo hidroxilo y otra con su grupo carbonilo, Glu 371 y

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Gln 469 interaccionan con otro de sus grupos hidroxilo, también presentó un acoplamiento tipo π - π con el aminoácido Phe 472.

Figura 19.

Posiciones de acoplamiento de las moléculas con posible actividad acaricida para la acetilcolinesterasa (AChE) en *R. microplus*. A. Ac. gálico B. Quercetina C. Naringenina y el compuesto de referencia D. etión.



NOTA: Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, gris; oxígeno, rojo; nitrógeno; azul, azufre; amarillo, fósforo; naranja, los carbonos del etión se presentan en celeste). Las interacciones proteína-ligando se representan mediante líneas discontinuas: las interacciones tipo puente de hidrógeno se colorean en amarillo y en azul las interacciones tipo π - π . Imágenes realizadas por la autora de trabajo en el software Pymol.

Los resultados obtenidos del análisis *in silico* muestran una interacción espontánea entre las subunidades proteicas evaluadas y los metabolitos: carvacrol, quercetina, ácido gálico, naringenina, linalool, eugenol y citral. Además, se encontraron interacciones semejantes entre

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

estos metabolitos y las moléculas de referencia para cada complejo respiratorio (Tabla 8) y el etión (control usado también en la validación *in vivo*). Es importante recordar que el etión es un inhibidor reportado para la AchE, sin embargo, al comparar sus interacciones con las subunidades de los cuatro complejos respiratorios, se encontraron similitudes en las interacciones con algunos metabolitos. Como se puede observar en la tabla 8, los aminoácidos que interaccionan con las moléculas de referencia también interaccionan con algunos metabolitos evaluados, por lo que se espera que tengan un comportamiento semejante al del etión y el dimetilmalonato sobre *R. microplus*.

Tabla 8.

Interacciones semejantes para los mejores metabolitos y los compuestos de referencia.

<i>Subunidad</i>	<i>Metabolito</i>	<i>Compuesto de referencia</i>	<i>Tipo de interacción</i>	<i>(Aa) de interacción</i>
Subunidad de Fe-S, complejo II	Naringenina	Dimetilmalonato	Puente de hidrógeno	Phe 146
	Quercetina	Etión	Puente de hidrógeno	Tyr 199
Subunidad Rieske complejo III,	Carvacrol	Etión	Puente de hidrógeno	Met 148
	Naringenina	Etión	Puente de hidrógeno	Met 148
AchE	Quercetina	Etión	Puente de hidrógeno	Lys 167

En resumen, para los resultados de la fase *in silico*, se partió de una base de datos de 300 metabolitos de plantas y se realizó el análisis computacional usando varios modos de precisión

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

para el acoplamiento proteína-ligando, de dónde se obtuvieron aproximadamente 50 metabolitos con mejores puntajes de energías y docking score para las subunidades proteicas mitocondriales de interés y la AchE. A esos 50 metabolitos se le analizaron las propiedades ADME y reglas de lipinski, de dónde se obtuvieron finalmente siete metabolitos que cumplían todos los parámetros mencionados y no excedían el factor costo planteado a priori como premisa de selección de moléculas en este proyecto (100 dólares x 10 g de compuesto).

Los siete metabolitos elegidos para continuar la fase *in vivo* fueron: Ácido gálico, quercetina, naringenina, carvacrol, linalool, eugenol y citral.

A continuación, se muestran los resultados de la fase *in vivo* para los dos métodos usados en la evaluación de la actividad acaricida sobre larvas de *R. microplus*.

5. Resultados fase *in vivo*

En esta sección se explican los resultados obtenidos mediante los ensayos acaricidas que se llevaron a cabo por medio de dos métodos: paquete larval e inmersión larval.

5.1 Resultados de paquete larval

A continuación, se muestran los resultados obtenidos por el método de paquete larval para los siete metabolitos, de igual manera, con la evaluación de las concentraciones diagnósticas 100, 365 y 1000 ppm.

Figura 20.

Porcentaje de mortalidad con: A) quercetina B) carvacrol. Letras diferentes (a,b,c,d) son significativamente diferentes respecto al control negativo con $p \leq 0,05$

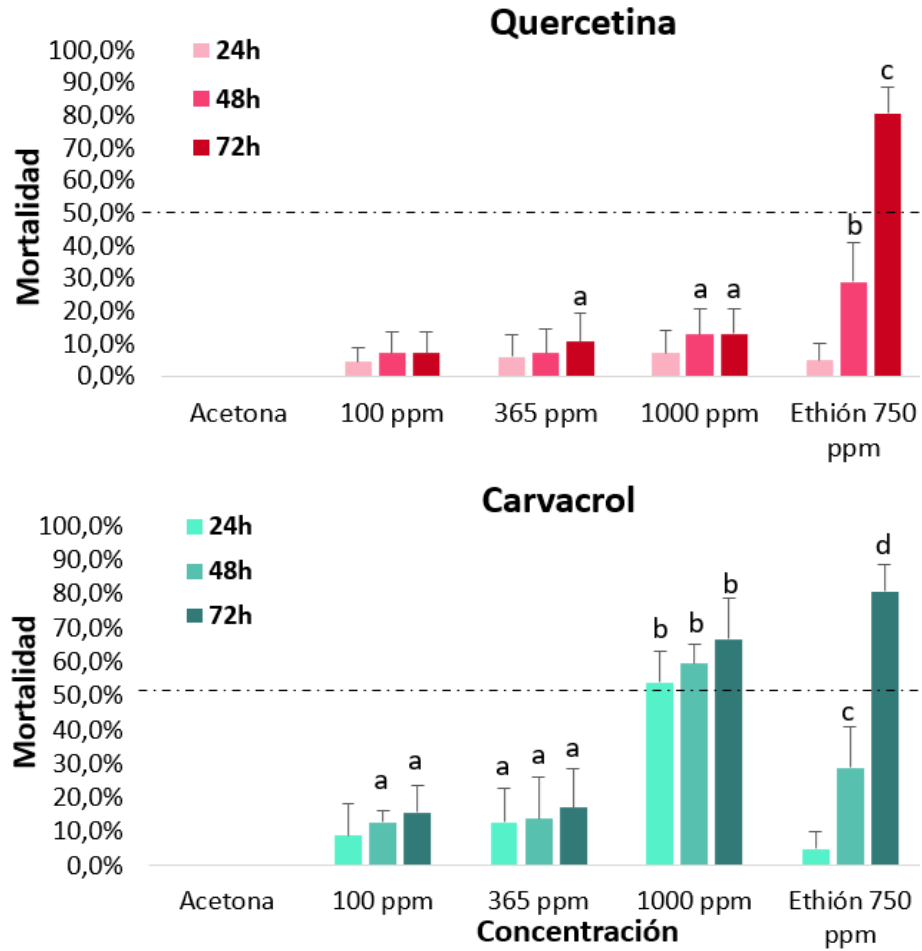


Figura 21.

Porcentaje de mortalidad con: A) Linalool B) Eugenol. Letras diferentes (a,b,c) son significativamente diferentes respecto al control negativo con $p \leq 0,05$

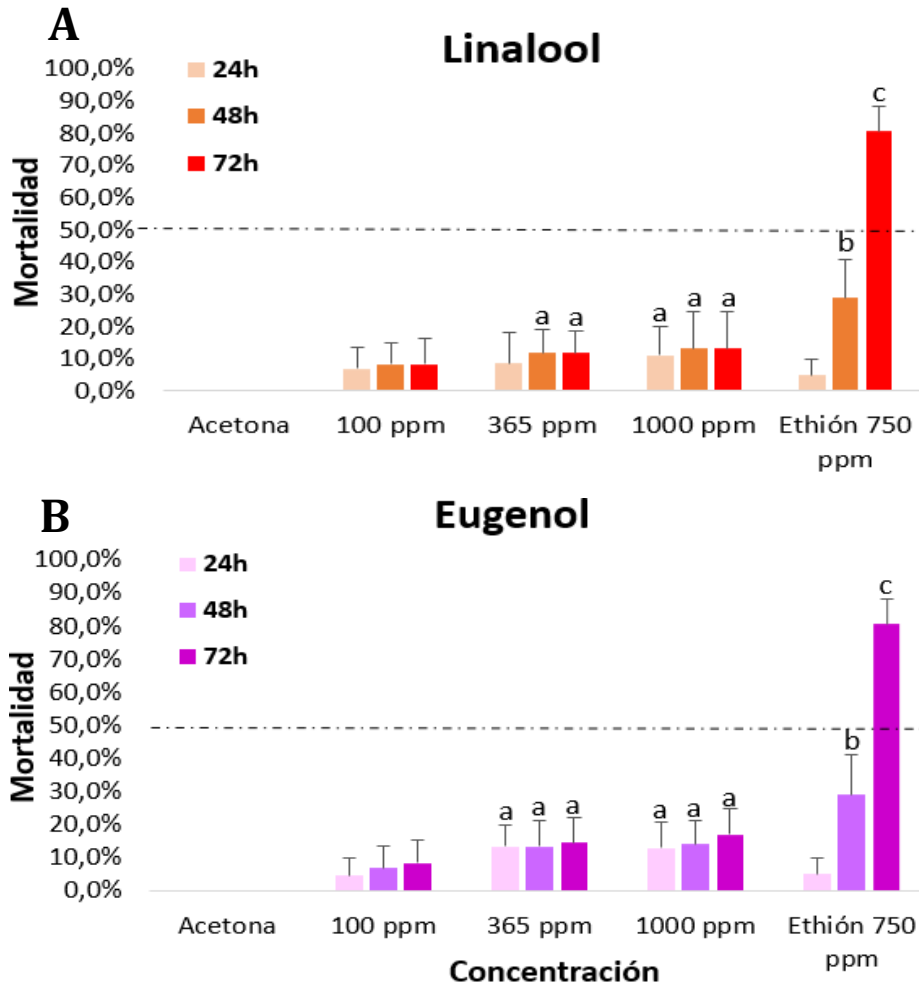
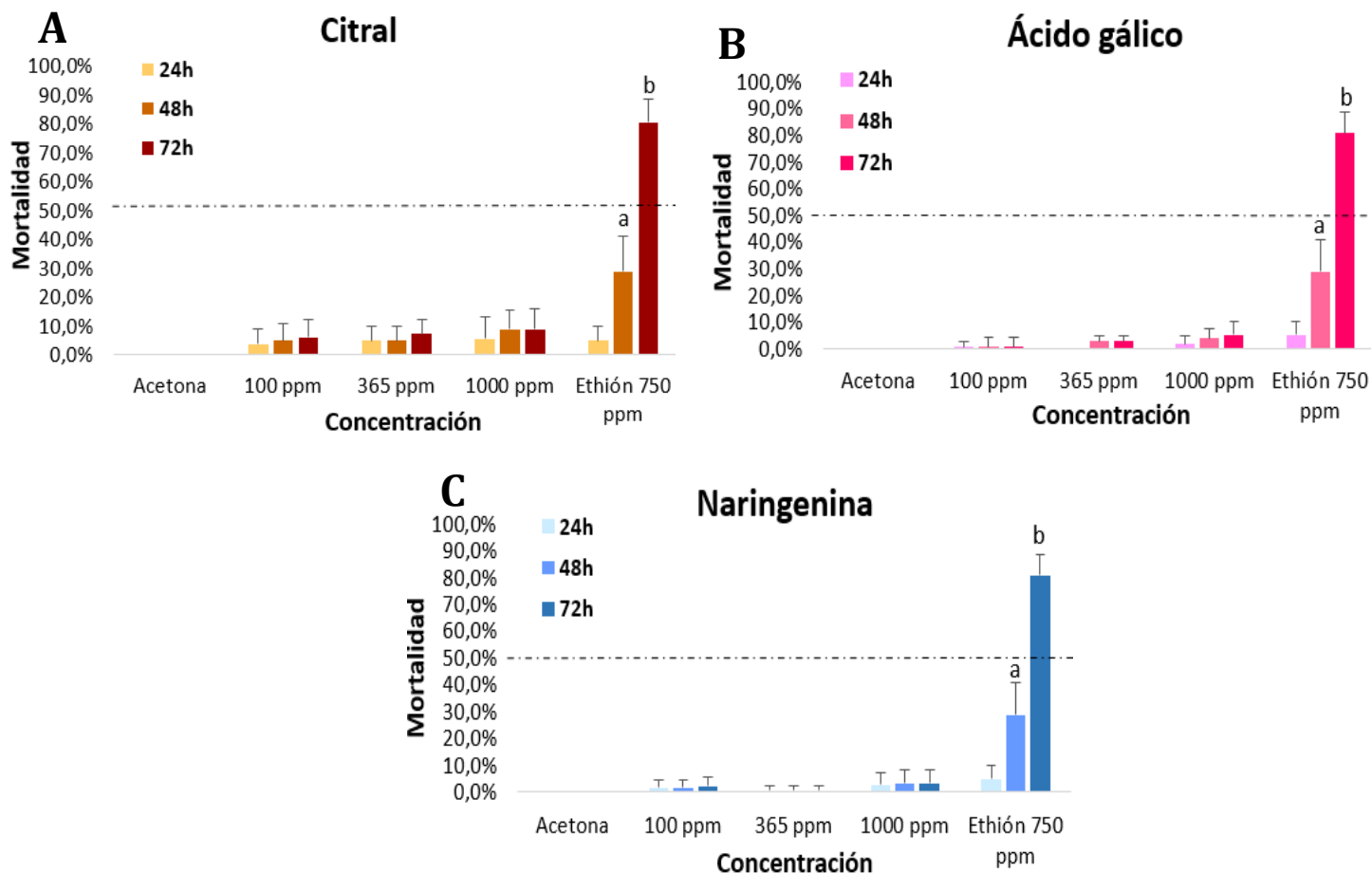


Figura 22.

Porcentaje de mortalidad con: A) Citral B) Ácido gálico C) Naringenina. Letras diferentes (a,b) son significativamente diferentes respecto al control negativo con $p \leq 0,05$



Para las concentraciones diagnósticas de 100, 365 y 1000 ppm se obtuvieron porcentajes de mortalidad entre 0 y 66,7% para los siete metabolitos. Los compuestos quercetina, linalool, eugenol, citral, ácido gálico y naringenina mostraron porcentajes de mortalidad por debajo de 20% para la concentración más alta (1000 ppm) después de 72 horas. La quercetina con un porcentaje de 13,1% (figura 20A), linalool 11,1% (figura 21A), eugenol 16,9% (figura 21B), citral 8,9% (figura 22A), ácido gálico 5% (figura 22B) y naringenina 3,3% (figura 22C), por lo que fueron descartados para su posterior evaluación de concentraciones múltiples. Sin embargo, el carvacrol

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

(figura 20B) si presentó un porcentaje de mortalidad mayor que 50% desde las 24 horas para la concentración de 1000 ppm, alcanzando su máximo porcentaje de mortalidad (66,7%) a las 72 horas, mostrando, además, diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo desde la concentración de 100 ppm a 24 horas. Es importante resaltar que el carvacrol mostró mayor porcentaje de mortalidad que el etión a las 24 y 48 horas para la concentración de 1000 ppm, lo que le aporta al carvacrol ventaja de actividad acaricida frente a una molécula sintética.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad de los ácaros expuestos al carvacrol, observándose un efecto notable únicamente a la concentración de 1000 ppm a 24 horas. En este caso, la mortalidad presentada fue considerablemente mayor que la del control positivo, como se detalla en la Tabla 9. Para los demás metabolitos evaluados a la concentración más alta y tras un periodo de exposición de 72 horas, se evidenciaron diferencias significativas con respecto al control positivo, aunque estas condiciones presentaron tasas de mortalidad relativamente bajas. Por lo tanto, es posible concluir que la actividad acaricida del carvacrol es comparable a la observada en el control positivo, lo que sugiere su potencial como agente acaricida en condiciones establecidas.

Tabla 9.

Datos de mortalidad obtenidos para cada metabolito por el método de paquete larval.

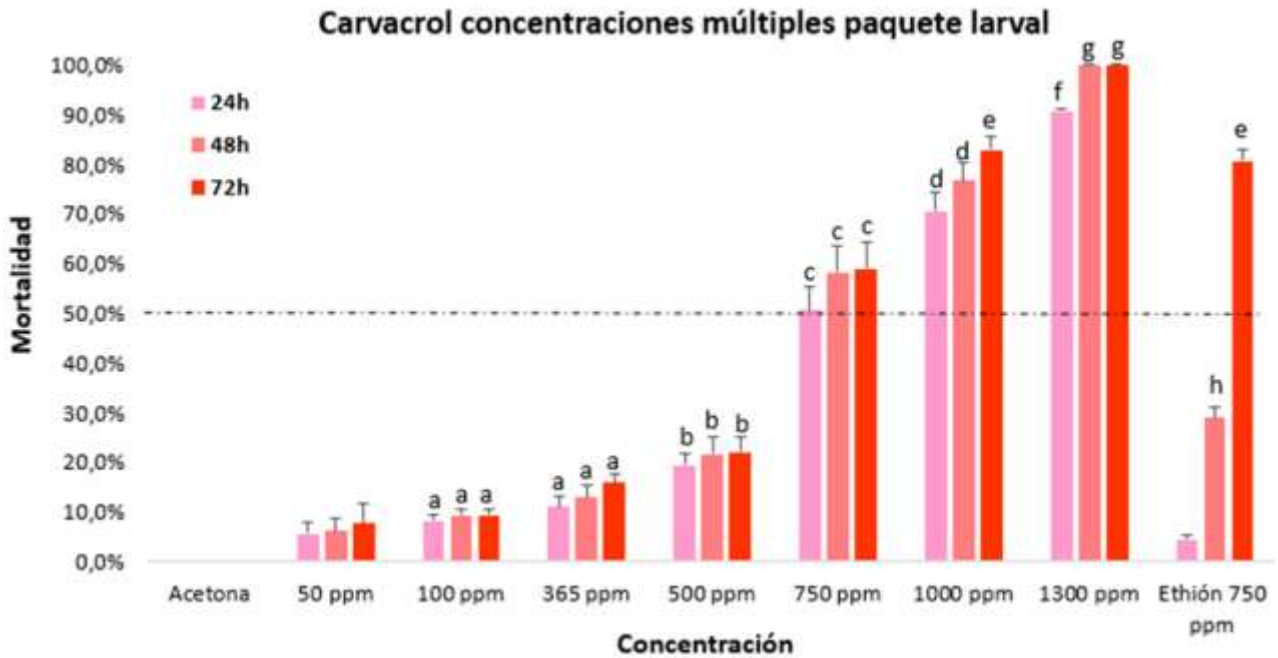
**Diferencias estadísticamente significativas respecto al control positivo con $p \leq 0,05$.*

		Moléculas evaluadas por el método de paquete larval								
	Concentración	Tiempo de lectura	Quercetina	Carvacrol	Linalool	Eugenol	Citral	Ácido gálico	Naringina	Etión 750 ppm
% Mortalidad \pm desviación estándar	100 ppm	24h	4,4 \pm 0,7	8,9 \pm 3,3	8,9 \pm 1,3	4,4 \pm 0,9	3,9 \pm 0,7	0,6 \pm 0,3	0,6 \pm 0,3	5,0 \pm 0,8
	365 ppm		6,1 \pm 1,0	12,8 \pm 1,5	9,4 \pm 1,7	13,3 \pm 2,4	5,0 \pm 1,3	0,0 \pm 0,0	1,7 \pm 0,5	
	1000 ppm		7,2 \pm 1,3	53,9 \pm 3,8 *	10,0 \pm 1,4	12,8 \pm 1,5	5,6 \pm 1,1	1,7 \pm 0,5	2,8 \pm 0,7	
	100 ppm	48h	7,2 \pm 1,0	12,8 \pm 4,0	9,4 \pm 1,8	6,7 \pm 1,2*	5,0 \pm 1,0 *	0,6 \pm 0,5 *	0,6 \pm 0,3 *	28,9 \pm 2,3
	365 ppm		7,2 \pm 1,1	13,9 \pm 2,0	10,0 \pm 1,5	13,3 \pm 2,6	5,0 \pm 1,3 *	2,8 \pm 0,3 *	1,7 \pm 0,5 *	
	1000 ppm		12,8 \pm 1,3	59,4 \pm 4,7	10,0 \pm 1,4	13,9 \pm 1,5	8,9 \pm 1,6	3,9 \pm 0,5 *	3,3 \pm 0,8 *	
	100 ppm	72h	7,2 \pm 1,0 *	15,6 \pm 3,9*	10,0 \pm 1,7 *	8,3 \pm 1,4 *	6,1 \pm 1,1*	0,6 \pm 0,5 *	2,2 \pm 0,5 *	80,6 \pm 2,4
	365 ppm		10,6 \pm 1,3 *	17,2 \pm 1,9	10,6 \pm 1,6 *	14,4 \pm 2,4 *	7,2 \pm 1,2 *	2,8 \pm 0,3 *	0,6 \pm 0,3 *	
	1000 ppm		13,1 \pm 1,1*	66,7 \pm 4,6	11,1 \pm 1,6 *	16,9 \pm 1,6 *	8,9 \pm 1,6 *	5,0 \pm 0,8 *	3,3 \pm 0,8 *	

Como el carvacrol tuvo el porcentaje de mortalidad más alto entre los siete metabolitos evaluados y presentó diferencias significativas notables por el método de paquete larval para las concentraciones diagnósticas, se evaluaron las concentraciones múltiples, obteniendo los resultados mostrados en la figura 23.

Figura 23.

Porcentaje de mortalidad para el ensayo de paquete larval con carvacrol a siete concentraciones diferentes. Se realizaron tres ensayos independientes por cuadruplicado. Letras diferentes (a,b,c,d,e,f,g,h) son significativamente diferentes respecto al control negativo con $p \leq 0,05$



Se observan diferencias significativas respecto al control desde la concentración de 365 ppm a 72 horas y desde 500 ppm en adelante hasta las concentraciones de 1300 ppm a 24, 48 y 72 horas (Figura 23). Luego de realizar el análisis probit de los datos de mortalidad para las concentraciones múltiples del carvacrol, se obtuvieron los siguientes datos para concentraciones letales CL_{50} , CL_{95} y CL_{99} :

Tabla 10.

Datos para concentraciones letales a 24, 48 y 72 horas para el carvacrol por paquete larval. Los intervalos de confianza se muestran entre corchetes.

	Concentración Letal Carvacrol (paquete larval)		
	24h	48h	72h
CL₅₀ ppm	755,5 [715,8-802,3]	699,7 [666,3-736,8]	682,6 [579,8-826,3]
CL₉₅ppm	1749,9 [1528,5-2093,6]	1513,6 [1353,0-1749,6]	1380,0 [1054,8-2627,5]
CL₉₉ ppm	2478,3 [2074,2-3143,5]	2083,8 [1796,6-2528,3]	1847,2 [1302,5-4403,0]
χ^2	0,4	1,0	4,9
SLOPE	4,5	4,9	5,3

Los valores de chi- cuadrado (χ^2) indican una distribución homogénea entre los datos de mortalidad para las concentraciones múltiples por el test de paquete larval. Los valores SLOPE también se encuentran dentro de los rangos estadísticamente aceptados (entre 2 y 5) para la desviación de la pendiente en la regresión ajustada del modelo Probit (Tabla 10) (Pum, 2019).

5.2 Resultados inmersión larval

A continuación, se muestran los resultados obtenidos por el método de inmersión larval para los siete metabolitos, de igual manera, se trabajaron las concentraciones diagnósticas 100, 365 y 1000 ppm.

Figura 24.

Porcentaje de mortalidad con: A) quercetina B) carvacrol. Letras diferentes (a,b,c,d,e) son significativamente diferentes respecto al control negativo con $p \leq 0,05$

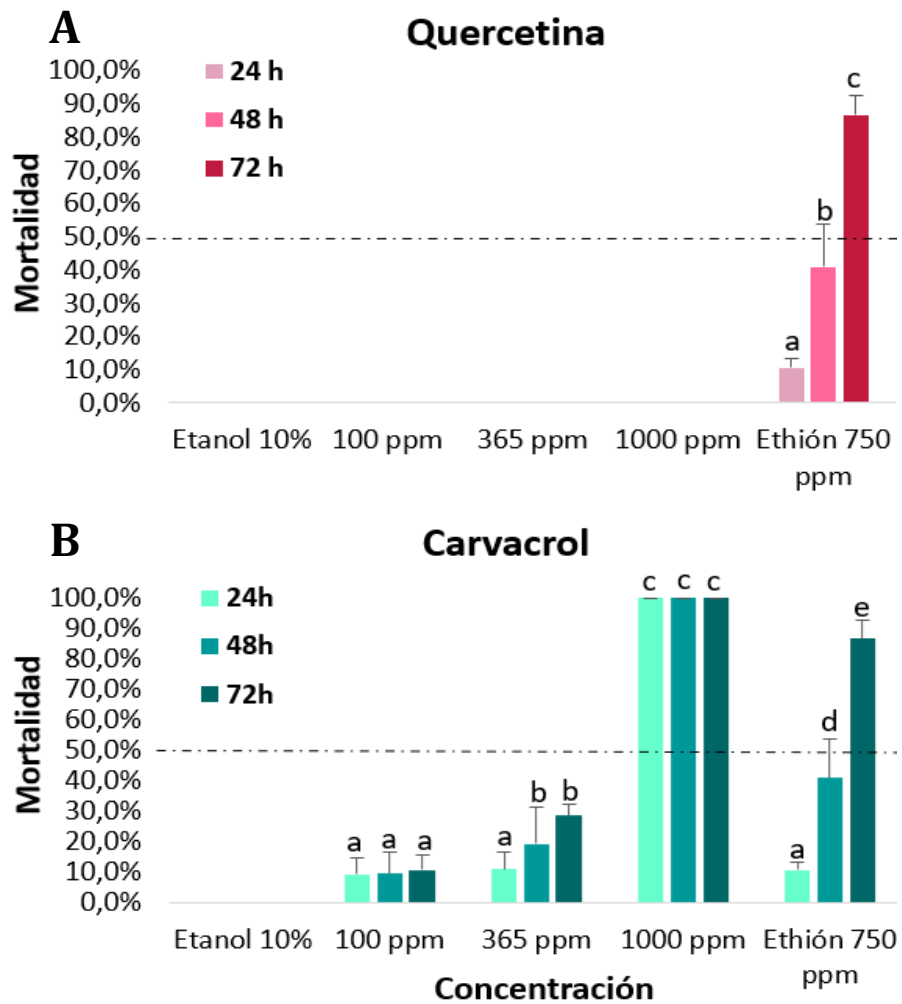


Figura 25.

Porcentaje de mortalidad con: A) linalool B) eugenol. Letras diferentes (a,b,c,d,e) son significativamente diferentes respecto al control negativo con $p \leq 0,05$

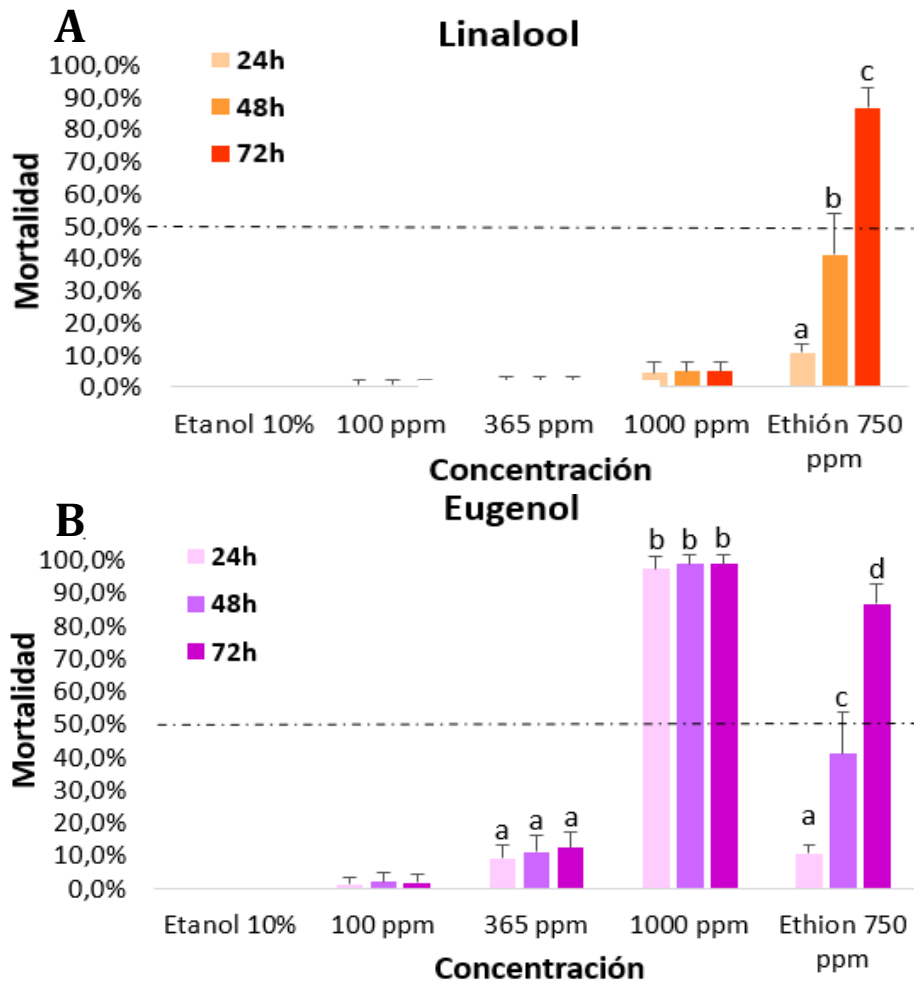
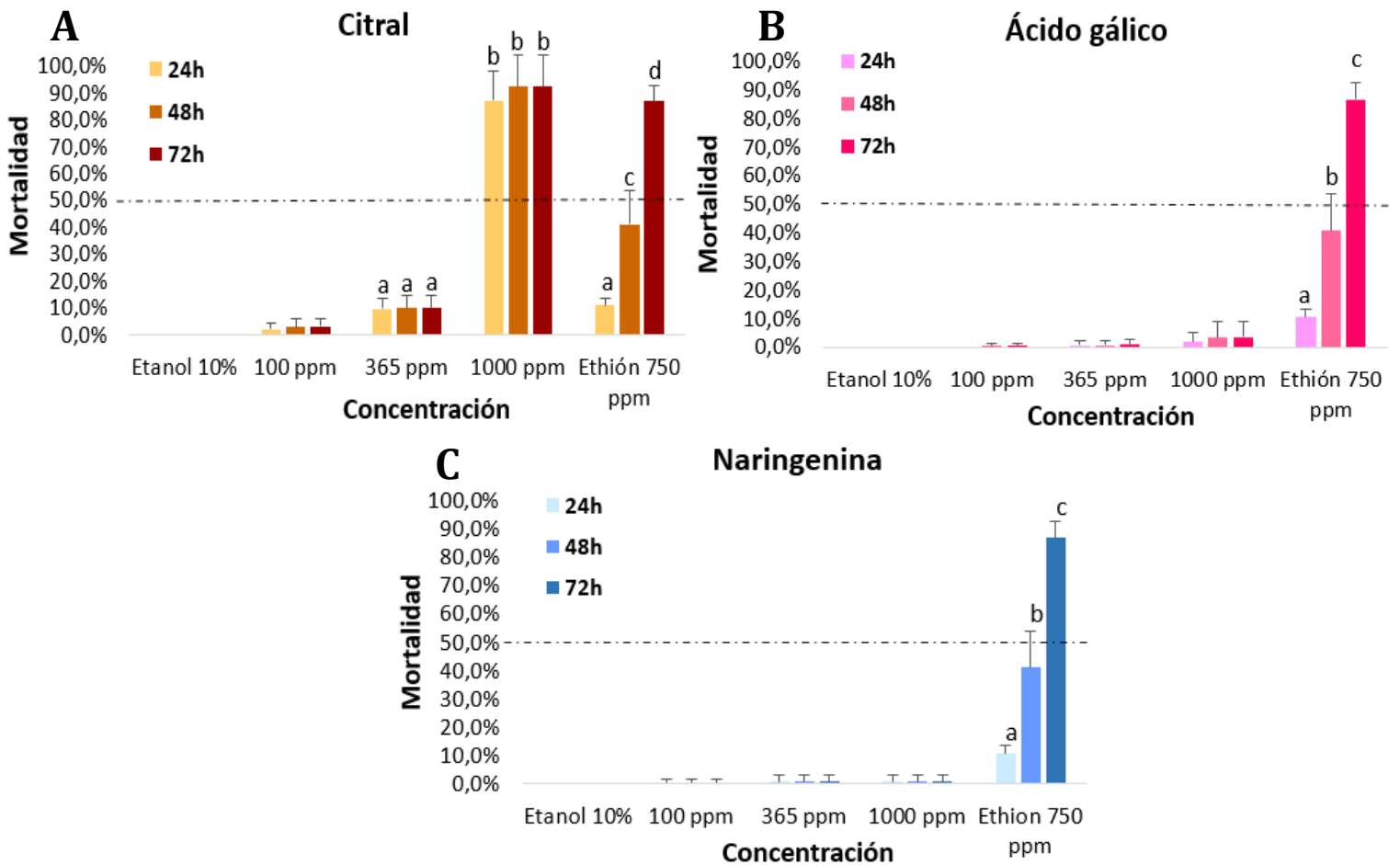


Figura 26.

Porcentaje de mortalidad para el ensayo de inmersión larval con A) citral B) ácido gálico C) naringenina, a tres concentraciones diferentes. Se realizaron tres ensayos independientes por cuadruplicado. *Diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo con $p \leq 0,05$.



En cuanto a la evaluación de concentraciones diagnósticas 100, 365 y 1000 ppm para el método de inmersión larval, se observaron porcentajes de mortalidad entre 0 y 100% para los siete metabolitos. Para los compuestos quercetina, linalool, ácido gálico y naringenina se obtuvieron

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

porcentajes de mortalidad por debajo de 10% para la concentración más alta (1000 ppm) después de 72 horas de exposición. La quercetina con un porcentaje de 0% (figura 24A), linalool 5% (figura 25A), ácido gálico 3,7% (figura 26B) y naringenina 0,7% (figura 26C), por tanto, estos 4 metabolitos fueron descartados para evaluar concentraciones múltiples. No obstante, los metabolitos carvacrol, eugenol y citral mostraron porcentajes de mortalidad superiores al 90% en la concentración más alta evaluada, es decir, 1000 ppm, mostrando diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control negativo. Específicamente, el carvacrol (figura 24B) alcanzó una mortalidad del 100% desde las primeras 24 horas de observación. Por otro lado, el eugenol (figura 25B) presentó una mortalidad del 98,7%, mientras que el citral (figura 26A) mostró un porcentaje de mortalidad del 92,3%, ambos a partir de las 48 horas de lectura.

También se observaron diferencias estadísticas para la quercetina, linalool, ácido gálico y naringenina respecto al etión en todas las concentraciones diagnósticas, pues sus porcentajes fueron menores que las del blanco positivo (Tabla 11). Para el carvacrol se evidenciaron diferencias a la concentración más alta a 24 y 48 horas debido a que su porcentaje de mortalidad fue mucho mayor que el del etión. El eugenol y citral mostraron mortalidades más altas que el etión a la concentración de 1000 ppm a 24 y 48 horas, evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre estos valores. Por lo tanto, se puede concluir que la actividad acaricida exhibida por los tres metabolitos analizados es comparable a la observada en el control positivo. Esta similitud sugiere que estos compuestos podrían ser considerados como alternativas efectivas en el control de ácaros.

Tabla 11.

Datos de mortalidad obtenidos para cada metabolito por el método de inmersión larval

**Diferencias estadísticamente significativas respecto al control positivo con ($p \leq 0,05$)*

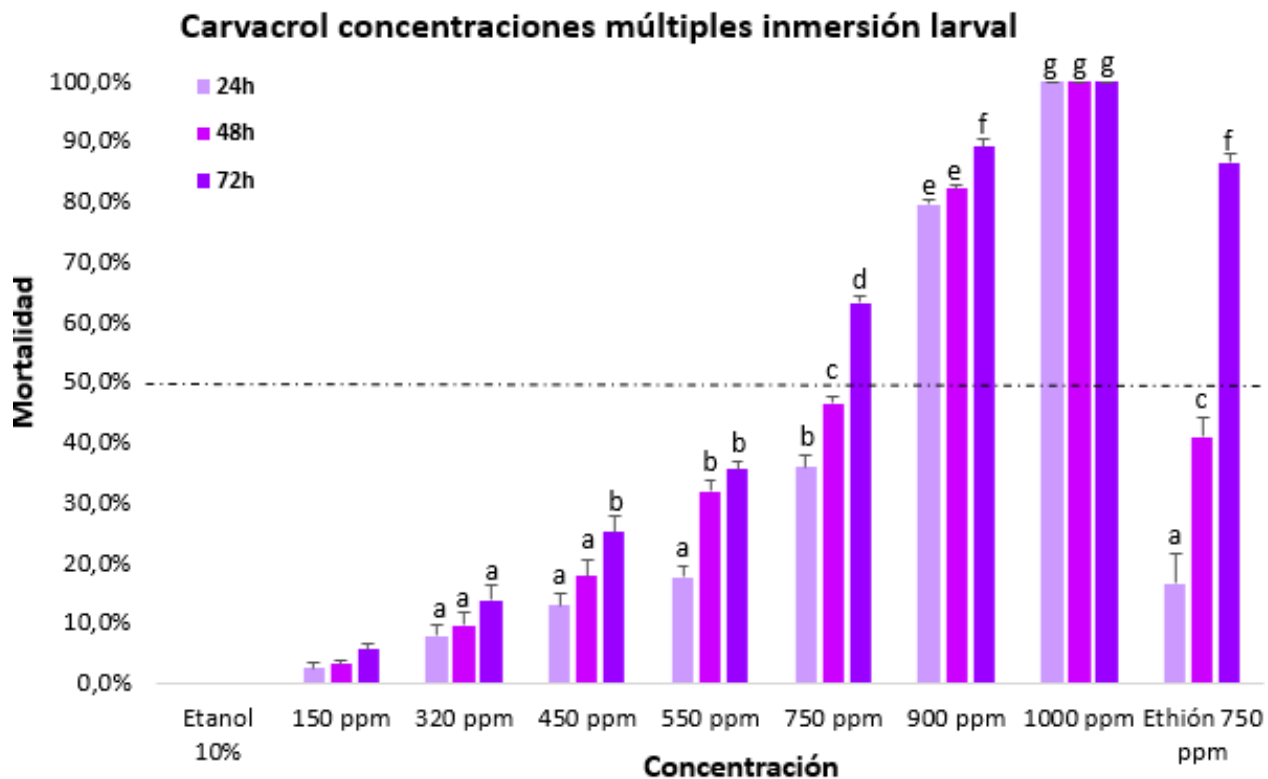
		Moléculas evaluadas por el método de inmersión larval								
% Mortalidad \pm desviación estándar	Concentración	Tiempo de lectura	Quercetina	Carvacrol	Linalool	Eugenol	Citral	Ácido gálico	Naringina	Etión 750 ppm
	100 ppm	24h	0,0 \pm 0,0 *	9,3 \pm 5,6	0,7 \pm 1,6 *	1,3 \pm 2,0 *	1,7 \pm 2,7 *	0,0 \pm 0,0 *	0,3 \pm 1,2 *	
	365 ppm		0,0 \pm 0,0 *	11,0 \pm 5,6	1,3 \pm 2,0 *	9,0 \pm 4,2	9,3 \pm 3,9	0,7 \pm 1,6 *	0,7 \pm 2,3 *	10,7 \pm 2,6
	1000 ppm		0,0 \pm 0,0 *	100 \pm 0,0 *	4,3 \pm 3,6	97,3 \pm 3,9*	87,0 \pm 7,9 *	2,0 \pm 3,2	0,7 \pm 2,3 *	
	100 ppm	48h	0,0 \pm 0,0 *	9,7 \pm 6,7	0,7 \pm 1,6 *	2,0 \pm 2,7 *	2,7 \pm 3,1	0,3 \pm 1,2 *	0,3 \pm 1,2 *	
	365 ppm		0,0 \pm 0,0 *	19,3 \pm 12,0	1,3 \pm 2,0 *	11,0 \pm 5,0	9,7 \pm 4,7	0,7 \pm 1,6	0,7 \pm 2,3 *	41,0 \pm 12,7
	1000 ppm		0,0 \pm 0,0 *	100 \pm 0,0*	5,0 \pm 3,0	98,7 \pm 3,1*	92,3 \pm 11 *	3,3 \pm 5,6	0,7 \pm 2,3*	
	100 ppm	72h	0,0 \pm 0,0 *	10,7 \pm 5,2	0,7 \pm 1,6 *	1,7 \pm 2,7 *	3,0 \pm 3,0 *	0,3 \pm 1,2*	0,3 \pm 1,2 *	
	365 ppm		0,0 \pm 0,0 *	28,7 \pm 3,8	1,3 \pm 2,0 *	12,3 \pm 4,7	9,7 \pm 4,7	1,0 \pm 1,8 *	0,7 \pm 2,3 *	86,7 \pm 6,0
	1000 ppm		0,0 \pm 0,0 *	100 \pm 0,0	5,0 \pm 3,0*	98,7 \pm 3,1	92,3 \pm 11	3,7 \pm 5,5 *	0,7 \pm 2,3 *	

Por tanto, para validar al menos un metabolito en este trabajo de investigación, se evaluaron concentraciones múltiples para el carvacrol por el método de inmersión larval a las siguientes concentraciones: 150, 320, 450, 550, 750, 900 y 1000 ppm, con el fin de encontrar la CL₅₀ por este método.

Figura 27.

Porcentaje de mortalidad para el ensayo de inmersión larval con carvacrol+etanol 10% a siete concentraciones diferentes. Se realizaron tres ensayos independientes por cuadruplicado.

**Diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo con $p \leq 0,05$.*



Como se observa en la figura 27, existen diferencias estadísticamente significativas desde la concentración de 320 ppm a las 72 horas y en adelante se observan diferencias significativas para el resto de concentraciones evaluadas a 24, 48 y 72 horas de lectura. Luego de realizar el análisis probit de los datos de mortalidad para las concentraciones múltiples del carvacrol, se obtuvieron los siguientes datos para concentraciones letales CL₅₀, CL₉₅ y CL₉₉:

Tabla 12.

Datos para concentraciones letales a 24, 48 y 72 horas para el carvacrol por inmersión larval.

Los intervalos de confianza se muestran entre corchetes.

Concentración Letal Carvacrol (inmersión larval)			
	24h	48h	72h
CL₅₀ ppm	717,9 [715,8-802,3]	633,1 [611,8-656,0]	570,0 [529,7-613,6]
CL₉₅ppm	1541,7 [1528,5-2093,6]	1398,8 [128,8-1550,0]	1421,1 [1199,7-1824,8]
CL₉₉ ppm	2116,0 [2074,2-3143,5]	1942,7 [1734,4-2229,8]	2074,8 [1648,3-2927,3]
χ^2	4,9	2,7	4,0
SLOPE	4,9	4,7	4,1

Los valores de chi- cuadrado (χ^2) indican una distribución homogénea entre los datos de mortalidad para las concentraciones múltiples por el test de inmersión larval. Los valores SLOPE también se encuentran dentro de los rangos estadísticamente aceptados (entre 2 y 5) para la desviación de la pendiente en la regresión ajustada del modelo Probit (Tabla 12). Por lo cual se puede decir que los valores para la CL₅₀ son estadísticamente significativos y confiables (Pum, 2019).

6. Discusión de resultados

En este trabajo de investigación se estudió la relación entre el uso de técnicas de análisis computacional como filtro inicial o screening para la selección de posibles moléculas con actividad acaricida frente a dianas farmacológicas de interés en la especie de garrapata *R. microplus*. Esto permitió discriminar de una base inicial de trescientos metabolitos, a siete que pasaron al análisis *in vivo*, dónde tres de ellos fueron promisorios y uno (carvacrol) se logró validar también *in vitro*

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

en otro trabajo de investigación titulado "Evaluación del mecanismo de acción de compuestos de origen natural con acción ixodicida sobre la acetilcolinesterasa y el metabolismo bioenergético mitocondrial de *Rhipicephalus microplus*" por el estudiante Andrés Cabezas (Cabezas et al., 2024). Esto permitió identificar metabolitos con posible actividad acaricida y respuesta en las dianas farmacológicas de interés, disminuyendo tiempo de análisis en laboratorio, uso de reactivos, material de laboratorio y personal en pruebas con un número grande de metabolitos.

Por otro lado, se ha documentado el uso de AlphaFold y diversas herramientas computacionales en múltiples estudios relacionados con la especie de garrapata *Rhipicephalus microplus*. Por ejemplo, Lima y colaboradores (2020) llevaron a cabo un análisis de acoplamiento molecular para investigar la interacción entre los alcaloides de *Prosopis julifloraprosopina*, una especie de planta leguminosa, y la enzima acetilcolinesterasa (AChE) de *R. microplus*. Los resultados mostraron que interacciones significativas para tres metabolitos: juliprosinina, que forma puentes de hidrógeno con los residuos Ser 303, Gly 305, Ser 202 y Gly 141); juliprosopina que establece puentes de hidrógeno con Ser 222 e His 460, además de interacciones π -cation con Tyr 144 y Trp 103; y prosopina, que interacciona mediante puentes de hidrógeno con Tyr 144, Ser 222, His 460 y Glu 300, así como un π -cation en Trp 103. Además, corroboraron la actividad acaricida del extracto metanólico puro (ME) y una fracción rica en alcaloides (FA) de *Prosopis julifloraprosopina* en ensayos *in vivo*, obteniendo una CL₅₀ de 31600 ppm para la FA y 121000 ppm para el ME por el método de inmersión de adultas. Es de anotar que también se evaluó el FA por el método de inmersión larval, encontrando una CL₅₀ de 13800 ppm.

En otro estudio reportado por Bustos y col (2024) se identificaron posibles inhibidores de la acetilcolinesterasa en *R. microplus* usando un modelo predicho por Alphafold y metabolitos del extracto de semillas de *R. aculeata*, encontrando que la rutina, el ácido clorogénico, la quercetina

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

y la epicatequina mostraron interacciones notables con aminoácidos de la AchE. Las interacciones específicamente fueron, para la rutina formación de puentes de hidrógeno con los aminoácidos Tyr 178, Asn 336 e His 494, así como interacción de tipo π -catión con Val 123; el ácido clorogénico estableció puentes de hidrógeno con Gly 175, Gly 176 y Tyr 178, e interacciones π -catión con Phe 385, Trp 384 y Val 498; la quercetina formó puentes de hidrógeno con Gly 339, Val 340 y Asp 342, y finalmente, la epicatequina que estableció puentes de hidrógeno con Val 340 y Glu 334. Cabe mencionar que Bustos y col (2024) realizaron ensayos *in vivo* en garrapatas adultas ingurgitadas de *R. microplus* utilizando extractos de semillas de *R. aculeata*. Sin embargo, no es posible concluir que el efecto acaricida se deba a uno o dos metabolitos que mostraron interacciones *in silico*. Entre los metabolitos reportados por Bustos y colaboradores, se encuentra la quercetina, no obstante, en comparación con los resultados obtenidos en nuestro proyecto de investigación, este compuesto no mostró una alta mortalidad en ensayos *in vivo* realizados con larvas. Esto sugiere que la quercetina podría permear más eficazmente la cutícula de garrapatas adultas que en larvas.

Un estudio reportado por Arrieta y col. (2013) observó, por microscopía óptica, que para la especie de garrapata *Ornithodoros erraticus* la cutícula de las larvas es mucho más rugosa y posee una red densa, mientras que, en garrapatas adultas ingurgitadas, la cutícula se presenta más lisa, hinchada y flexible. Esta diferencia estructural sugiere que la penetración de compuestos en la cutícula es más factible en las garrapatas adultas ingurgitadas que en las larvas. Así, se puede decir que los cambios en la estructura cuticular para los diferentes estadios de la garrapata, puede arrojar valores diferentes de mortalidad para un metabolito en específico.

Por tanto, los estudios mencionados anteriormente respaldan en cierto modo la utilidad del acoplamiento molecular y del software Alphafold en la identificación promisoriosa de moléculas

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

naturales. Sin embargo, es importante recordar que los métodos computacionales son métodos aproximados, por lo que es de crucial importancia realizar la validación de dichos resultados en ensayos de laboratorio o campo. En nuestro proyecto de investigación, la validación se hizo *in vivo* en condiciones de laboratorio, en donde se estudió el modo de acción de los metabolitos secundarios. El primer método utilizado fue el paquete larval, que se basa en el desplazamiento de las larvas sobre una superficie impregnada con el ixodicida. El segundo método consiste en la inmersión de las larvas en una solución ixodicida durante un tiempo determinado. Este último enfoque demostró un aumento en la mortalidad en comparación con los ensayos de paquete de larvas para los metabolitos carvacrol, el eugenol y el citral. De manera semejante, un estudio reportado por Agudelo y col. (2021) evidenció un mayor porcentaje de mortalidad por el método de inmersión larval que por el método de paquete larval, al aplicar una suspensión fúngica de *Metarhizium anisopliae* sobre *R. microplus*. En dicho estudio, se argumenta que por inmersión existe un mayor contacto entre los hongos y el cuerpo larval de la garrapata, ya que las larvas se sumergen completamente en la solución, mientras que en el paquete larval solo algunas partes de las larvas están en contacto con el ixodicida. A partir de esta observación, se puede inferir que el aumento de mortalidad para los tres metabolitos mencionados en nuestra investigación puede deberse a que la exposición de los metabolitos por el método de inmersión larval es más directa y controlada en comparación con el paquete larval, donde las larvas solo exponen partes como las patas y abdomen, al contacto con el ixodicida.

Es importante mencionar que el carvacrol ha sido reportado por otros autores en varias especies de garrapatas. Novato y col. (2015), estudiaron larvas de *Amblyomma sculptum* y *Dermacentor nitens* (ambas especies pertenecientes a la familia de garrapatas duras), donde obtuvieron valores de CL₅₀ para el carvacrol de 3490 ppm y 3330 ppm, respectivamente, por el

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

método de paquete larval. Por otro lado, Navarro y col (2018) también reportaron valores de CL_{50} de 830 ppm para el carvacrol por el método de paquete larval, en larvas de *R. microplus*. Tavares (2022) también estudió el efecto del carvacrol sobre dos cepas de la especie *R. microplus* por el método de inmersión larval, para la cepa resistente a seis clases de acaricidas sintéticos reporta una CL_{50} de 1760 ppm y para la cepa susceptible a acaricidas sintéticos reporta una CL_{50} de 1420 ppm. En comparación con los estudios mencionados anteriormente, para este estudio de investigación se obtuvieron valores de CL_{50} más bajas (683 ppm por paquete larval y 570 ppm por inmersión larval a 72 horas de lectura), lo cual es un aporte significativo porque permite reducir la cantidad de metabolito usado en un posible ixodicida desarrollado a largo plazo a partir de carvacrol, donde se reduce también su costo, haciéndolo competitivo con los acaricidas comerciales.

Es de anotar que, las lecturas de mortalidad en todos los estudios mencionados anteriormente se realizan solamente a 24 horas. Sin embargo, en nuestro proyecto de investigación las lecturas se llevan hasta las 72 horas con el fin de observar un aumento en el porcentaje de mortalidad de los metabolitos y poder compararlos con moléculas sintéticas de uso común. Por ejemplo, en un estudio reportado por Cedeño & Jaramillo (2023) se observó que el etión presentó un mayor porcentaje de mortalidad que el extracto de piñón 24 horas después de su aplicación sobre *R. microplus*. Sin embargo, a 72 horas de lectura, el porcentaje de mortalidad del extracto de piñón aumentó significativamente en relación con los valores registrados para 24 y 48 horas. En contraste, el etión mostró un incremento leve en su porcentaje de mortalidad durante el mismo periodo. Por lo que se puede inferir que el efecto acaricida del etión es más rápido por su acción sobre el sistema nervioso de las garrapatas, en comparación con las moléculas naturales, las cuales pueden tener un tiempo de acción más prolongado. En ese orden de ideas, es posible afirmar que el tiempo de lectura es una variable importante, que permite obtener resultados más precisos. Así

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

mismo, es probable que las concentraciones letales medias (CL₅₀) reportadas para el carvacrol en los artículos mencionados anteriormente sean más elevadas en comparación con las obtenidas en este proyecto de investigación, debido a las diferencias en los tiempos de análisis. En este sentido, se puede afirmar que los resultados obtenidos en este estudio son relevantes y comparables con los de investigaciones similares reportadas hasta la fecha para la misma especie de garrapata.

Por otro lado, la quercetina, el ácido gálico, la naringenina y el linalool mostraron bajos porcentajes de mortalidad con los dos métodos evaluados, probablemente debido a que son menos lipofílicos que el resto de metabolitos (figura 28). Además, como lo reportan Silva y col. (2020) los artrópodos tienen un exoesqueleto compuesto por dos capas: la epicutícula formada principalmente por lípidos esterificados, y la procutícula, formada por proteínas y quitina, esto les confiere una estructura compleja y difícil de permear. Como el exoesqueleto de las garrapatas es principalmente lipídico, es más fácil para moléculas lipofílicas atravesarlo, además el tamaño de la molécula también es importante al atravesar el exoesqueleto, debido a que entre más pequeña sea más fácil es traspasarlo.

De esta manera, el carvacrol al contener un anillo aromático que le confiere carácter lipofílico, un solo grupo OH y ser una molécula relativamente pequeña, puede permear el exoesqueleto más fácilmente; el eugenol también tiene un anillo aromático y un grupo metoxilo lo que lo hace más lipofílico en comparación con el linalool. El citral es más lipofílico que el linalool porque su estructura es más lineal y posee mayor número de carbonos. En ese orden de ideas, el linalool puede atravesar la membrana más fácilmente que la naringenina porque la naringenina posee una estructura más compleja y además contiene tres grupos OH lo que le confiere menos carácter lipofílico. El ácido gálico tiene 4 grupos OH que le confieren una naturaleza hidrofílica, por tanto, no atraviesa el exoesqueleto fácilmente; la quercetina tiene la estructura más compleja

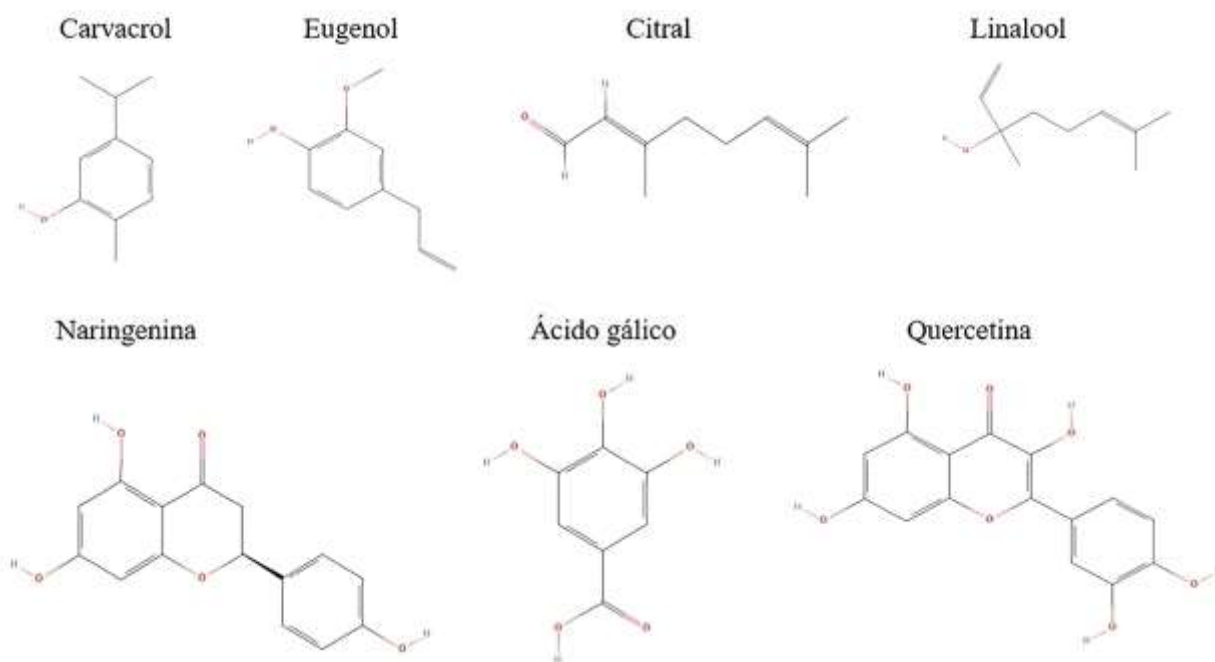
METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

entre los siete metabolitos, compuesta por 5 grupos OH, por lo cual es la molécula que atravesaría con mayor dificultad el exoesqueleto de la garrapata.

Finalmente, se proponen el eugenol y citral como dos metabolitos promisorios y posiblemente candidatos a un formulado junto con el carvacrol para tratar la infestación por *R. microplus*, dado el elevado porcentaje de mortalidad mostrado, estudios adicionales en los grupos de investigación GIBIM y CINTROP podrían proporcionar información valiosa sobre la eficacia y el potencial de estos compuestos en aplicaciones prácticas. Si bien, existen estudios que reportan actividad acaricida para el eugenol (Novato et al., 2018) y citral (Peixoto et al., 2015), sería interesante evaluarlos por concentraciones múltiples teniendo en cuenta las mismas metodologías y tiempos de lectura de nuestro proyecto, pues es posible que las CL₅₀ obtenidas para estos dos metabolitos también sean más bajas que las reportadas en la literatura. Además, como ya se mencionó anteriormente, el eugenol y citral son dos metabolitos que, por su estructura química, es probable que puedan penetrar con facilidad la cutícula de las garrapatas.

Figura 28.

Estructura química de los metabolitos probados en la fase in vivo. Tomadas de la Pubchem



7. Conclusiones

Mediante el uso de docking molecular y el análisis computacional se logró corroborar la hipótesis inicial de este trabajo de investigación, identificando siete metabolitos secundarios de extractos de plantas dentro de un grupo inicial de 300 compuestos. Donde, el carvacrol, la quercetina, la naringenina, el ácido gálico, el linalool, el eugenol y el citral presentaron interacciones principalmente de tipo polar y de tipo π - π con subunidades de los primeros cuatro complejos transportadores de electrones en la mitocondria y la AchE.

Las pruebas *in vivo* posibilitaron la validación de la actividad acaricida en tres metabolitos: carvacrol, eugenol y citral, los cuales mostraron porcentajes de mortalidad elevados en

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

comparación con el etión para la prueba de inmersión larval. Desde las primeras 24 horas se observaron porcentajes entre 87 a 100% para los tres metabolitos a una concentración de 1000 ppm. El carvacrol mostró mayor porcentaje de mortalidad en comparación con el etión en la prueba de paquete larval, siendo así: el carvacrol a 1000 ppm mostró una mortalidad mayor que el 50% desde las primeras 24 horas, mientras que el etión alcanzó una mortalidad mayor que el 50% solo hasta las 72 horas. Además, presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles negativos. Estos hallazgos sugieren que el carvacrol, eugenol y citral son moléculas con actividad acaricida y presentan una posible afectación a los complejos de la cadena respiratoria y la acetilcolinesterasa en *R. microplus*.

El control de las condiciones de humedad y temperatura 27-29 °C y 80-90%, respectivamente, así como el uso de larvas en rangos de edades entre 7 y 14 días, lograron asegurar reproducibilidad en los bioensayos.

8. Recomendaciones

1. Se recomienda realizar pruebas enzimáticas posteriores para los metabolitos eugenol y citral, con el fin de corroborar la respuesta sobre la mitocondria y/o la acetilcolinesterasa, de manera que determine su mecanismo de acción sobre *R. microplus*.
2. Se recomienda realizar los ensayos de concentraciones múltiples con el eugenol y el citral, para determinar los valores de CL₅₀. También es importante realizar estudios con mezclas sinérgicas de los 3 metabolitos que mostraron mayor mortalidad *in vivo*, con el fin de potenciar su actividad acaricida, evaluar estabilidad y prevenir el desarrollo de resistencia a los principios activos.

9. Divulgación de resultados

Los resultados de este trabajo de investigación fueron presentados en el V Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 y la XI Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis SLAMTB, 2023, con el título “Estudio *in silico* e *in vivo* de metabolitos secundarios de plantas con acción inhibitoria sobre proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa de *Rhipicephalus microplus*” y en la modalidad de póster (Anexo 2).

Referencias Bibliográficas

- Acevedo-Gutiérrez, L. Y., Paternina, L. E., Pérez-Pérez, J. C., Londoño, A. F., López, G., & Rodas, J. D. (2020). Garrapatas duras (Acari: Ixodidae) de Colombia, una revisión a su conocimiento en el país. *Acta biológica colombiana*, 25(1), 126-139.
- Adames, M., Fernández-Ruvalcaba, M., Peña-Chora, G., & Hernández-Velázquez, V. M. (2011). Effects of passages through a suitable host of the fungus, *metarhizium anisopliae*, on the virulence of acaricide-susceptible and resistant strains of the tick, *rhipicephalus microplus*. *Journal of Insect Science*, 11(1), 21.
- Adenubi, O. T., Fasina, F. O., McGaw, L. J., Eloff, J. N., & Naidoo, V. (2016). Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. Elsevier BV. 10.1016/j.sajb.2016.03.010
- Adenubi, O. T., McGaw, L. J., Eloff, J. N., & Naidoo, V. (2018). In vitro bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. *Veterinary Parasitology*, 254, 160-171.
- Agudelo Becerra, D., Beltran Espitia, K. A., & Bolivar Perez, J. (2021). Revisión sobre los hongos *beauveria bassiana*, *metarhizium anisopliae* y *trichoderma spp* como biocontrol de la garrapata *rhipicephalus microplus*.
- Aguer, M. B. (2023). Caracterización estructural y evolutiva de la adaptación funcional del proteoma de *trichoderma harzianum*.
- Aguilar-Tipacamú, G., Mosqueda-Gualito, J., Cantó-Alarcón, G. J., Klafke, G. M., Arellano-Carvajal, F., Alonso-Díaz, M. M., & Rodríguez-Vivas, R. I. (2016). Identificación de mutaciones en el canal de cloro dependiente de glutamato en *rhipicephalus microplus* resistente y susceptible a las ivermectinas. *Quehacer Científico En Chiapas*, 11(2), 20–26.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Alonso, D., & Fernández, A. (2022). *Rhipicephalus microplus*: Biología, control y resistencia. El Centro De Enseñanza, Investigación Y Extensión En Ganadería Tropical.
- Alvarez, C. P. B. (2016). Análisis funcional preliminar de un canal de cloro modulado por ligando, en la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
- Archila Sandoval, L. L. (2014). No title. Determinación De La Efectividad Ixodícida in Vitro De Semillas De Mamey (*Mammea Americana L.*) Para El Control De La Garrapata *Rhipicephalus Microplus* Del Ganado Bovino.
- Arrieta, M. P., Fernández, S., Rayón, E., & López, J. (2013). Cambios en la estructura cuticular *ornithodoros erraticus* hembra durante el proceso de alimentación. *Gayana (Concepción)*, 77(1), 43–52.
- Arroyo, H. A., & Fernández, M. C. (2013). Tóxicos ambientales y su efecto sobre el neurodesarrollo. *Medicina (Buenos Aires)*, 73, 93–102.
- Arturo, C., María Antonia, M. S., & Liana Yanet, R. R. (2024). Eventos bioquímicos asociados a la enfermedad de alzheimer. Paper presented at the BioqHo2024.
- Avellaneda Bustos, D. A., Barrera González, A. C., & Calderón Cárdenas, L. M. (2020). Analizar mediante una revisión sistemática las alternativas de control integrado de origen biológico, frente a la resistencia a acaricidas, de garrapatas de la familia ixodidae (*rhipicephalus sanguineus* y *rhipicephalus (boophilus) microplus*).
- Ballón Paucara, W. G., & Grados Torrez, R. E. (2019). Acoplamiento molecular:: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista Con-Ciencia*, 7(2), 55-72.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Barrios González, H. H. (2021). Evaluación in Vitro De Piper Tuberculatum Para El Control De Garrapatas Rhipicephalus (Boophilus) Micropilus Obtenidas De Bovinos En El Municipio De León,
- Benavides Montaña, J. A., Jaramillo Cruz, C. A., & Mesa Cobo, N. C. (2018). Garrapatas ixodidae (ACARI) en el valle del cauca, colombia. Universidad de Caldas. 10.17151/bccm.2018.22.1.12
- Bino, J., & Sali, A. (2003). Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment. . Nucleic Acids Research, 31, 3982–92.
- Bogado, M. N. (2022). Desarrollo de un fitoterápico para el control de la garrapata rhipicephalus-B-microplus.
- Borrero-Landazabal, M. (2018). Actividad insecticida de metabolitos secundarios de plantas medicinales contra Aedes aegypti y estudio del mecanismo de acción basado en la bioenergética mitocondrial, inhibición de la acetilcolinesterasa y daño en ADN. Universidad Industrial de Santander.
- Boulanger, N., Boyer, P., Talagrand-Reboul, E., & Hansmann, Y. (2019). Ticks and tick-borne diseases. Elsevier BV. 10.1016/j.medmal.2019.01.007
- Bravo Guerrero, B. J., & Bravo Bermeo, G. R. (2023). No title. Extracto De Hojas De Piñón (Jatropha Curcas) Como Alternativa Ecológica Para Combatir Garrapatas De Bovinos.
- Bravo, G. (2020). Análisis bioinformático del acoplamiento de HYNIC-CXCR4-L con el receptor específico quimiocina-4 y determinación del perfil biocinético dosimétrico del 99mTc-.
- Bustos-Baena, A. S., Bravo-Ramos, J. L., Romero-Salas, D., Sánchez-Montes, S., Ortiz-Carbajal, L. A., & Sánchez-Otero, M. G. (2024). In vitro and in silico studies of the acaricidal and anticholinesterase activities of Randia aculeata seeds against the southern cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 33, e001524.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Buxton, I., & Benet, L. Z. (2012). Farmacocinética: Dinámica de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos. Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica, 12, 17-39.
- Cabezas, A. F., Avendaño, G. S., Mendez, S.C., Duque, J.E., (2024). Evaluación del mecanismo de acción de compuestos de origen natural con acción ixodicida sobre la acetilcolinesterasa y el metabolismo bioenergético mitocondrial de *Rhipicephalus microplus*. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander.
- Cabrera, A. E. (2022). Evaluación de eficacia de formulaciones garrapaticidas en terneros estabulados.
- Capuñay Torres, H. (2024). Moléculas con capacidad de inhibición de la enzima glucosa 1-fosfato timidil transferasa (RMLA) de *klebsiella penumoniae* resistente a antibiótico.
- Cardenal Rubio, A. J., Niño Monroy, L. E., Rodríguez Molano, C. E., Sanabria Rangel, O., & Ulloa Torres, S. (2019). Evaluación de varias especies vegetales para inhibir la oviposición y el control de *hipicephalus (boophilus) microplus*.
- Castellanos Castillo, F. A. (2014). Estudio De La Inhibición De La Acetilcolinesterasa Y La Relación Estructura Actividad De Terpenoides Aislados De Organismos Marinos Del Caribe Colombiano.
- Castillo, A., & Acelotl, M. (2018). Investigación documental: Importancia de la biodisponibilidad en el proceso de desarrollo de medicamentos.
- Chalarca-Vélez, J. R., & Gaviria, D. (2020). Modelamiento por homología in silico de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa unida a membrana en *Pseudomonas fluorescens*. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 44(173), 1099-1112.
- Cedeño, L. E., & Jaramillo Yar, S. F. (2023). Evaluación de diferentes niveles de extracto de piñón (*Jatropha curcas* L.) para el control de garrapatas en bovinos (Bachelor's thesis, Calceta: ESPAM MFL).

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Conflitti, P., Raniolo, S., & Limongelli, V. (2023). Perspectives on ligand/protein binding kinetics simulations: Force fields, machine learning, sampling, and user-friendliness. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 19(18), 6047-6061.
- Contreras, L. D. M. (2022). Evaluación del efecto acaricida de *Plectranthus* sp mediante la prueba in vitro de paquete larval (LPT) para el control de *Rhipicephalus microplus*.
- Cossio-Bayugar, R., Miranda-Miranda, E., & Kumar, S. (2023). *A laboratory manual on Rhipicephalus microplus*. Cambridge Scholars Publishing.
- Covian R., Trumpower B. L. (2006) Regulatory interactions between ubiquinol oxidation and ubiquinone reduction sites in the dimeric cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* 281, 30925-30932.
- Cuore, U. (2022). Control integrado en la garrapata *Rhipicephalus microplus* perspectivas en el uso de vacunas recombinantes contra la garrapata. resultados preliminares obtenidos con una vacuna de desarrollo nacional. XLIX Jornadas Uruguayas De Buiatría,
- DANE- Departamento administrativo nacional de estadística (2023). Producto Interno Bruto (PIB)III trimestre 2023 preliminar. <https://www.dane.gov.co/files/operaciones/PIB/bol-PIB-IIItrim2023.pdf>anta, 2021.,
- David, A., Islam, S., Tankhilevich, E., & Sternberg, M. J. (2022). The Alphafold Database of Protein Structures: A Biologist's Guide. *Journal of Molecular Biology*, 434(2), 167336. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.1673>.
- Domingues, G., Moraes, J., Fonseca, R. N. d., & Campos, E. (2023). Inorganic polyphosphate's role in energy production and mitochondrial permeability transition pore opening in tick mitochondria. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 114(1), e22029.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V., & Mee, R. P. (1997). Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Computer-Aided Molecular Design*, 11(5), 425-445. doi:<https://doi.org/10.1023/a:1007996124545>
- Estrada-Peña, A. (2015). CLASE ARACHNIDA orden ixodida: Las garrapatas Fedegan. (2024). Información sobre la ganadería en Colombia. Fedegan. <https://www.fedegan.org.co/informacion-ganaderia>.
- Fernandes, É K., Bittencourt, V. R., & Roberts, D. W. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology*, 130(3), 300-305.
- Ferreira, G. C. M., Canozzi, M. E. A., Peripolli, V., de Paula Moura, G., Sánchez, J., & Martins, C. E. N. (2022). Prevalence of bovine babesia spp., anaplasma marginale, and their co-infections in latin america: Systematic review-meta-analysis. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(4), 101967.
- Fiser, A., & Sali, A. (2003). Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods in enzymology*, 374, 461-491. doi:[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)74020-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)74020-8)
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., . . . Mainz, D. T. (2006). Extra precision glide: docking and scoring.
- González Cordón, M. A. (2012). Determinación de la resistencia de las garrapatas *Rhipicephalus microplus* provenientes de bovinos de la aldea Las Lisas, Chiquimulilla, Santa Rosa a tres diferentes ixodicidas, mediante la técnica de inmersión de adultas (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Guerra Martinez, J.J. (2014). Libro electrónico de bioquímica. Centro de ciencias básicas. Departamento de Química. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Capítulo 9.
- Gasteiger, J. (2020). Chemistry in times of artificial intelligence. *ChemPhysChem*, 21(20), 2233-2242.
- Gupta, M., Azumaya, C. M., Moritz, M., Pourmal, S., Diallo, A., Merz, G. E., Jang, G., Bouhaddou, M., Fossati, A., & Brilot, A. F. (2021). CryoEM and AI reveal a structure of SARS-CoV-2 Nsp2, a multifunctional protein involved in key host processes. *Research Square*.
- Halgren, T. A. (2009). Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability. *Journal of chemical information and modeling*, 49(2), 377-389.
- Hernández, D. A. J. (2022). Importancia de la vacunación dentro del manejo integrado de rhipicephalus microplus en bovinos. *Revista Sistemas De Producción Agroecológicos*, 13(1), 47- References
- Hernández Rojas, C. B. (2019). Desarrollo de un repositorio de patrones estructurales en proteínas (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Ingeniería Civil en Computación.
- Iglesias, B. F. D. E. (2018). Regulación del complejo iii mitocondrial por óxido nítrico. aspectos bioquímicos y biofísicos.
- Baynes, J, M. D. (2011). *Bioquímica médica* (tercera edición ed.). ELSERVIER.
- Jaramillo H, D., González R, A., Pedraza C, N., Sierra A, J., García M, G., & Jara A, J. (2020). Evaluación del efecto acaricida de momordica charantia, megaskepasma erythrochlamys y gliricidia sepium sobre rhipicephalus microplus. *Revista MVZ Córdoba*, 25(1), 1951.
- Jumper, J., Evans, R., & Pritzel, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with Alpha Fold. *Nature* 596, 583–589. doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., & Yu, B. (2023). PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1373-D1380.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- King MS, Sharpley MS, Hirst J. 2009. Reduction of hydrophilic ubiquinones by the flavin in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) and production of reactive oxygen species. *Biochemistry* 48:2053–62.
- Klafke, G. M., Thomas, D. B., Miller, R. J., & de León, A. A. P. (2021). Efficacy of a water-based botanical acaricide formulation applied in portable spray box against the southern cattle tick, *rhipicephalus (boophilus) microplus* (acari: Ixodidae), infesting cattle. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(4), 101721.
- Laguna, C. (2014). Correlación y regresión lineal. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, 4, 1-18.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. (. L., Cox, M. M., Cuchillo, C. M., & Suau León, P. (2006). Principios de bioquímica.
- Letelier Sepúlveda, L. A. (2021). Diseño de compuestos multiblanco basado en similitudes de sitios de unión entre las estructuras de SERT y EAAT3 como potencial alternativa farmacológica para el tratamiento del Trastorno Obsesivo Compulsivo (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Ingeniería Civil en Bioinformática.
- Lima, H. G. D., Santos, F. O., Santos, A. C. V., Silva, G. D. D., Santos, R. J. D., Carneiro, K. D. O., ... & Botura, M. B. (2020). Efeito carrapaticida e inibição da acetilcolinesterase por alcaloides de *Prosopis juliflora*: estudos in vitro e in silico. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 29, e019819.
- Lopez-Arias, A., Villar-Argaiz, D., Chaparro-Gutierrez, J. J., Miller, R. J., & De Leon, A. A. P. (2014). Reduced efficacy of commercial acaricides against populations of resistant cattle tick *rhipicephalus microplus* from two municipalities of antioquia, colombia. *Environmental Health Insights*, 8, EHI. S16006.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- López Sánchez, L. (2021). Bioensayo Para El Control De La Garrapata (*Rhipicephalus Microplus*) De Bovino Utilizando Diluciones Del Hongo *Beauveria Bassiana*,
- López-Gustavo, Betancourt-Jesús. (2024). Garrapatas de los Animales Domésticos en América. Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios y Zootecnistas, Médicos Veterinarios y Zootecnistas - Acovez y Limor de Colombia S.A.S
- Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *saccharomyces cerevisiae*. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 97–103
- Maimó A., María Antonia, M. S., & Liana Yanet, R. R. (2024). Eventos bioquímicos asociados a la enfermedad de alzheimer. Paper presented at the BioqHo2024.
- Martínez Ramos, A. R., Muños Contreras, L. D., RoldanPadron, O., Gómez Sánchez, I., & Aguilar Tipacamú, G. (2024). Evaluación del efecto acaricida de *Plectranthus* sp mediante la prueba in vitro de paquete larval (LPT) para el control de *Rhipicephalus microplus*.
- Martínez-Mercado, M. R., Caraballo-Blanco, L. E., & Blanco-Tuirán, P. J. (2019). *Babesia bigemina* en bovinos del municipio los palmitos (sucre, colombia). *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 20(1), 29-52.
- Matsingos, C., Urdaneta, A. M., Hernández, J. C., & Silva, R. A. P. (2021). Aplicaciones de la inteligencia artificial en la farmacología básica y clínica. *Medicina*, 43(4), 652-667.
- McInnes, C. (2007). Virtual screening strategies in drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, 494–502.
- Meng XY., Zhang HX, Mezei M., Cui M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7, 146-

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Miranda-Salinas, A. V., García-Garza, M. E., & León-González, J. A. d. (2016). Registros nuevos de poliquetos (annelida) de la zona costera de isla del carmen, campeche, méxico. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 87(4), 1212-1224.
- Montero, L. M. H., Peláez, A. B. R., Mendoza, G. A. G., Párraga, M. E. N., & Adrian, H. M. D. (2024). Control de garrapatas mediante beauveria bassiana cepa INIAP L3B3 en combinación con moléculas orgánicas y químicas. *Emergentes-Revista Científica*, 4(2), 583–596.
- Moreno Linares, S. A. (2023). Estado de la resistencia a ivermectina en *Rhipicephalus microplus* y factores asociados en el noreste de México (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Natarajan, A., Sugumar, S., Bitragunta, S., & Balasubramanyan, N. (2015). Molecular docking studies of (4Z, 12Z)-cyclopentadeca-4, 12-dienone from *Grewia hirsuta* with some targets related to type 2 diabetes. *BMC complementary and alternative medicine*, 15, 73.
- Navarro-Rocha, J., Barrero, A. F., Burillo, J., Olmeda, A. S., & González-Coloma, A. (2018). Valorization of essential oils from two populations (wild and commercial) of *Geranium macrorrhizum* L. *Industrial Crops and Products*, 116, 41-45.
- Nave, R. (2005). Cytochrome C Oxidase (Complex IV). *HyperPhysics*. Recuperado 14 de junio de 2024, de <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Biology/Complex4.html#c1>
- Novato, T. P. L., Araújo, L. X., de Monteiro, C. M. O., Maturano, R., Senra, T. d. O. S., da Silva Matos, R., Gomes, G. A., de Carvalho, M. G., & Daemon, E. (2015). Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (acari: Ixodidae) larvae. *Veterinary Parasitology*, 212(3), 331–335. 10.1016/j.vetpar.2015.08.021

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Novato, T., Gomes, G. A., Zeringóta, V., Franco, C. T., de Oliveira, D. R., Melo, D., ... & de Oliveira Monteiro, C. M. (2018). In vitro assessment of the acaricidal activity of carvacrol, thymol, eugenol and their acetylated derivatives on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology*, 260, 1-4.
- Novato, T. P., Milhomem, M. N., Marchesini, P. B. C., Coutinho, A. L., Silva, I. S., de Souza Perinotto, W. M., de Azevedo Prata, M. C., Ferreira, L. L., Lopes, W. D. Z., Costa-Júnior, L. M., & de Oliveira Monteiro, C. M. (2022). Acaricidal activity of carvacrol and thymol on acaricide-resistant *rhipicephalus microplus* (acari: Ixodidae) populations and combination with cypermethrin: Is there cross-resistance and synergism? *Veterinary Parasitology*, 310, 109787. [10.1016/j.vetpar.2022.109787](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109787).
- Ocampo Zambrano, V. M., & Zambrano Párraga, D. G. (2023). Evaluación De Teta De Vaca (*Solanum Mammosum* L) En El Control De (*Rhipicephalus Microplus*) En Bovinos.
- Peixoto, M. G., Costa-Júnior, L. M., Blank, A. F., da Silva Lima, A., Menezes, T. S. A., de Alexandria Santos, D., ... & de Fátima Arrigoni-Blank, M. (2015). Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary parasitology*, 210(1-2), 118-122.
- Perspectivas De La Ciencia Y La Tecnología, 257-271. <https://doi.org/10.61820/pct.vi.1091>
- Pietro, G., De Vivo, M., & Ulloa, S. (2016). Application of Molecular Mechanics for the Discovery of Novel Microbial IIA Topoisomerases Inhibitors Chemistry. Department Faculty of Sciences University of Los Andes Colombia.
- Polanco-Echeverry, D. N., & Ríos-Osorio, L. A. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81–95.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Powell, K. (2020). Schrödinger Transforma el Descubrimiento de Fármacos Mediante la Plataforma con la Tecnología de GPU. NVIDIA Latino América.
- Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2019). Diseño de fármacos asistido por computadora: Cuando la informática, la química y el arte se encuentran. TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas, 21(2), 124-134.
- Primitivo, I. D. H., González, S. M., Jorge, A. O., Rubén, B. C., Javier, R. R., Lenin, L. O., & Jorge, M. T. (2012). The repellency to tick in some forage plants. Abanico Veterinario, 2(3), 47–57.
- Pum, J. (2019). Chapter six - A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. Advances in Clinical Chemistry, 90, 215–281. 10.1016/bs.acc.2019.01.006
- Ramírez, C., Ibarra, F., Pérez, H. I., Manjarrez, N., Salgado, H. J., & Ortega, L. (2016). Assessment and determination of LC50 of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of rhipicephalus (boophilus) microplus. Parasite Epidemiology and Control, 1(2), 72–77. 10.1016/j.parepi.2016.02.006
- Rich, P. R., & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. Essays in biochemistry, 47, 1-23.
- Rivera, E. D. (2012). Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos rhipicephalus microplus. Revista Colombiana De Ciencia Animal, 5
- Roa Q, K. Del pilar C. (2021). Estudio exploratorio de las rutas de contaminación causada a la población y al medio ambiente por el uso de pesticidas organofosforados en el municipio de guasca departamento de cundinamarca.
- Robertos, N. F., & Pérez de León, A. A. (2017). Actualidades sobre el diagnóstico de resistencia de garrapatas a los acaricidas y lactonas macrocíclicas en México. Industria farmacéutica veterinaria (infarvet) mvz.jose varona beascoechea Presidente, 20.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Robinson, SW., Afzal, AM., Leader DP. (2014). Chapter 13 - Bioinformatics: Concepts, Methods, and Data, Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Academic Press, 259-287.
- Rodríguez Molano, C. E., & Pulido Suárez, N. J. (2015). Eficacia de extractos vegetales sobre la garrapata adulta *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y su oviposición. *Revista Cubana De Plantas Medicinales*, 20(4), 0.
- Rodríguez Molano, C. E., Niño Monroy, L. E., & Pulido Suárez, N. J. (2022). Evaluation of the ixodicide effect of botanical extracts on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. *Ciencia En Desarrollo*, 13(2), 1-9.
- Rodríguez, A. M., Zunino, M. P., & Dambolena, J. S. (2018). Optimización de ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa en *Sitophilus zeamais* (Mots.). *Revista De La Facultad De Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 5(1), 51.
- Rodríguez, Y. H., Castillo, A. F., & Torrente, Y. Q. (2016). Control integrado de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en un pequeño rebaño bovino. *REDVET.Revista Electrónica De Veterinaria*, 17(9), 1-10.63.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Pérez-Cogollo, L. C., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Trinidad-Martínez, I., Miller, R. J., Li, A. Y., De León, A. P., Guerrero, F., & Klafke, G. (2014). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. *FapUNIFESP (SciELO)*. 10.1590/s1984-29612014044
- Rodríguez-Vivas, Roger Iván, Rosado-Aguilar, José Alberto, Ojeda-Chi, Melina Maribel, Pérez-Cogollo, Luis Carlos, Trinidad-Martínez, Iris, & Bolio-González, Manuel Emilio. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 295-308

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Roos, K., Wu, C., Damm, W., Reboul, M., Stevenson, J. M., Lu, C., Dahlgren, M. K., Mondal, S., Chen, W., & Wang, L. (2019). OPLS3e: Extending force field coverage for drug-like small molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15(3), 1863-1874.
- Rosado-Aguilar, J. A., Aguilar-Caballero, A., Rodriguez-Vivas, R. I., Borges-Argaez, R., Garcia-Vazquez, Z., & Mendez-Gonzalez, M. (2010). Acaricidal activity of extracts from *petiveria alliacea* (phytolaccaceae) against the cattle tick, *rhipicephalus (boophilus) microplus* (acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 168(3-4), 299-303.
- Rosario, C. R., Dominguez, G., Rojas, R. E., Ortiz, E. M., & Martinez, I. F. (2010). Estrategias para el control de la garrapata *boophilus microplus* y la mitigacion de la resistencia a los pesticidas. Primer Simposium De Salud Y Produccion De Bovinos De Carne En La Zona Norte-Centro De Mexico. Aguascalientes, Aguascalientes, 1-22.
- Ruiz Munevar, M. J. (2018). Búsqueda computacional de inhibidores de la bomba de expulsión MtrCDE de *Neisseria gonorrhoeae*.
- SAINES, E. C. (2022). Aislamiento de bacterias en diferentes ranchos ganaderos de México y evaluación de su efecto sobre garrapatas *rhipicephalus microplus*.
- Saldívar-González, F. I., Fernández-de Gortari, E., & Medina-Franco, J. L. (2023). Inteligencia artificial en el diseño de fármacos: Hacia la inteligencia aumentada. *Educación Química*, 34(2), 17-25.
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: Un enfoque computacional. *Educación Química*, 28(1), 51-58.
- Schrödinger, Inc. (2024). The Advantages of Accurate Receptor Models. Obtenido de <https://www.schrodinger.com/products/prime>.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Schrödinger 2021-4. (2021). Asistente de preparación de proteínas; Epik, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2021; Impact, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2021).
- Schrödinger 2023-3. (2023). Glide, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY, 2023.
- Senior, A. W., Evans, R., Jumper, J., Kirkpatrick, J., Sifre, L., Green, T., Qin, C., Žídek, A., Nelson, A. W., & Bridgland, A. (2020). Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature*, *577*(7792), 706-710.
- Sepúlveda, A., Pulido-Medellín, M. O., Rodríguez-Pacheco, J. E., & García-Corredor, D. J. (2018). Eficiencia in vitro de hongos entomopatógenos y productos químicos sobre *Rhipicephalus microplus*. Universidad de Caldas. 10.17151/vetzo.2017.11.2.6
- Sethi, A., Joshi, K., Sasikala, K., Alvala, M. (2019). Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications. *Drug Discovery and Development - New Advances*.
- Shanmugam, G & Jeon, J. (2017). Computer-Aided Drug Discovery in Plant Pathology. *The Plant Pathology Journal*, *33*, 529-542.
- Silva, W. O., Rosa, R. L., Berger, M., Coutinho, C. J., Vainstein, M. H., Schrank, A., ... & Santi, L. (2020). Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, *208*, 107812.
- Sousa, A. P., Castro, G. S., Tavares, C. P., Vale, T. L. d., Costa-Junior, L. M., & Soares, A. S. (2022). In vitro assessment of the acaricidal activity of a carvacrol shampoo on tick larvae. *Experimental Parasitology*, *242*, 108364. 10.1016/j.exppara.2022.108364
- Sousa, J. S., D'Imprima, E., & Vonck, J. (2018). Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Sub-cellular biochemistry*, *87*, 167–227.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Statistic 10.0. Software.informer. Recuperado el 20 de septiembre de 2024 de:
<https://software.informer.com/about.html>
- Sun, M., Ren, Q., Guan, G., Liu, Z., Ma, M., Gou, H., Chen, Z., Li, Y., Liu, A., & Niu, Q. (2011). Virulence of *beauveria bassiana*, *metarhizium anisopliae* and *paecilomyces lilacinus* to the engorged female *hyalomma anatolicum anatolicum* tick (acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 180(3-4), 389-393.
- Sutherst, R. W., Maywald, G. F., Kerr, J. D., & Stegeman, D. A. (1983). The effect of cattle tick (*boophilus microplus*) on the growth of *bos indicus* × *B. taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34(3), 317–327.
- Tavares, C. P. (2022). Efeitos de carvacrol e timol, livres ou em combinação com cipermetrina, sobre o carrapato. *Rhipicephalus microplus*.
- Tashjian, A. H., & Armstrong, E. J. (2011). *Principles of pharmacology: The pathophysiologic basis of drug therapy*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Torres Merino, R. (2015). Estudio de la función de *fastkd3* en la mitocondria.
- Trang, A., & Khandhar, P. B. (2019). Physiology, Acetylcholinesterase. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Valcárcel, F., Sanchis, J., Sánchez, M., González, M. G., Carbonell, J. D., González, J., ... & Olmeda, A. S. (2020). ¿ Infestación por garrapatas?: es mejor prevenir que tratar. *MG Mundo ganadero*, 31(292), 36-40.
- Vargas-Cuy, D. H., Torres-Caycedo, M. I., & Pulido-Medellín, M. O. (2019). Anaplasmosis y babesiosis: Estudio actual. *Pensamiento Y Acción*, (26), 45–60.
- Vázquez Domínguez, I. F. (2022). Efectividad De Extractos De Plantas En Condiciones De Laboratorio Para El Control De *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* (Acarí: Ixodidae),

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

- Velázquez Terra, R., & Otegui Riccetto, M. A. (2016). Caracterizar el modelo de infección artificial de *rhipicephalus (boophilus) microplus* en bovinos y determinación de la eficacia ectoparacitida de una formulación de ivermectina 3, 15% larga acción.
- Weber, T., & Selzer, P. M. (2016). Isoxazolines: A novel chemotype highly effective on ectoparasites. Wiley. 10.1002/cmdc.201500516
- Yaima-Yate, J., & Díaz-Rivera, E. (2022). *Rhipicephalus (boophilus) microplus murrell & barker*, 2003 (ixodida: Ixodidae) evaluación de la efectividad de acaricidas sobre sus poblaciones en el tolima medio. Boletín Científico.Centro De Museos.Museo De Historia Natural, 26(1), 25-40.
- Yu CA., Yu L., Xia D. (2013) Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase (Complex III). In: Roberts G.C.K. Encyclopedia of Biophysics. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_28.
- Zárate Paredes, H. (2016). Adaptación de *metarhizium sp.* como entomopatógeno de garrapatas.
- Zotal Laboratorios. (2018). Cómo eliminar las garrapatas en una zona ganadera. <https://www.zotal.com/como-eliminar-las-garrapatas-en-una-zona-ganadera>.

Anexos

Anexo 1.

Base de datos de 300 metabolitos secundarios de extractos de plantas, con posible actividad acaricida en Rhipicephalus microplus.

<i>Planta</i>	<i>Metabolito Secundario</i>	<i>Enlace de acceso</i>
Aceite de eucaplito	1-8, cineol o eucaliptol	https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0254629915326028?token=EE4E2550B7C81E6D253096C4BC9613CA92A06E8DAFF62B4AC3530EA9BEAA74B5605D63D07F8D5DE937B1808B36F6AAF9&originRegion=us-east-1&originCreation=20210622132220
Aceite de flor de jasmin	Cis-Jasmone	
Mentha piperita	Isomentona	
Lycopersicon hirsutum	2-undecanona	
Aegle marmelos	Aegelinol	
	Rutina	
Allium sativum	Alicina	
Ananas comosus	Acido cafeico	
	Acido p- cumarico	
Azadirachta indica	Azadiractina	
Baccharis trimera	Diterpenes	
Calea serrata Less	Eupatoriocromeno	
	Precoceno II	

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Calotropis procera	Stigmasterol
	β -sitosterol
	Digitoxin
	Calotoxina
	Lupanina
	Virgilina
	Ester de ácido 13 α - (2- pirrolcarboxílico)
Calpurnia aurea ssp	Calpurmenina
Capsicum frutescens	Capsaicina
	Escopoletina
	naringenina
	ácido ursólico
Carapa guianensis Aubl	Ácido hexacosanoico-2,3- dihidroxiglicérido
Carica papaya	Alcaloides
Cassia didymobotrya	Estilbenos
	Flavonas

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	7-acetilcrisofanol
	tetrahidroantracenos
	Biantronas,
Chamaecyparis nootkatensis	Carvacrol
	Nookatone
Citrus maxima Burm	Saponinas
	Alcaloides
	Taninos
	Terpenoides
	Fenol
Citrus reticulata Blanco	β -felandreno
	γ -terpeno
	L-limoneno
	Limoneno
	Oxalato
	Fitato
	Saponinas

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	Taninos	
Citrus sinensis	Flavonoides	
Citrus hystrix	furanocumarinas	
	Alcaloides	
	Flavonoides	
	Tocoferoles	
	Taninos	
	Glicerolglicolípidos	
Copaifera reticulata	Oleorresina	https://scihub.se/https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-013-3660-4
Corymbia citriodora	Citronelal	https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0254629915326028?
	β -citral (neral)	
	α -citral (geranial)	
Cymbopogon citratus	Mirceno	
	Trans-citral	
	Cis-citral	
	Acetato de geranilo	

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Cymbopogon nardus	Geraniol
Cymbopogon winterianus	Citronelol
	Citronelal
	Geraniol
Datura stramonium	Atropina
	Escopolamina)
Digitalis purpurea	Digitoxina
Eupatorium adenophorum	p-cimeno
	Canfeno
	Sabinene
Guiera senegalensis	Harman
	Eleagnina
Gynandropsis gynandra	Guieranona A
	trans-2-metilciclopentanol
	linalol(ya)
Hypericum polyanthemum	Trans-fitol

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	benzopiranos
	Xantonas
	campesterol
Jatropha curcas	β -sitosterol(ya)
Lavendula augustifolia	Estigmasterol
Leucaena leucocephala	Alcanfor, borneol
	Mimosina,
	ficaprenol-11
Leucas aspera	Quercetina
	Nicotina
	Oleanolic acid
	b-sitosterol
Leucas indica	Ursolic acid
Lindera melissifolia	Apigenina
	Eriodictiol
	Luteolina
	Naringenina

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	3,4-dihidroxifenilacetato
	(-)Epicatequina
	Catequina
	Acido oleanólico
	Acido hexadecanoico
	Lupeol
	Acido palmitoleico
	Ácido betulínico
	α -humuleno
	Germacreno D
	β -elemeno
	β -cariofileno
	2-butanona
	Dihidrotagetona
Lippia javanica	1,8-cineol
Lippia sidoides	Mirceno

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	β -mirceno
	Carvacrol
	Citral
	limoneno
	Quercetina
<i>Lysiloma latisiliquum</i>	Timol
	Estigmasterol
<i>Matricaria chamomilla</i>	Ácido oleanólico
	Herniarina
<i>Melaleuca alternifolia</i>	β -pineno
	Alfa-pineno
<i>Ocimum basilicum</i>	β -pineno
	ciclohexeno
	Ester metílico del ácido (Z) cinámico
<i>Ocimum urticaefolium</i>	Linalol
	Timol

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	β -bisaboleno
	Elemicina
Origanum minutiflorum	Eugenol
	Mirceno
Origanum onites	Canfeno
Pelargonium graveolens	p-Cimeno
	Geraniol
Pelargonium roseum	Citronelol
	Linalol
	Geraniol
	Isomentona
	formiato de citronelilo
Piper tuberculatum	β -citronelol
	dihidropiartina
	ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinámico
Piscidia piscipula	Piartina

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	Jamaicina
	Genisteína, junipegenina A
	Erigenina
	Alolicoisoflavona A
	Piscidanona
	pisceritrona
	Pisceritramina
Ptaeroxylon obliquum	3',5'-diprenilgenisteína
Rhododendro tomentosum	Limoneno
	Mirceno
	kaempferol
Ricinus communis	Flavona
Satureja thymbra	Acido gálico
	Γ-terpineno
	Kaempferol
	Timol
	Fenol

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Simarouba versicolor	Carvacrol
	11-Acetylmargarolide
	Glaucarubione
Solanum trilobatum	Fitoesteroles
	Solasonina
	Solamargina
Stemona collinsae Craib	β -2-solamargina
	Estenina
	croomina
	estemonidina
	tuberostemonina
	Luteina)
Tagetes erecta	estemoamida
Tagetes minuta	Tiofenos
	Piperitona
	Ocimenona
	Dihidrotagetona

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Tagetes patula	Tagetone	https://scihub.se/https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-013-3660-4
	Indano	
	Z-ocimeno	
	D-limoneno	
	terpinoleno	
	Bervenona	
	patuletina	
	quercetina-3-O-pentosida	
	Kaempferol	
	piperitona	
Tetradenia riparia	α -pironas	https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/25394/%20%09hrperaltat.pdf?sequence=1&isAllowed=y
	14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno	
	Bervenona	
Thymus vulgaris	Timol	
Vitex negundo	Alcanfor	
	Agnusida	
	Aucubina	

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	Isoorientina
	Luteolina
	6,8,4'-trimetoxiflavona
Withania somnifera	Carvacrol
Lippia graveolens(Hojas de Oregano)	Timol
	b-cariofileno
	Canfor
	Linalol
	Alfa-pineno
	Timol
	p-cimeno
	Luteolina
	Apigenina
	Naringenina
	Lapachenol
	Icterogenina

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

R. Officinalis(hojas de
romero)

Pinocembrina

Limoneno

Linalol

Mirceno

Verbenona

Cirsimarina

Diosmina

1,8-cineol

Alfa-pineno

Alcanfor

Alfa-terpineol

Canfeno

Borneol

Hesperidina

Nepitrina

Neptina

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	Picrosalvina	
	Carnosol	
	Isorosmanol	
	Rosmadial	
	Rosmaridifenol	
	Rosmariquinona	
	Acido oleanólico	
	Acido ursólico	
	Acido rosmarínico	
	Acido cafeico	
B. Pilosa	Acido clorogénico	https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/304
S. Nigra	Fenilheptatrino	
	Glucopiranósido	
	Estigmasterol	
	b-sitosterol	
	Luteolina	
	Acido a - linolénico	

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	Acido linolico
N. Tabacum	Rutina
	Flobafeno
	Quercetina
	Apigenina
	Acido cafeico
	colina
	Ácido málico
	Ácido valerianico
	Ácido tartárico
	Ácido Estearico
	Ácido miristico
	Fitosterina
Bocconia. Arborea	Nicotina
	Acido cafeico
	Acido clorogenico

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	Boconietrina
	Boconiclorina
	boconiyodina
	cheleritrina
	Protapina
	Alocritapina
A. Cumanenses	Boconixantina
	Cariofileno
	Humuleno
	germacrene-D
	β -pineno
	α -pineno
P crassinervium	Crisantenona
	Limoneno
	Germacreno
	Sabineno

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

	Alfa-pineno
Piper aequale	Biciclogermacreno
	Germacreno D
	Alfa-cadineno
	Beta-selineno
	Trans- β -cariofileno
	Alfa-Gurjuneno
Rosmarinus officialinis	dehidrofukinona
	1,8-cineol
	Alcanfor
	α -pineno
	Canfeno
	Borneol
	Acido ursólico
	Acido betulínico
	Rosmadial

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS EN *Rhipicephalus microplus*

Verbenona

β -cariofileno

isorosmanol

rosmanol

metil carnosato

α -cariofileno

acetato de bornilo

isorosmanol

Anexo 2.

Certificado de participación en el V Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 y la XI Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis SLAMTB, 2023.

 **V** Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular

 **SLAMTB**
SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE TUBERCULOSIS Y OTRAS MICOBACTERIOSIS

El comité organizador del V Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 y la XI Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis SLAMTB, certifican que el trabajo titulado:

“Estudio *in silico* e *in vivo* de metabolitos secundarios de plantas con acción inhibitoria sobre proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa de *Rhipicephalus microplus*”

de autoría de **Betsy Natalia Alfonso-Nuñez, Andrés Felipe Cabezas-Cárdenas, Gloria Stefany Avendaño-Mora, Luis C Vesga, Stelia Carolina Mendez-Sanchez y Jonny Edward Duque Luna**, fue presentado en modalidad de poster, en el V C2B2 y la XI SLAMTB en la ciudad de Bucaramanga, del 8 al 10 de noviembre del 2023.

En constancia firman el 15 de noviembre de 2023


Dra. Adriana Umaña Pérez
Presidente comité organizador
VC2B2


Dra. Stelia Carolina Mendez
Presidente comité científico
VC2B2


Dr. Carlos Yesid Soto
Presidente comité organizador
SLAMTB


Dra. Luciana Balboa
Presidente comité científico
SLAMTB