

Actividad larvica de metabolitos de plantas que afectan la bioenergética mitocondrial de  
mosquitos *Aedes aegypti*

Por:

Maria Fernanda Pérez Rojas

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM)

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP)

Trabajo de grado para optar al título de química

Dirigido por:

Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez.

Co-dirigido por:

Dr. Luis Carlos Vesga Gamboa.

Escuela de Química, Facultad de Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

2022

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre por permitirme este logro y apoyarme hasta el último día.

A mis hermanos por ser motor de mis sueños.

A Oscar por estar incondicionalmente para mí y ser mi motor de amor y fuerza.

A Jessi por ser una gran persona y una mejor amiga dispuesta a escuchar y estar desde el amor durante toda la carrera.

A Trufa por darme alegrías al final de este proceso.

A la profesora Stelia y el profesor Jonny por las enseñanzas y conocimiento brindado para que este proyecto sea posible, siempre desde el ejemplo de ética y amor por la ciencia.

A Luisk por la paciencia y soporte que me tuvo durante este proyecto.

A los compañeros de CINTROP- laboratorio 110 y GIBIM-laboratorio 402, por la ayuda y complemento en los conocimientos, y por las grandes personas que son, en especial a Ruth, Diana, Daniela, Alejo y Gustavo.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, y al programa Bio-Reto XXI-15:50, por permitirme estar en el proyecto 11: “Desarrollo de nuevos productos con actividades antimicrobiana, insecticida y repelente a partir de moléculas aisladas de plantas aromáticas colombianas”.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión por el apoyo recibido para la divulgación de los resultados de este trabajo de investigación.

**CONTENIDO**

<b>Resumen</b> .....	11
<b>Abstract</b> .....	13
<b>Introducción</b> .....	15
1. Marco de referencia y antecedentes .....	16
1.1. <i>Aedes aegypti</i> .....	16
1.2. Características de un insecticida ideal y su mecanismo de acción.....	17
1.3. La mitocondria como target para el diseño de insecticidas.....	18
1.4. Complejo I.....	20
1.4.1. Inhibición del complejo I.....	20
1.5. Complejo III.....	21
1.5.1. Inhibición del complejo III.....	22
1.6. Métodos computacionales para el diseño y análisis de fármacos .....	23
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivo general .....	25
2.2. Objetivos específicos .....	25
<b>Capítulo 1. Análisis <i>in silico</i> de metabolitos de plantas que afectan los complejos mitocondriales I y III de mosquitos <i>Aedes aegypti</i></b> .....	26
1. Objetivo específico.....	26
2. Metodología fase <i>in silico</i> .....	27
2.1. Fase preliminar .....	27
2.2. Fase <i>In Silico</i> .....	28

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

2.2.1.	Modelo de homología .....	28
2.2.2.	Preparación y screening virtual de los ligandos y la proteína.....	29
2.2.3.	Docking molecular.....	29
2.2.4.	Visualización.....	31
3.	Resultados y discusión.....	31
3.1.	Modelo de homología .....	31
3.1.1.	Complejo I, subunidad 5 .....	31
3.1.1.1.	Validación Modelo de Homología Complejo I .....	32
3.1.2.	Complejo III, subunidad Cyt b .....	33
3.1.2.1.	Validación Modelo de Homología Complejo III. ....	34
3.2.	Docking molecular.....	35
3.2.1.	Complejo I, Subunidad 5.....	35
3.2.2.	Complejo III, Subunidad Cyt b.....	39
4.	Conclusiones.....	42
<b>Capítulo 2. Actividad larvicida y enzimática de metabolitos de plantas que afectan los complejos mitocondriales I y III de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>.....</b>		
1.	Objetivos específicos .....	44
2.	Metodología fase <i>in vitro- in vivo</i> .....	45
2.1.	Actividad larvicida.....	45
2.2.	Actividad de metabolitos en la bioenergética mitocondrial.....	47
2.2.1.	NADH oxidasa.....	47
2.2.2.	NADH deshidrogenasa.....	48

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

2.2.3.	NADH citocromo c reductasa.....	48
2.3.	Análisis estadístico.....	49
3.	Resultados y discusión del capítulo.....	49
3.1.	Actividad larvicida.....	49
3.1.1.	Carvacrol.....	51
3.1.2.	Farnesol.....	52
3.2.	Efecto del farnesol y carvacrol sobre la actividad enzimática mitocondrial .....	54
3.2.1.	NADH oxidasa.....	55
3.2.2.	NADH deshidrogenasa.....	56
3.2.3.	NADH citocromo c reductasa.....	57
4.	Conclusiones.....	59
<b>Capítulo 3. Discusión y conclusiones finales.....</b>		<b>60</b>
1.	Discusión global.....	60
2.	Conclusiones globales.....	64
3.	Recomendaciones.....	65
4.	Divulgación de resultados.....	65
<b>ANEXOS.....</b>		<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>		<b>73</b>

**Lista de figuras**

Figura 1. Cadena transportadora de electrones.....	19
Figura 2. Estructura química de amital.....	21
Figura 3. Estructura química de antimicina A.....	22
Figura 4. Esquema metodológico computacional del proyecto de investigación.....	27
Figura 5. Modelo de homología para la subunidad 5 del complejo I .....	31
Figura 6. Gráfica de Ramachandran del modelo creado a partir del complejo I .....	32
Figura 7. Modelo de homología creado para la subunidad cyt b del complejo III.....	33
Figura 8. Gráfica de Ramachandran del modelo creado a partir del complejo III.....	34
Figura 9. Estructura química metabolitos secundarios de plantas: carvacrol, farnesol .....	35
Figura 10. Visualización de interacción ligandos inhibidores en el complejo I (piericidina A y mucidina).....	36
Figura 11. Visualización de interacción ligando en el complejo I (A) quercetina (B) Carvacrol, (C) Farnesol, (D) ácido láurico y (E) N octanol.....	38
Figura 12. Visualización de interacción ligando inhibidores en el complejo III (mixotiazol).....	39
Figura 13. Visualización de interacción ligando en el complejo III(A) quercetina (B) Carvacrol, (C) Farnesol, (D) ácido láurico y (E) N octanol.....	41
Figura 14. Esquema metodológico experimental del proyecto de investigación.....	45
Figura 15. Porcentaje de mortalidad de concentraciones diagnosticas de 30 ppm, 90 ppm y 190 ppm para (A) N octanol, (B) ácido láurico (C) quercetina, (D) carvacrol y (E) farnesol sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas.....	50
Figura 16. Porcentaje de mortalidad de carvacrol sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas.....	51
Figura 17. Porcentaje de mortalidad de farnesol sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas.....	53
Figura 18. Actividad para NADH oxidasa, en mitocondria de larva <i>Ae. aegypti</i> en presencia de (A) carvacrol y (B) farnesol.....	55
Figura 19. Actividad para NADH deshidrogenasa, en mitocondria de larva <i>Ae. aegypti</i> en presencia de (A) carvacrol y (B) farnesol.....	56
Figura 20. Actividad para NADH citocromo c reductasa, en mitocondria de larva <i>Ae. aegypti</i> en presencia de (A) carvacrol y (B) farnesol.....	58
Figura 21. Posible mecanismo de apoptosis mitocondrial generado por carvacrol.....	61
Figura 22. Vía de biosíntesis de JH.....	63

**Lista de tablas**

Tabla 1. Valores de docking molecular y energía de afinidad para los 10 mejores compuestos con el complejo I.....	36
Tabla 2. Valores de docking molecular y energía de afinidad para los compuestos carvacrol y farnesol en el complejo III.....	40
Tabla 3. Concentraciones letales de Carvacrol sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas.....	52
Tabla 4. Concentraciones letales de Farnesol sobre <i>Ae. aegypti</i> , a las 24 y 48 horas.....	54

**Anexos**

<b>Anexo 1.</b> Base de datos metabolitos con actividad insecticida.....	67
<b>Anexo 2.</b> Propiedades ADME de los metabolitos seleccionado.....	70
<b>Anexo 3.</b> Certificado 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020.....	71
<b>Anexo 4.</b> Certificado I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas 2021.....	71
<b>Anexo 5.</b> 49° congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN.....	72

**Lista de abreviaturas**

ADP	Adenosín difosfato
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina bovina sérica
CcO	Citocromo c oxidasa
CD	Concentraciones diagnósticas
CHIKV	Chikunguya
CI	Concentración inhibitoria
CINTROP	Centro de investigaciones en enfermedades tropicales
Cl	Concentración letal
Cyt b	Citocromo b
Cyt c	Citocromo c
DENV	Dengue
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DL	Dosis letal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicon tetraacético
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavin mononucleótico
GIBIM	Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología
INS	Instituto Nacional de la Salud
LogHERG	CI50 para el bloqueo de los canales HERG K <sup>+</sup>

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

LogKp	Permeabilidad en la piel
LogP	Logaritmo P
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
P	Peso
PBS	Tampón fosfato salino
PEP	Fosfoenol piruvato
PMS	Fenacina metosulfato
ppm	Partes por millón
PSA	Área de superficie polar molecular
QH2	Ubiquinol
RMSD	Desviación cuadrática media
S	Solubilidad
SDH	Succinato deshidrogenasa
TCA	Ácido tricloroacético
TPSA	Área de superficie polar topológica
ZIKV	Zika

## RESUMEN

**Título:** Actividad larvicida de metabolitos de plantas que afectan la bioenergética mitocondrial de mosquitos *Aedes aegypti*.

**Autor:** Maria Fernanda Pérez Rojas, Stelia Carolina Méndez Sánchez, Luis Carlos Vesga.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*; metabolitos secundarios de plantas; bioinsecticidas; docking molecular; actividad larvicida.

### Descripción:

La incidencia de las enfermedades del Dengue, Zika y chikungunya, transmitidas por *Aedes aegypti*, se ha incrementado en las últimas décadas. La Organización Panamericana de la Salud notificó 1,881,352 casos de DENV, 170,175 casos de CHIKV y 170,175 casos de ZIKV, en las Américas y el Caribe para la semana epidemiológica 25 del 2022 (OPS, 2022), de ahí que resulta necesario su prevención y control. Los métodos de control tradicionales usan insecticidas que generan problemas ambientales y resistencia a los principios activos en los mosquitos, debido a mecanismos etológicos, metabólicos y evolutivos (Melo et al., 2010; Rodríguez et al; 2005). El uso de productos naturales es una alternativa menos agresiva con el ambiente para controlar el vector, razón por la cual, este trabajo tuvo como objetivo identificar metabolitos secundarios de plantas con posible actividad insecticida mediante un cribado *in silico* y validación *in vitro* e *in vivo* sobre los complejos I y III de la bioenergética en *Ae. aegypti*. La selección de los metabolitos de plantas se realizó por medio de docking molecular de precisión estándar y extra-precisión. Los metabolitos candidatos se evaluaron mediante técnicas experimentales, como la actividad larvicida en larvas *Ae. aegypti* y el efecto de estos sobre enzimas mitocondriales. En la etapa *in vivo*, se evaluó el efecto letal de los metabolitos previamente seleccionados sobre las larvas L3 y L4 luego de 24 y 48 horas

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

de exposición, determinando así las concentraciones letales ( $CL_{50}$ ). En la fase *in vitro*, los metabolitos con mayor letalidad, farnesol y carvacrol, se les evaluó su efecto sobre el complejo I y el complejo III de la cadena respiratoria, con el fin de relacionar el efecto tóxico de estos metabolitos sobre la actividad mitocondrial. Los resultados obtenidos muestran que el carvacrol presenta un docking score de -4,435 y -7,772, para el complejo I y III, respectivamente, así como una energía de afinidad -36,47 y -36,21 Kcal/mol, para cada complejo. Por otro lado, el farnesol presenta una puntuación de -3,234 para el primer complejo y -7,549 para el tercer complejo, así como una energía de afinidad de -42,13 y -55,29 Kcal/mol, para cada complejo. Los resultados anteriores se deben a interacciones presentadas, en el caso del complejo I, se observaron interacciones con residuos como Ile 235, Tyr 295 y Tyr 173, mientras que para el caso del complejo III, se presentaron interacciones relevantes con los aminoácidos Phe 275, Leu 295 y Ile 147. En cuanto a la fase *in vivo*, el carvacrol, presentó un  $CL_{50}$  de 37,4 ppm y 34,5 ppm para las 24 y 48 horas respectivamente, y farnesol obtuvo un  $CL_{50}$  de 9,78 ppm y 8,73 ppm, a las 24 y 48 de horas, respectivamente. Por su parte, la actividad enzimática evaluada en la fase *in vitro* mostró para carvacrol una inhibición, con actividades enzimáticas de 66,4%, 39,11% y 5,6% para NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa y NADH citocromo c reductasa, respectivamente. Por su parte, farnesol obtuvo una inhibición, con actividades de 5,9% y 19,98% para NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa, mientras que para NADH citocromo c reductasa aumentó su actividad con 342,08%, respecto al control. De esta forma, los metabolitos evaluados en este estudio se presentan como alternativas naturales promisorias para el control del vector, por la alteración de la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria del individuo. Además, se demuestra la efectividad de estudios *in silico* para evaluación preliminar de futuros compuestos.

**ABSTRACT**

**Title:** Larvicidal activity of plant metabolites that affect the mitochondrial bioenergetics of *Aedes aegypti* mosquitoes.

**Author:** Maria Fernanda Pérez Rojas, Stelia Carolina Méndez Sánchez, Luis Carlos Vesga Gamboa.

**Keywords:** *Aedes aegypti*; plant secondary metabolites; bioinsecticides; molecular docking; larvicidal activity.

**Description:**

The incidence of Dengue, Zika and chikungunya diseases, transmitted by *Aedes aegypti*, has increased in recent decades. The Pan American Health Organization reported 1,881,352 cases of DENV, 170,175 cases of CHIKV and 170,175 cases of ZIKV, in the Americas and the Caribbean for epidemiological week 25 of 2022 (PAHO, 2022), hence its prevention is necessary and control. Traditional control methods use insecticides that generate environmental problems and resistance to active principles in mosquitoes, due to ethological, metabolic, and evolutionary mechanisms (Melo et al., 2010; Rodríguez et al; 2005). The use of natural products is a less aggressive alternative to the environment to control the vector, which is why this work aimed to identify secondary plant metabolites with possible insecticidal activity through *in silico* screening and *in vitro* and *in vivo* validation on complexes I and III of the electron transport chain in *Ae. aegypti*. The selection of plant metabolites was performed by standard and extra precision molecular docking. Candidate metabolites were evaluated using experimental techniques, such as larvicidal activity in *Ae. aegypti* and their effect on mitochondrial enzymes. In the *in vivo* stage, the toxic effect of the previously selected metabolites on the larvae in stages 3 and 4 after 24 and 48 hours of exposure was evaluated, thus determining the lethal concentrations (LC<sub>50</sub>). In the *in vitro* phase, the metabolites with the

highest lethality on larvae, farnesol and carvacrol, were evaluated for their effect on complex I and complex III of the respiratory chain, to relate the lethal effect of these metabolites on the mitochondrial activity. The results obtained by molecular docking suggest that carvacrol has a docking score of -4,435 and -7,772, for complex I and III, respectively, as well as an affinity energy of -36,47 and -36,21 Kcal/mol, for each complex. On the other hand, farnesol has a score of -3,234 for the first complex and -7,549 for the third complex, as well as an affinity energy of -42,13 and -55,29 Kcal/mol for each complex. The previous results are due to interactions presented by each metabolite with the subunit of the evaluated complex. In the case of complex I, interactions with residues such as Ile 235, Tyr 295 and Tyr 173 were observed, while in the case of complex III, relevant interactions with Phe 275, Leu 295 and Ile 147. Regarding the *in vivo* phase, carvacrol presented an LC<sub>50</sub> of 37,4 ppm and 34,5 ppm for 24 and 48 hours, respectively, and farnesol obtained an LC<sub>50</sub> of 9,78 ppm and 8,73 ppm, at 24 and 48 hours, respectively. The enzymatic activity evaluated in the *in vitro* phase showed an inhibition for carvacrol, with enzymatic activities of 66,4%, 39,11% and 5,6% for NADH oxidase, NADH dehydrogenase and NADH cytochrome c reductase, respectively. For its part, farnesol obtained an inhibition, with activities of 5,9% and 19,98% for NADH oxidase and NADH dehydrogenase, while for NADH cytochrome c reductase its activity increased with 342,08%, compared to the control. In this way, the metabolites evaluated in this study are presented as promising natural alternatives for the control of the vector, due to the alteration of the activity of the enzymes of the respiratory chain of the individual. In addition, the effectiveness of *in silico* studies for preliminary evaluation of future compounds is demonstrated.

## INTRODUCCIÓN

El vector *Aedes aegypti*, constituye un foco de interés investigativo para la salud pública, ya que la hembra de esta especie, en caso de estar infectada, es capaz de transmitir diversos virus como el dengue (DENV), Zika (ZIKV), y el chikungunya (CHIKV) principalmente (Byers et al., 2019), siendo el DENV el virus de mayor incidencia transmitido por artrópodos (Iqra, 2020). Por esto, los gobiernos de la Región de las Américas, y muchas zonas tropicales, han intervenido con mecanismos de control y prevención de vectores transmisores (Weaver et al., 2009), ya que las enfermedades virales, constituyen una problemática de salud pública que tiene grandes repercusiones sociales y económicas, causando agravios en la calidad de vida de las personas infectadas (Organización Panamericana de la Salud, 1998; Elson et al., 2020).

La dinámica de transmisión de algunas de estas enfermedades víricas está estrechamente asociada con la capacidad de expansión de los vectores que las transmiten. En el caso del *Ae. aegypti*, debido a los recientes cambios climáticos, se ha visto un aumento de la especie en zonas tropicales y subtropicales, haciendo que las poblaciones sean más propensas a las enfermedades transmitidas por este vector (Kendall et al., 2010).

Dentro de las estrategias de control del vector *Ae. aegypti*, se encuentran las campañas preventivas que suele implementar el gobierno, como evitar el asentamiento de aguas y la limpieza constante en las comunidades (Cheng et al, 2003).

En la actualidad, se presentan múltiples opciones de insecticidas de origen natural y sintético, estos últimos suponen problemas ambientales y de salud, ya que afectan el aire, el agua, los suelos, la vida silvestre, y al mismo ser humano cuando se hace una manipulación inadecuada o se conservan a lo largo del tiempo en su entorno (Sisay, et al. (2019); Gunther & Jeppson, 1969), y

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

adicionalmente, los vectores desarrollan resistencia a estos insecticidas sintéticos (Pimsamarna et al., 2009; Melo et al., 2010; Rodríguez et al; 2005). La implementación de métodos naturales, como aceites esenciales y sus metabolitos, se convierte en una opción viable, en cuanto a costos, efectividad y potencial bioactivo para el control vectores, con un bajo impacto en el medio ambiente (Mossa et al., 2016; Regnault, 1997), por lo que la implementación de estudios sobre opciones naturales se convierte en una necesidad.

Mediante este trabajo de investigación, se buscó identificar metabolitos naturales que puedan ser usados como alternativa para el control de *Ae. aegypti*, presenta una visualización general de la problemática y aspectos teóricos que envuelven el estudio, donde se da a entender cómo la modulación de la bioenergética mitocondrial es una diana farmacológica para el diseño de insecticidas naturales.

Luego, se presenta una descripción de la metodología, comenzando con la selección de los metabolitos de plantas a los cuales se les realizó un análisis *in silico*, por medio de docking molecular. Los metabolitos promisorios se evaluaron mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*, comprobando su actividad larvicida en *Ae. aegypti* sobre los complejos de la cadena transportadora de electrones mitocondrial.

### **1. Marco de referencia y antecedentes**

#### **1.1. *Aedes aegypti***

El mosquito *Ae. aegypti*, es el principal vector transmisor de virus como el dengue (DENV) y Zika (ZIKV), pertenecientes a la familia de *flavivirus*, y el chikunguya (CHIKV), de la familia de *togavirus* (Weaver et al., 2009; Vasilakis & Gubler, 2016). En el año 2022, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) notificó 1,881,352 casos de DENV, 170,175 casos de CHIKV y

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

170,175 casos de ZIKV, en las Américas y el Caribe para la semana epidemiológica 25 del 2022, en las Américas y el Caribe (OPS, 2022). Por su parte, en Colombia, hasta la semana epidemiológica 13 del año 2022, se notificaron 29.475 casos de DENV, 110 casos de CHIKV y 80 casos de ZIKV, ocupando el puesto 5 a nivel mundial en incidencia (INS, 2022).

Actualmente, se adelantan estudios para lograr obtener una vacuna o medicamento para estas enfermedades víricas (Mura & Tournier, 2020; Halstead, 2018), sin embargo, no se ha encontrado un fármaco que las combata efectivamente, más allá de los que se centran en aliviar los síntomas (Xie et al., 2009).

En consideración con lo anterior, los gobiernos deben seguir fomentando el estudio y fabricación de insecticidas que tengan características óptimas para hacer frente al problema epidemiológico, dado que no hay vacuna ni tratamiento, la principal opción es la prevención y control del vector, por lo que el diseño de insecticidas eficaces y estables con el ambiente son necesarios.

### **1.2. Características de un insecticida ideal y su mecanismo de acción**

Los pesticidas cumplen diferentes funciones; como repelentes, agentes de control de crecimiento, reducción de huevos, entre otros, siendo el enfoque principal en todos los casos erradicar el vector, teniendo gran especificidad, baja toxicidad en los humanos, baja dosis letal, y u bajo coste (Arun et al., 1980). El *Ae. aegypti* se controla mediante larvicidas, que pueden estar compuestos de fosforotionato, metopreno y piriproxifeno (Rodriguez et al., 2004) o mediante adulticidas compuestos de piretroides y organofosforados, principalmente (Bisset et al., 2002). Sin embargo diversos estudios demuestran, que la especie presenta resistencia a insecticidas sintéticos debido a altos niveles de esterasa no específica y actividad oxidasa de función mixta (Ocampo et

al., 2011; Pimsamarna et al., 2009; Melo et al., 2010; Rodríguez et al.; 2005), por lo que los insecticidas biológicos se convierten en una opción viable ya que reducen los riesgos de resistencias y minimizan la toxicidad al medio ambiente (Berticat et al. 2008). Existen pesticidas a base de aceites naturales, extraídos de especies herbáceas como *cardiopteridaceae* y *myrtaceae*, los cuales tienen un olor característico, así como otras sustancias tales como el butóxido de piperonilo, N-octilbicyclohepteno dicarboximide y los potenciadores de los piretroides (Sunaiyana et al., 2014). Estos pesticidas, ejercen acción en diferentes dianas del vector que se quiere erradicar, como la mitocondria, la cual representa uno de los organelos celulares más importantes, encargada no solo de la producción de energía en la célula, sino que a su vez desencadena distintos procesos de inducción de muerte celular (Detmer & Chan, 2007).

### **1.3. La mitocondria como target para el diseño de insecticidas**

La mitocondria es el organelo encargado de la producción de ATP, y por tanto de generar energía dentro de la célula (Detmer & Chan, 2007). La producción de energía en la célula se da gracias a la cadena respiratoria mitocondrial, compuesta por cinco complejos donde los primeros cuatro, se encargan del flujo de electrones y creación de potencial de membrana mitocondrial, para finalizar el proceso en la ATP sintasa, encargada de sintetizar el ATP (Sousa et al., 2018). Este proceso comienza cuando el NADH se oxida por acción del complejo I o NADH deshidrogenasa (Figura 1), donando sus electrones. Una vez allí, se genera la energía para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, pasando los electrones a la coenzima Q (Figura 1. CoQ). Más adelante, el FADH<sub>2</sub> es oxidado a FAD<sup>+</sup>, por acción del complejo II o succinato deshidrogenasa (Figura 2), llevando los electrones a la coenzima Q (siendo la CoQ, el aceptor de electrones común del complejo I y II), para luego pasar estos electrones al complejo III (nombre del complejo) (Figura

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

1.), que, transporta los electrones hasta el citocromo C (Cyt C) (Figura 1), y posteriormente el Cyt C es oxidado por el complejo IV (figura 1), quien a su vez entregará estos electrones al oxígeno para formar dos moléculas de agua, y el potencial electroquímico que será finalmente utilizado por el ATP sintasa (Figura 1), para convertir el ADP en ATP por acción del complejo V o ATP sintasa (Sousa et al., 2018).

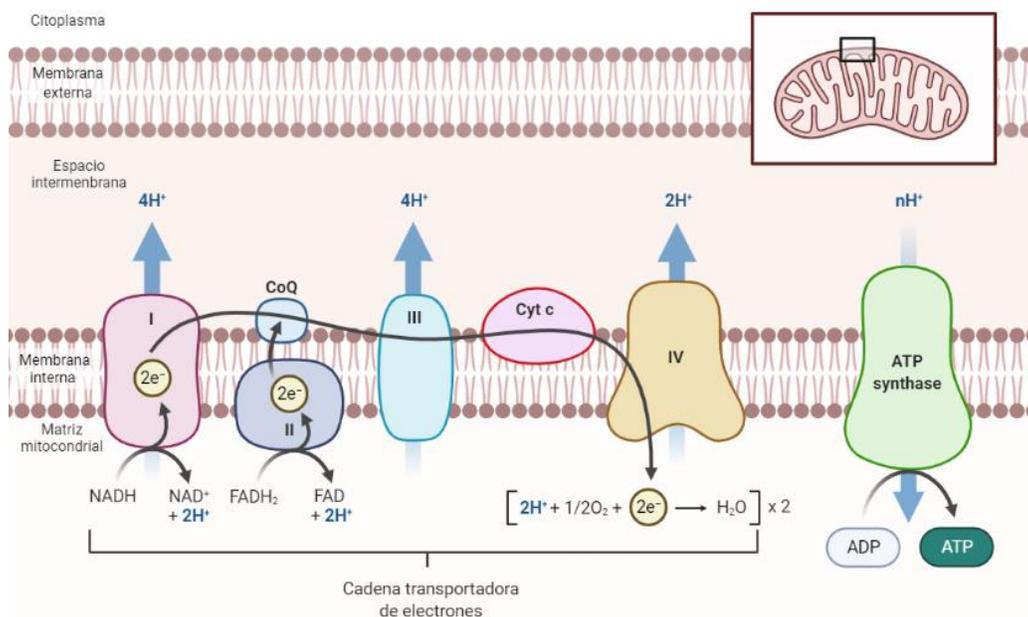


Figura 1. Cadena transportadora de electrones, I: complejo NADH deshidrogenasa; II: complejo succinato deshidrogenasa; III: complejo ubiquinol-citocromo-c reductasa, IV: complejo citocromo c oxidasa; CoQ: coenzima 10 o ubiquinona (adaptada de BioRender).

Además de ser el inicio de la fosforilación oxidativa, el complejo I, al ser inhibido se encuentra involucrado en el desarrollo de diversas enfermedades en el ser humano como síndrome de Leigh, la neuropatía óptica hereditaria de Leber y el síndrome de MELAS (Wallace et al., 1988; Holt et al., 1988), por lo que puede ser una diana para generación de insecticidas potentes.

#### **1.4. Complejo I**

El complejo I o NADH: ubiquinona oxidorreductasa (Figura 1.), es el complejo proteico mitocondrial más grande de la cadena respiratoria, con un tamaño aproximado 1.000 kDa, que se encarga de acoplar la transferencia de electrones, gracias a la flavina mononucleótido (FMN) como grupo prostético y a ocho clústeres hierro-azufre (Fe-S) (Rich & Maréchal, 2010). El complejo consta de 14 subunidades centrales que albergan funciones bioenergéticas, y un gran número de subunidades accesorias (Dröse & Brandt, 2012; Sharma et al., 2009). La subunidad ND5 hace parte del ensamblaje mitocondrial esencial del complejo I, esta subunidad es muy hidrofóbica e ingresa de forma co-traducciona en la membrana mitocondrial con diferentes estiramientos transmembrana (Nakamaru et al., 2010; Masatoshi et al., 2015).

La importancia de la inhibición de este complejo se da, ya que, una vez se interrumpa el flujo de electrones, se podría evitar la producción de ATP, disminuyendo así, la actividad catalítica y aumentando la fuga de electrones al oxígeno generando así especies reactivas de oxígeno (Dröse & Brandt, 2012).

##### **1.4.1. Inhibición en el complejo I**

La inhibición en el complejo I, consiste en una interrupción en la transferencia de electrones, donde diversos compuestos se encargan de impedir el flujo de estos, y así reducir la producción de ATP, produciendo la muerte de los individuos (Pryde & Hirst, 2011). La rotenona es la principal molécula conocida por su eficiencia y especificidad inhibiendo la oxidación de NADH por el complejo I, aumentando la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las mitocondrias. (Pryde & Hirst, 2011; King et al., 2009).

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Por otro lado, se tiene el amital (figura 2.), el cual también se encarga del bloqueo de flujo de electrones, afectando la oxidación dependiente de  $\text{NAD}^+$  (Slater, 1976). Así como la piericidina A, que tiene como objetivo biológico la inhibición respiratoria mitocondrial (Jeng et al, 1968).

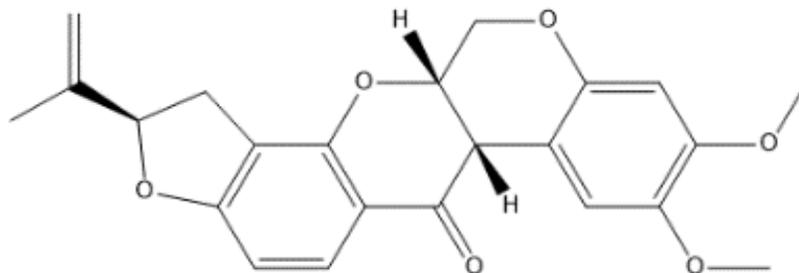


Figura 2. Estructura química de amital.

Al igual que el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, el complejo III juega un papel importante en la transferencia de electrones desde el ubiquinol al citocromo c.

### 1.5. Complejo III

El ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa, o complejo III, (Figura 1) es una proteína transmembrana con un tamaño aproximado de 490 kDa. Está conformado por dos monómeros de 11 subunidades que catalizan el flujo de electrones del ubiquinol al citocromo c y también bombean cuatro protones a través de la membrana (Covian & Trumpower, 2006). Este complejo está conformado por cuatro grupos prostéticos redox activos y un centro Fe-S, también un citocromo c1 con un grupo hemo c y un citocromo b con dos grupos hemo b (Yu et al., 2013).

Con la inhibición del 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.

### 1.5.1. Inhibición en el complejo III

La inhibición del ubiquinol citocromo c reductasa, se divide en dos tipos, una, la cual actúa dirigiéndose al sitio de oxidación del ubiquinol  $Q_P$ , en este tipo se encuentra el mixotiazol, que evita el paso de electrones desde  $UQH_2$  hasta la proteína de Rieske (Rich & Maréchal, 2010) y también la estigmatelina; y por otro lado, la inhibición que ocurre en la unión al sitio  $Q_N$ , como por ejemplo, la antimicina A, la cual actúa desde el citocromo bH, evitando el flujo de electrones hasta la ubiquinona (Esser et al., 2004) .

Por otro lado, el antibiótico antimicina A (figura 3.) actúa uniéndose de forma irreversible al sitio de reducción de la ubiquinona  $Q_N$ , inhibiendo oxidación del ubiquinol al evitar el flujo de electrones entre el citocromo b y el citocromo c1 (Mellors & Tappel 1966). Por otro lado, el mixotiazol es un antifúngico, el cual tiene una afinidad con el sitio  $Q_P$  (Esser et al., 2004), inhibiendo allí la formación de semiquinona, desplazando el ubiquinol de su sitio de unión produciendo así, la formación de  $H_2O_2$  (Gerth et al., 1980).

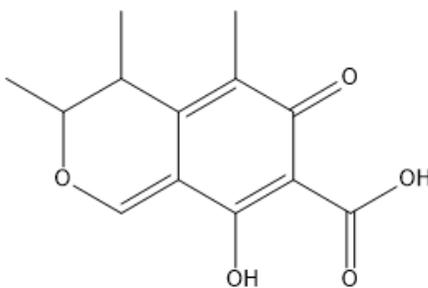


Figura 3. Estructura química de antimicina A.

Adicionalmente, el Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología GIBIM y el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CINTROP de la Universidad Industrial de Santander, ha realizado estudios previos con metabolitos de plantas medicinales, en donde se logró

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

determinar siete metabolitos (acetato de geranilo,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno, geraniol, 1,8-cineol, nerol y n-octanol), que presentaron actividad larvicida contra *Ae. aegypti*, donde geraniol inhibió el complejo I y  $\alpha$ -humuleno y el  $\beta$ -cariofileno inhibieron el complejo III (Borrero et al., 2019), demostrando que inhibidores de estos complejos presentan actividad larvicida contra *Ae aegypti*.

### **1.6. Métodos computacionales para el diseño y análisis de fármacos**

Los costos para la producción de productos y descubrimiento de nuevos fármacos pueden oscilar entre 1 y 2 mil millones de dólares (USD), y un tiempo hasta de 15 años (Myers & Baker, 2001). El diseño de compuestos y su análisis con respecto a ciertas proteínas por medio de recursos computacionales resulta ser un paso clave a la hora clasificar candidatos para el desarrollo de productos como medicamentos, tratamientos e insecticidas, entre otros, de forma eficaz y económicamente rentable.

Entre los enfoques computacionales para obtener información relevante, como características de cierto fármaco, está la evaluación de las propiedades ADME, las cuales describen las cualidades aptas para considerar un compuesto útil, según Lipinski, el cual planteó una serie de reglas con las que se puede hacer un filtro de compuestos válidos en 1997 (Lipinski et al., 1997).

Por otro lado, el docking molecular, es otra técnica que permite encontrar compuestos que sean energéticamente favorables al interaccionar con una proteína (Hltje et al., 2003). Para esta metodología se maneja 3 tipos de enfoques: en el primer caso, la proteína y el ligando se toman como estructuras rígidas, así que se analiza la posición de cada uno en el espacio; en el segundo caso, únicamente el compuesto o ligando se considera flexible, por lo que se busca la estructura del ligando espacial y geoméricamente óptima para la unión con la proteína; y por último, se

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

consideran, tanto la proteína como el compuesto flexibles, por lo que el enfoque de búsqueda se hace más amplio (Hltje et al.,2003; Xiao & Williams, 1994; Yang & Kao, 2000).

Estos procesos de simulación computacional pueden ser herramientas que aumenten el conocimiento y optimicen procesos gracias a las predicciones previas o posteriores a la validación experimental haciendo que los enfoques resulten ser más precisos en el proceso de desarrollo de moléculas.

El interés de descubrimiento de compuestos naturales para fines insecticidas de manera computacional y experimental abre campo a plantear el objetivo de este trabajo. Para facilitar el entendimiento y dado la cantidad de resultados obtenidos en la investigación se dividió el documento en dos capítulos, donde el capítulo 1 abarca la fase *in silico*, mientras que el capítulo 2 comprende la fase *in vivo* e *in vitro*.

El presente trabajo de investigación describe el estudio de los complejos mitocondriales I y III, haciendo parte del macroproyecto: “Desarrollo de nuevos productos con actividades antimicrobiana, insecticida y repelente a partir de moléculas aisladas de plantas aromáticas colombianas” del programa Bioreto XXI-15:50, el cual tiene como objetivo diseñar, sintetizar y evaluar formulaciones de aceites esenciales y extractos de plantas vegetales para mejorar sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, insecticidas y repelentes probados en *in vitro*.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Identificar metabolitos secundarios de plantas con actividad larvicida en *Ae aegypti* usando la mitocondria como diana farmacológica.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar mediante técnicas *in silico* metabolitos de plantas medicinales con posible actividad larvicida teniendo como diana la mitocondria.
- Determinar la actividad larvicida de los metabolitos identificados en *Ae aegypti*.
- Evaluar el efecto de los metabolitos con mejor actividad larvicida sobre la bioenergética mitocondrial.

**Capítulo 1. Análisis *in silico* de metabolitos de plantas que afectan los complejos mitocondriales I y III de mosquitos *Aedes aegypti***

El análisis computacional que se presenta en este capítulo abarca diversas técnicas las cuales son herramientas claves para determinar la forma y modo de unión de las proteínas mitocondriales estudiadas con compuestos de origen natural que hacen parte de plantas y sus aceites esenciales, dando una visión previa al estudio experimental de laboratorio para hacer un acercamiento a los resultados que se pueden obtener en este. Para este fin, se elabora un modelo *in silico* de cada proteína y una preparación de los compuestos, y se hace cumplimiento del primer objetivo específico de la investigación.

**1. Objetivo específico**

Identificar mediante técnicas *in silico* metabolitos de plantas medicinales con posible actividad larvicida teniendo como diana la mitocondria.

## 2. Metodología de fase *in silico*

La metodología descrita en la figura 4 describe las fases computacionales para el cumplimiento del primer objetivo específico del proyecto de investigación: Fase preliminar y fase *in silico*.

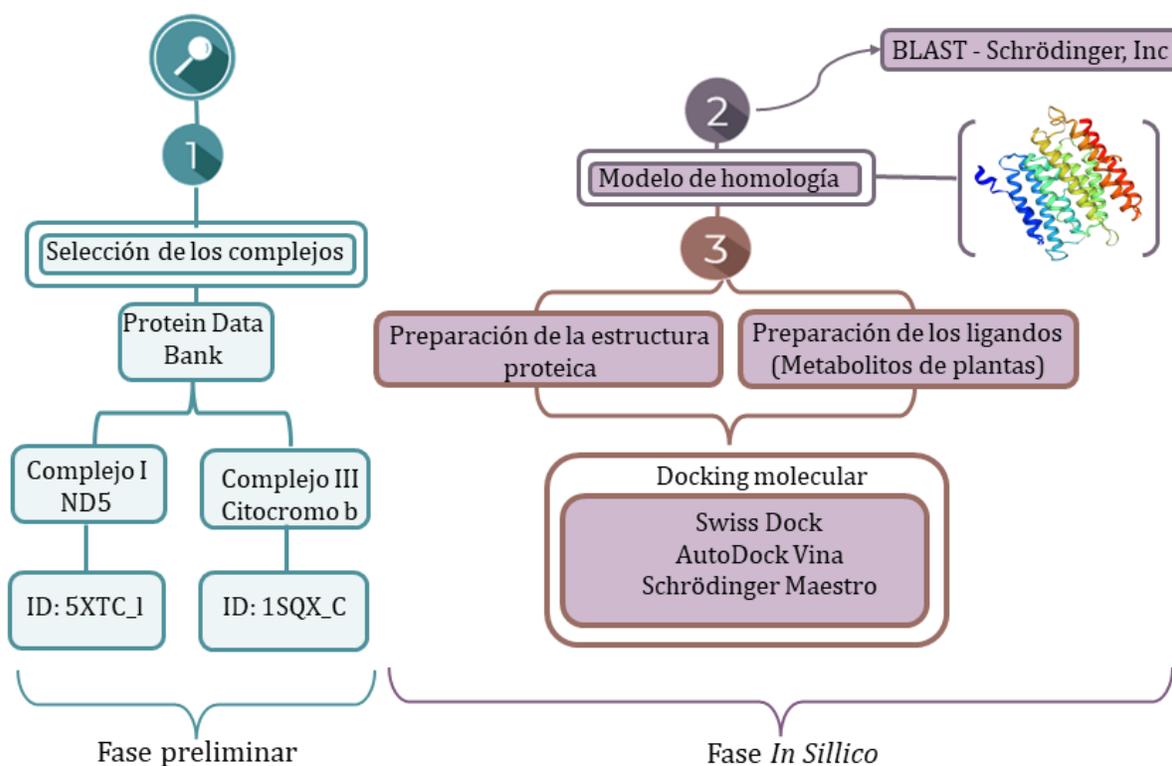


Figura 4. Esquema metodológico computacional del proyecto de investigación.

### 2.1. Fase preliminar

Se identificaron 226 metabolitos secundarios de aceites esenciales provenientes de plantas con actividad insecticida registrada en la literatura (Anexo 1). De acuerdo con estos compuestos se creó una base de datos, tomando la estructura en formato SDF de cada uno,

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

obtenidas de la plataforma Pubchem, para realizar la siguiente fase en el programa Maestro (Schrödinger, Inc.).

### 2.2.Fase *in silico*

#### 2.2.1. Modelo de homología

Dado que la estructura cristalina de las subunidades 5 y cyt b de los complejos I y III, respectivamente, para *Ae. aegypti* no se encuentra reportada en la literatura, se utilizaron criterios de similitud para la selección de plantillas de los complejos teniendo en cuenta la semejanza de secuencias de aminoácidos. La secuencia FASTA de cada subunidad se importó por medio de las bases de datos Uniprot (Uniprot, 2019); para el complejo I, se seleccionó la subunidad 5 con ID: B0FWD3, y para el complejo III se tomó la subunidad Cyt B con ID: B0FWD7 (Lobo et al.,2007).

Con ayuda del software BLAST Homology Search se identificó el template modelo de cada complejo: template complejo I (subunidad 5) PDB ID: 5XTC\_1 (3.70 Å) de la especie *Homo sapiens* (Arimori et al.,2017) con una identidad de 39%, y template complejo III (subunidad cyt b) PDB ID: 1SQX\_C (2.60 Å) con una identidad de 68% de la especie *Bos taurus* (Esser et al.,2004). Para la creación del modelo de homología de cada proteína se empleó el software Prime, accesible a través de la interfaz Maestro (Schrödinger, Inc.), haciendo la alineación de secuencia con los valores predeterminados del programa. A continuación, el sistema se sometió a minimización de energía y refinamiento de loops, solucionando los problemas estructurales, agregando átomos de hidrógeno de acuerdo con el pH fisiológico (7.4), identificando cadenas laterales y residuos faltantes utilizando el campo de fuerza del OPLS3e y un modelo de solvatación VSGB, para finalmente validar el modelo conseguido (Unwalla et al., 2010; Sartry et al., 2013; Pietro et al., 2016; Martin, 2009).

### **2.2.2. Preparación de ligandos y screening virtual**

Los ligandos seleccionados se prepararon por medio de la herramienta LipPrep Schrödinger, Inc. Esta preparación incluyó la configuración de quiralidad y estereoisomería, configuración de más baja energía, generando todos los estados de protonación posibles en un rango de pH de  $7.2 \pm 0.2$  y tautómeros basados en el valor de pKa teórico calculado, entre otros ajustes predeterminados del programa (Pietro et al., 2016; Martin, 2009). Una vez preparados los ligandos, se procedió a evaluar las propiedades ADME por medio de la interfaz QikProp de Maestro, Schrödinger, Inc correspondientes a cada uno de ellos, donde se analiza los tipos de átomos y las cargas, los recuentos de rotores y el volumen y el área de superficie de la molécula de muestra. Luego, QikProp usa esta información, junto con los descriptores físicos calculados, en ecuaciones de regresión. El resultado es una predicción precisa de las propiedades farmacológicamente relevantes de una molécula y la predicción del perfil ADME de estos compuestos, y, de esta manera prever alguna violación de las reglas de Lipinski. (Natarajan A, et al., 2015), entre los valores analizados se evaluó el peso molecular, el coeficiente de partición octanol/agua ( $\log P$ ), puentes de hidrógeno donados y aceptados por el soluto a moléculas de agua y el área de superficie polar molecular (PSA, Polar Surface Area).

Adicionalmente se analizó el valor de  $CI_{50}$  previsto para el bloqueo de los canales HERG  $K^+$  (LogHERG), la absorción oral humana, la permeabilidad cutánea ( $\log K_p$ ), entre otras, como se evidencia en el Anexo 2.

### **2.2.3. Docking molecular**

El docking se llevó a cabo empleando Glide (Schrödinger, Inc) (Friesner et al., 2004; Halgren et al., 2004) considerando los ligandos como flexibles, con una caja para cada subunidad de los

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

complejos: Complejo I, con una caja donde se identificó el sitio de unión por medio de la aplicación SiteMap (Schrödinger, Inc), el cual resalta las regiones dentro del sitio de unión adecuadas para ser ocupadas por grupos hidrófobos o por ligandos, con coordenadas  $X = 316.82$ ,  $Y = 268.38$ ,  $Z = 220.52$  y una dimensión suficiente para acomodar los ligandos con una longitud  $\leq 15\text{Å}$ ; Complejo III con una caja de acoplamiento (grid) centrada en los residuos Phe274, Tyr273, Tyr131, ya que de acuerdo a la literatura, estos residuos aminoacídicos representan el sitio activo de la subunidad (Xiao et al., 2014) y una dimensión de  $\leq 15\text{Å}$  de longitud. El acoplamiento se desarrolló a diferentes niveles de precisión, de menor a mayor precisión SP (precisión estándar) y XP (extra precisión): inicialmente a un total de 209 metabolitos, se le realizó docking SP, para luego pasar por un proceso de discriminación, teniendo en cuenta el rango de precios, y la puntuación de docking SP; y finalmente, a los 21 metabolitos seleccionados de acuerdo a los anteriores criterios, se les realizó un docking XP, donde las poses mejor ranqueadas se les realizó una inspección visual por interacciones comunes (Dharmagadda et al., 2005) y una inspección de interacciones por medio de la interfaz PLIP (Protein-Ligand Interaction Profile), la cual utiliza el cribado basado en interacciones, en contraste con los enfoques basados en ligandos y targets, en base a la estructura química o proteica, respectivamente (Halgren T et al., 2004; Adasme et al. PLIP, 2021; Salentin et al., 2015; Batista & Bajorath, 2010).

Finalmente, a dichas poses, se les realizó el debido análisis de la energía de afinidad (MM-GBSA) por medio de la interfaz Prime, Schrödinger, Inc, para predecir la energía libre entre receptor y ligandos, y así, obtener la mejor selección de los metabolitos más aptos para la inhibición de los complejos. (Singh & Muthusamy, 2013).

#### 2.2.4. Visualización

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

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Modelo de Homología

##### 3.1.1. Complejo I, Subunidad 5

El modelo de homología para la subunidad 5 (Figura 5.) se diseñó comparando la secuencia B0FWD3 (Uniprot, 2019) con la estructura cristalina de código PDB: 5XTC\_1 (3.70 Å) (Figura 5.), obteniendo una identidad de homología máxima del 39% y un score de 767.0, con los respectivos arreglos de refinamiento y minimización del sistema.

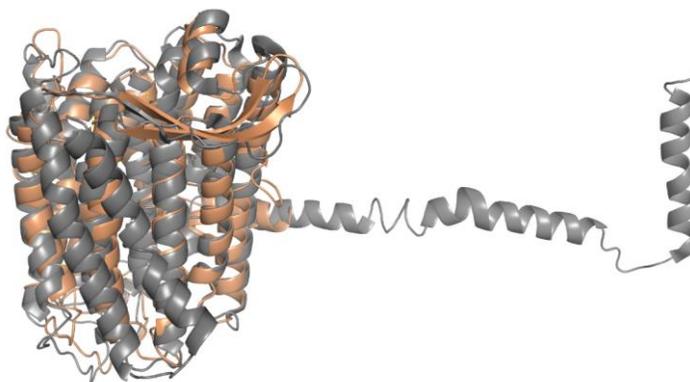


Figura 5. Modelo de homología creado (color naranja) alineado con un template PDB: 5XTC\_1 (3.70 Å) (color gris) para la subunidad 5 del complejo I.

La enzima modelada (Figura 5, color naranja) es considerada uno de los antiportadores de electrones del complejo I, siendo de este, la subunidad terminal (Hannah et al., 2011), contiene una hélice discontinua de superficie lateral larga la cual une los dos módulos del brazo de membrana en

el complejo total (Christophe et al., 2016), y aunque en la literatura se identifican 16 hélices transmembrana (Hannah et al., 2011), el modelo creado consta de 2 láminas  $\beta$  y 14 hélices alfa, donde gran parte de los 54 residuos conservados en la subunidad caen dentro de las hélices, apoyando sus roles propuestos en la translocación de protones.

### 3.1.1.1. Validación Modelo de Homología Complejo I

El modelo creado se compone de 487 residuos de aminoácidos, calculando la desviación cuadrática media (RMSD) de los carbonos  $\alpha$  en la interfaz Maestro (Schrödinger Inc.), con un valor de 1.926 Å, y un puntaje de alineamiento de 0.152, siendo este valor el que mide la calidad de reproducción del modelo. El RMSD se calcula basándose únicamente en aquellos residuos que se han alineado con éxito y, por lo tanto, no representa una comparación general de las estructuras. En cuanto a la puntuación de alineación, si el valor es superior a 0.7, indica que no hay suficiente similitud estructural para una alineación significativa, por lo que se considera en este caso un modelo representativo (Schrödinger Release, 2021).

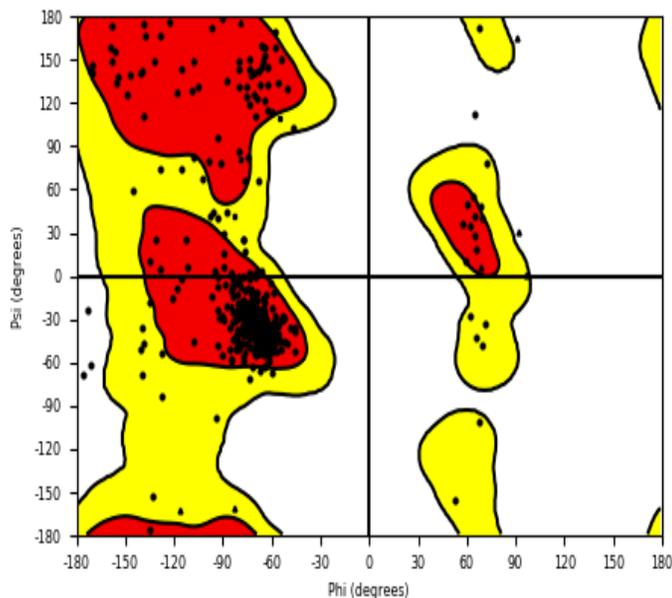


Figura 6. Gráfica de Ramachandran del modelo creado a partir del complejo I.

Se observó que el modelo predicho tiene un 98.7% (481) de aminoácidos en la región permitida después del refinamiento del loops, lo que confirma la confiabilidad de la estructura, de acuerdo a su gráfica de Ramachandran (Figura 6.). Este modelo fue obtenido gracias a la exploración de estructuras plantilla de macromoléculas del programa Maestro (Schrödinger Inc.), y aunque el homólogo propuesto se considera de baja identidad, la optimización de dicho modelo, lo hace útil para predecir datos experimentales.

### 3.1.2. Complejo III, Subunidad citocromo b

El modelo de homología para la subunidad cyt b (Figura 7.) se diseñó comparando la secuencia B0FWD7 (Uniprot, 2019) con la estructura cristalina de código PDB: 1SQX\_C (2,60 Å) (figura 7.), el cual obtuvo en un porcentaje de identidad del 68%.

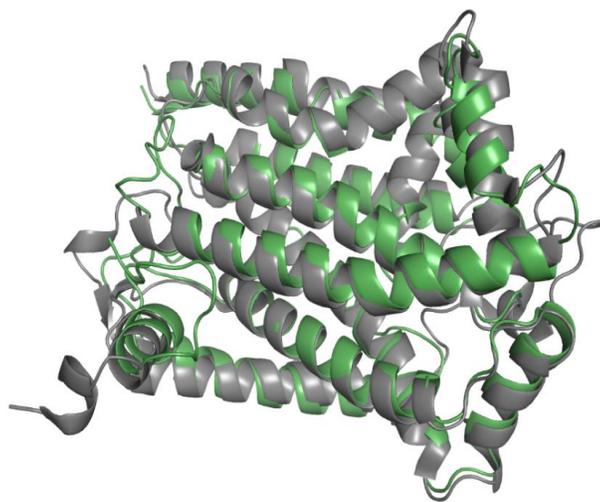


Figura 7. Modelo de homología creado (color verde) alineado con un template PDB: 1SQX\_C (2.60 Å) (color gris) para la subunidad cyt b del complejo III.

El modelo creado (Figura 7) consta de 10 hélices alfa, asociadas a los 383 residuos que lo componen, debido a su alta identidad, se acopla de forma significativa con la plantilla de la proteína (Figura 7, color gris), por lo que se confirma que los hemos bL y bH están cerca de los lados de la

matriz y la intermembrana, respectivamente, con una distancia entre ellos de 20,1 Å, tal como ocurre en la proteína template, con una distancia de 20,6 Å entre los grupos hemo (So Iwata et al., 1998).

### 3.1.2.1. Validación Modelo de Homología Complejo III

El modelo creado para la subunidad cyt b se compone de 383 residuos de aminoácidos, calculando la desviación cuadrática media (RMSD) de los carbonos  $\alpha$  en Maestro (Schrödinger Inc.), con un valor de 1,937 Å, y un puntaje de alineamiento de 0,150, mostrando ser un modelo válido ya que con valores inferiores a 0,7 son considerados modelos aceptables (Schrödinger Release, 2021).

La gráfica de Ramachandran (Figura 8.) muestra que el modelo predicho tiene un 99.2% (380) de aminoácidos en la región permitida después del refinamiento del loops, lo que confirma la confiabilidad de la estructura por su alto porcentaje de identidad. Este modelo fue obtenido gracias a la exploración de estructuras de la plantilla de macromoléculas del programa Maestro (Schrödinger Inc.).

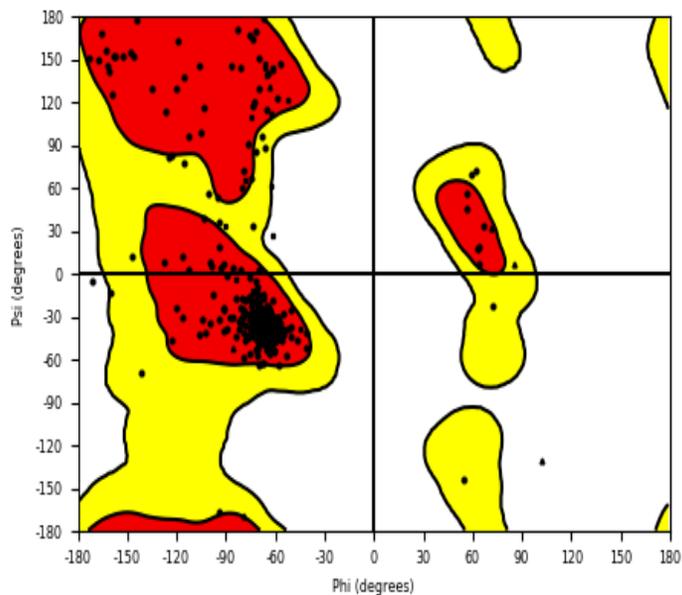


Figura 8. Gráfica de Ramachandran del modelo creado a partir del complejo III.

### 3.2. Docking molecular

Después de la detección virtual de docking en SP y XP para la base de datos de 226 metabolitos, donde se evaluó el acoplamiento de precisión estándar y de extra precisión, y en base a los valores obtenidos de las propiedades ADME, el rango de precios para moléculas insecticidas y las características de las moléculas, se hizo un proceso de discriminación donde se seleccionaron dos metabolitos para la evaluación del acoplamiento molecular, tanto en el complejo I como en el complejo III: carvacrol y farnesol (figura 9). El análisis farmacocinético de estos compuestos mostró que son solubles o medianamente solubles en agua, con alta absorción gastrointestinal, también pueden ser capaces de atravesar la barrera dérmica (Wan, 2013).

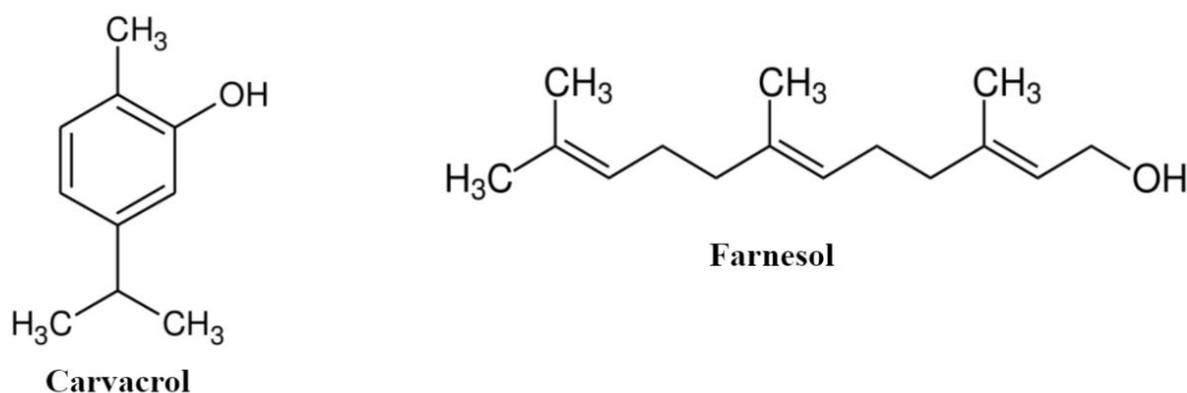


Figura 9. Estructura química metabolitos seleccionados: carvacrol, farnesol.

#### 3.2.1. Complejo I, Subunidad 5

Previo a realizar el análisis computacional de los metabolitos seleccionados, se hizo el análisis de interacción entre piericidina A y mucidina (estrobilurina A) inhibidores reportados del complejo I (Muhayimana, et al., 2019; You, et al., 2021), con el fin de tener compuestos de referencia que interactúen con la subunidad de interés (figura 10).

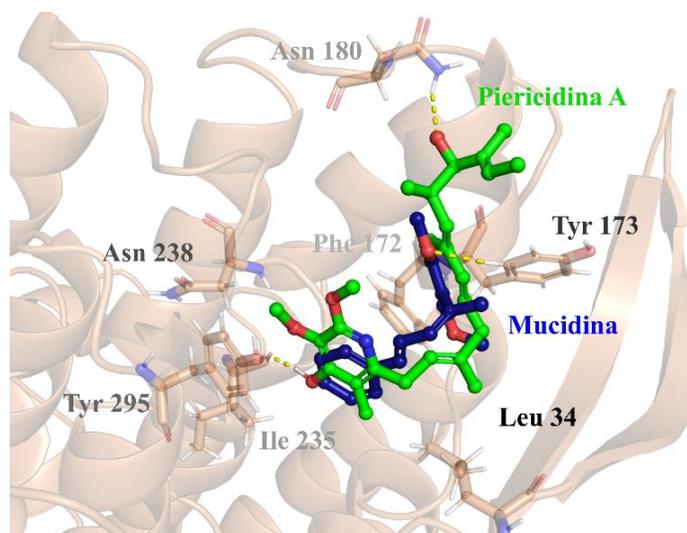


Figura 10. Visualización de interacción ligandos inhibidores en el complejo I, donde la piericidina A (verde), interactúa con puente de hidrogeno con los residuos Ile 235 y Asn 180; y la mucidina (azul) con el residuo Tyr 173. Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, naranja claro; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando de puente de hidrógeno están representadas por líneas discontinuas amarillas.

Por otra parte, por medio de enfoques computacionales, se realizó el análisis del acoplamiento molecular SP y XP a un total de 226 compuestos insecticidas naturales reportados previamente en la literatura (Anexo 1), con la proteína del complejo I, tomando los 10 mejores como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de docking molecular y energía de afinidad para los 10 mejores compuestos con actividad insecticida reportada para el complejo I.

Compuesto	MMGBSA dG Bind (Kcal/mol)	Docking score
<b>Quercetina</b>	<b>-42,32</b>	<b>-6,913</b>
<b>Carvacrol</b>	<b>-36,47</b>	<b>-4,435</b>
Timol	-36,71	-4,340
Valenceno	-32,77	-4,275
Xantona	-41,77	-4,267

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

P-Cimeno	-30,30	-3,624
<b>Farnesol</b>	<b>-42,13</b>	<b>-3,234</b>
Delta-3-Careno	-27,09	-3,176
<b>N Octanol</b>	<b>-29.37</b>	<b>-2.393</b>
<b>Ácido laurico</b>	<b>-29.47</b>	<b>-1.391</b>

Como se muestra en la Tabla 1, el acoplamiento molecular sugiere compuestos adicionales a los fármacos de referencia (figura 10) que pueden inhibir las proteínas mitocondriales. Los compuestos seleccionados para la evaluación mitocondrial fueron quercetina, carvacrol, farnesol, n octanol y ácido laurico de acuerdo con la suma de un conjunto de características como sus propiedades fisicoquímicas, disponibilidad, valores de acoplamiento y afinidad. Los compuestos presentaron tres tipos de interacciones. Carvacrol es un compuesto destacado que presentó 6 interacciones con la subunidad. Mediante inspección visual se observan dos interacciones puente de hidrogeno con los residuos Ile 235 y Asn 238, a una distancia de 1,69 Å, y 2,98 Å respectivamente, (Figura 11.B), tres interacciones de tipo hidrofóbico con los residuos Phe 172, Ile 239, Tyr 295, y una interacción  $\pi$ - $\pi$  con el residuo Tyr 295, siendo algunos de estos residuos, conservados en la proteína ND5 del complejo I, según la literatura (Wojtek Steffen et al., 2010).

Por otro lado, las interacciones presentadas por farnesol, otro compuesto destacado, son en su mayoría de tipo hidrofóbicas, con los residuos Leu 34, Tyr 36, Leu 55, Phe 172, Tyr 173 y Met 176, además, presenta una interacción polar con el residuo Ile 235 formando un puente de hidrogeno con la proteína como se observa en la figura 11. C.

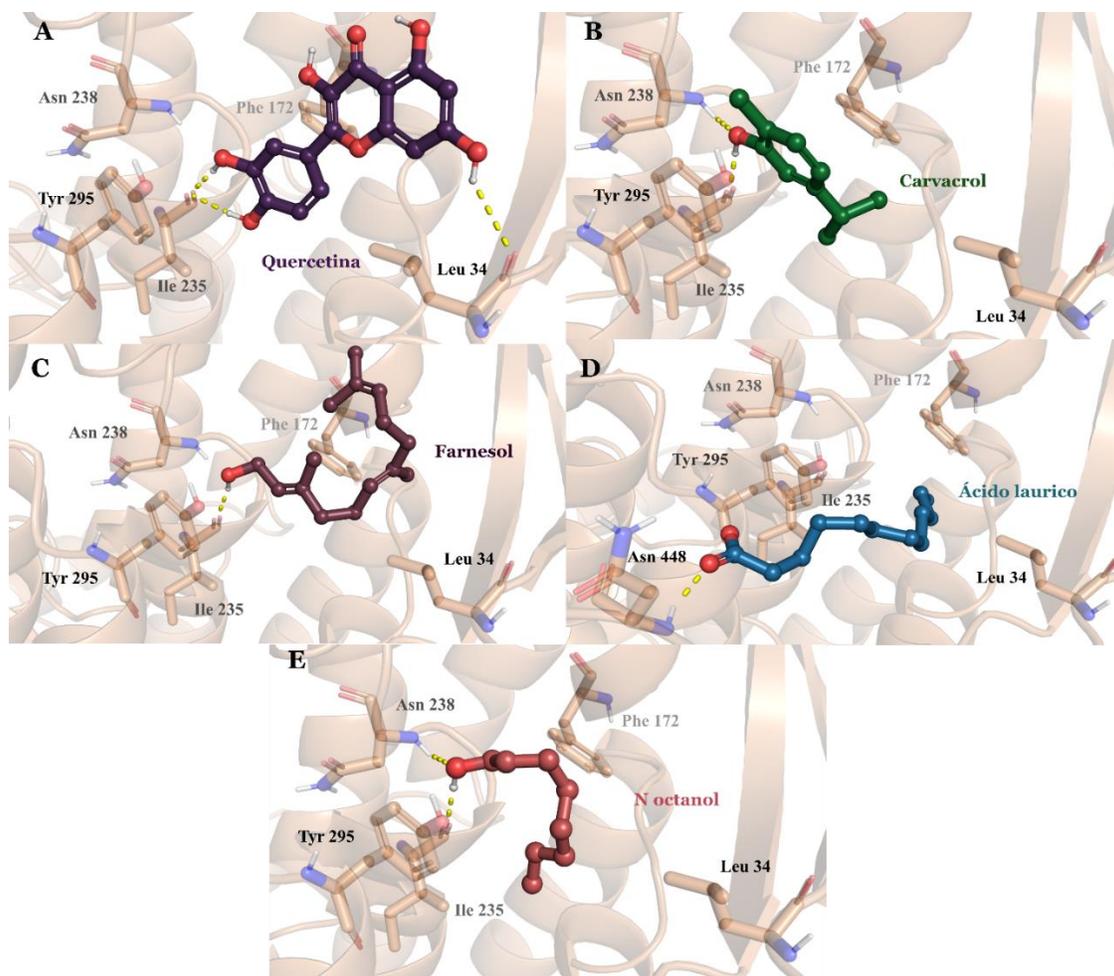


Figura 11. Visualización de interacción proteína-ligando en el complejo I (A) quercetina (púrpura) (B) Carvacrol (verde oscuro), (C) Farnesol (morado uva) (D) ácido láurico (azul) y (E) N octanol (rosa). Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, naranja claro; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando de puente de hidrógeno están representadas por líneas discontinuas amarillas y las interacciones  $\pi$ - $\pi$  están representadas por líneas discontinuas naranja oscuro

En base a las interacciones que presentan los compuestos, se puede asumir que residuos como Ile 235, Tyr 295, Tyr 173 y Phe 172, debido a sus propiedades polares, representan puntos de interacción con otros posibles metabolitos que tengan características estructurales para que esto

ocurra de manera óptima, ya que algunos de ellos también se ven reflejados en interacciones con los compuestos de referencia (figura 10).

### 3.2.2. Complejo III, Subunidad Cyt b

En cuanto al complejo III, se usó mixotiazol como compuesto de referencia. El mixotiazol es un compuesto que actúan sobre el sitio  $Q_0$  impidiendo la oxidación del  $UQH_2$  (Von Jagow, et al., 1984; von Jagow y Ohnishi, 1985; Esser et al., 2004). Nuestro resultados evidencian que el compuesto interacciona con la subunidad del complejo III a través de un puente de hidrógeno con el residuo Ile147 como se observa en la figura 12.

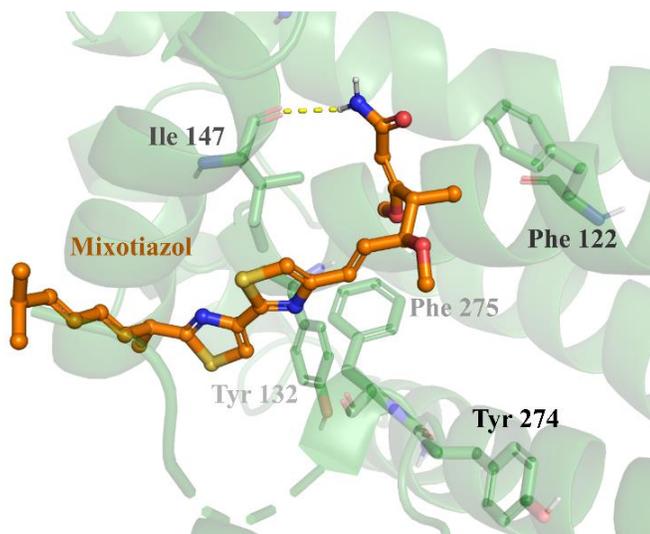


Figura 12. Visualización de interacción ligando inhibidor en el complejo III. Mixotiazol (naranja) interactúa por puentes de hidrogeno con el residuo Ile 147. Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, verde claro; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando de puente de hidrógeno están representadas por líneas discontinuas amarillas.

Se realizó el análisis del acoplamiento molecular SP y XP a un total de 226 compuestos insecticidas naturales reportados previamente en la literatura (Anexo 1), con la proteína del complejo III, tomando los 10 mejores como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de docking molecular y energía de afinidad para los 10 mejores compuestos con actividad insecticida reportada para el complejo III.

Compuesto	MMGBSA dG Bind (Kcal/mol)	Docking score
<b>Quercetina</b>	<b>-42,48</b>	<b>-10,812</b>
Ácido nonanoico	-75,14	-10,008
Beta-Cariofileno	-34,35	-8,446
<b>Carvacrol</b>	<b>-36,21</b>	<b>-7,772</b>
6-Metilcoumarin	-44,97	-7,630
<b>Farnesol</b>	<b>-55,29</b>	<b>-7,549</b>
Alfa-Felandreno	-32,00	-7,183
P-Cimeno	-36,33	-7,137
<b>Ácido laurico</b>	<b>-27,9</b>	<b>-5,064</b>
<b>N octanol</b>	<b>-35,91</b>	<b>-4,746</b>

En la subunidad Cyt b del complejo III, los compuestos quercetina, carvacrol, farnesol, n octanol y ácido láurico, presentaron puntuaciones de docking y energía de afinidad superiores a las presentadas en el complejo I (Tabla 2), esto puede deberse a que estos valores representan la suma de todas las interacciones presentes entre el compuesto y el complejo: puentes de hidrogeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$  e interacciones hidrofóbicas, lo que indicaría una mayor interacción, que puede ser inhibidora o potenciadora.

El carvacrol presenta una interacción de puente de hidrogeno a una distancia de 2,08 Å con el residuo Met125 (Figura 13. A), adicionalmente tiene ocho interacciones hidrofóbicas: una interacción con el residuo Phe 122, dos interacciones con Ile 147, dos interacciones con Leu 295 y tres interacciones con Phe 275.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

El acoplamiento que se observa por farnesol a la subunidad cyt b (figura 13.B), es un acoplamiento que presenta dos tipos de interacciones: puente de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas, siendo estas últimas las que aportan más al valor de afinidad, ya que son nueve, entre las que se encuentran los aminoácidos: Phe 122, Met 125, Ala 126, Leu 150, Leu 295, Ile 299, y tres interacciones con el residuo Phe 275. La interacción polar viene dada a una distancia de 1.96 Å por el residuo Ile 147.

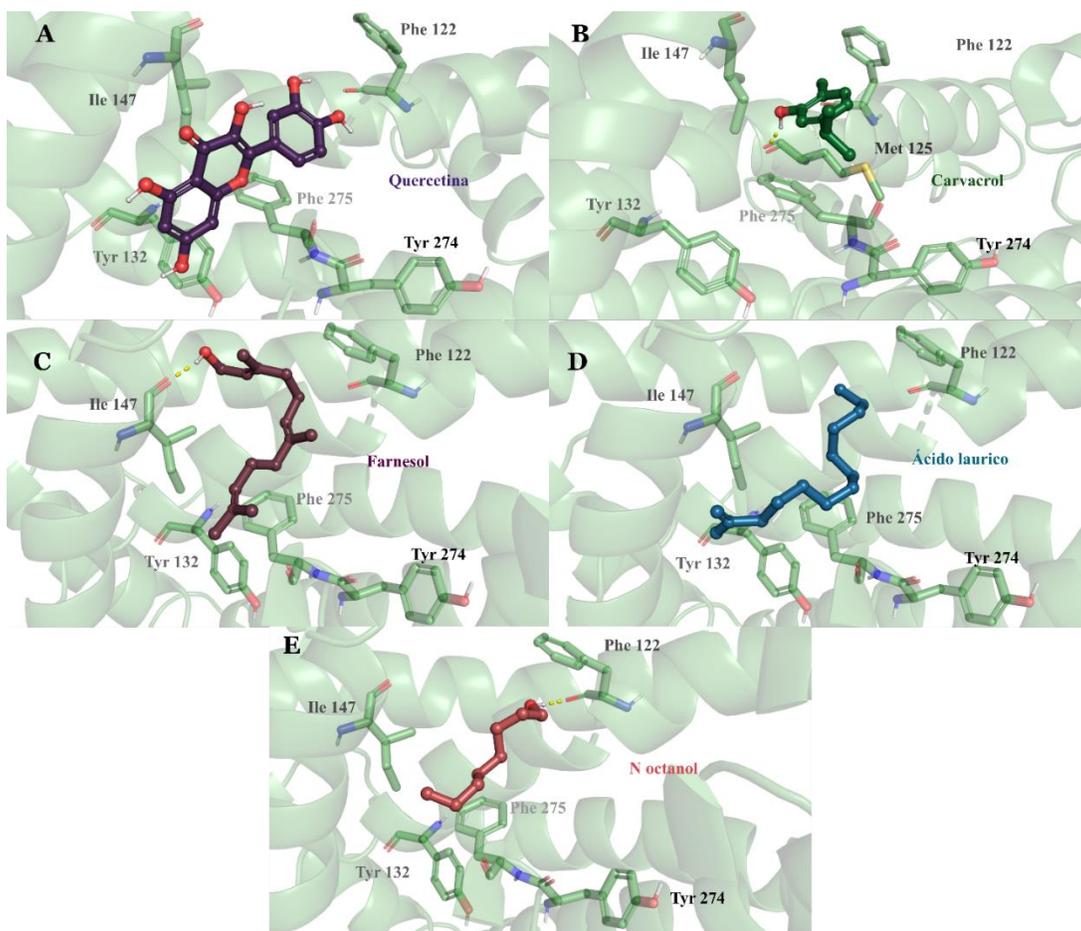


Figura 13. Visualización de interacción ligando en el complejo III (A) quercetina (púrpura) (B) Carvacrol (verde oscuro), (C) Farnesol (morado uva) (D) ácido láurico (azul) y (E) N octanol (rosa). Los residuos y ligandos están coloreados según el tipo de átomo (carbono de la proteína, verde claro; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul). Las interacciones proteína-ligando de puente de hidrógeno están representadas por líneas discontinuas amarillas.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Los aminoácidos Phe 122, Phe 275 y Leu 295 resultan ser residuos representativos de acuerdo a los resultados obtenidos y a la literatura, ya que previamente representa sitios de unión con la subunidad (Xiao et al.,2014), presentando interacciones hidrofóbicas tanto en carvacrol como en farnesol, por lo que otros compuestos podrían presentar interacción con estos, si están ubicados a una distancia que permita esta interacción, al igual que el residuo Ile 147, ya que tanto farnesol como el compuesto de referencia mixotiazol presentaron una interacción de tipo polar con este aminoácido.

### 4. Conclusiones

Los modelos de homología creados para el complejo I y III, en base de plantillas de mamíferos, fueron efectivos según su porcentaje de identidad que fue del 39% y 68%, respectivamente, por lo que se concluye que la estructura proteica de los complejos mitocondriales I y III de diferentes especies presenta similitudes que pueden ser comparables.

Las técnicas de docking molecular de extra-precisión y precisión estándar resultaron ser herramientas efectivas en la clasificación y descarte de metabolitos secundarios de plantas, ya que definieron puntuaciones que determinaron la afinidad de los compuestos con cada complejo.

Con base a los resultados obtenidos, se puede asegurar que los análisis *in silico* fueron acertados en sugerir que los compuestos quercetina, ácido láurico, n octanol, carvacrol y farnesol presentan afinidad con las subunidades del complejo I (subunidad ND5) y III (subunidad cyt b), y aunque no se especifica que tipo de relación presentan, fue un indicativo de que podría ser de tipo inhibitorio, lo cual presenta una solución para el control de individuos *Ae. aegypti*.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Carvacrol presentó interacción con los modelos creados del complejo I y III dando puntuaciones de docking de -4.435 y de -7.772, respectivamente, mientras que farnesol obtuvo valores de -3.234 y -7.549 respectivamente, siendo compuestos destacados en esta selección.

Los compuestos de referencia (piericidina A y mucidina para complejo I, mixotiazol para el complejo III), presentaron interacciones útiles con residuos claves como Tyr295 y Tyr173 en la subunidad ND5 y Ile147 en la subunidad cyt b (Xiao et al.,2014), ya que al igual que los compuestos de prueba, muestran un tipo de relación, indicando que estos aminoácidos pueden ser sitios activos de cada complejo proteico.

**Capítulo 2. Actividad larvicida y enzimática de metabolitos de plantas que afectan los complejos mitocondriales I y III de mosquitos *Aedes aegypti***

Este capítulo se compone de los resultados obtenidos en el laboratorio para la evaluación de los compuestos de origen natural en larvas de mosquitos *Ae. aegypti* y sus complejos mitocondriales, de acuerdo con los resultados previamente vistos en el capítulo 1.

**1. Objetivos específicos**

- Determinar la actividad larvicida de los metabolitos identificados en *Ae aegypti*.
- Evaluar el efecto de los metabolitos con mejor actividad larvicida sobre la bioenergética mitocondrial.

## 2. Metodología Fase *In vitro* – *In vivo*

En esta fase, se realizó la evaluación de la actividad larvica para los compuestos carvacrol y farnesol, para posteriormente evaluar su efecto en la bioenergética mitocondrial, con el fin de dar cumplimiento al segundo y tercer objetivo del proyecto de investigación según el esquema presentado en la figura 14.

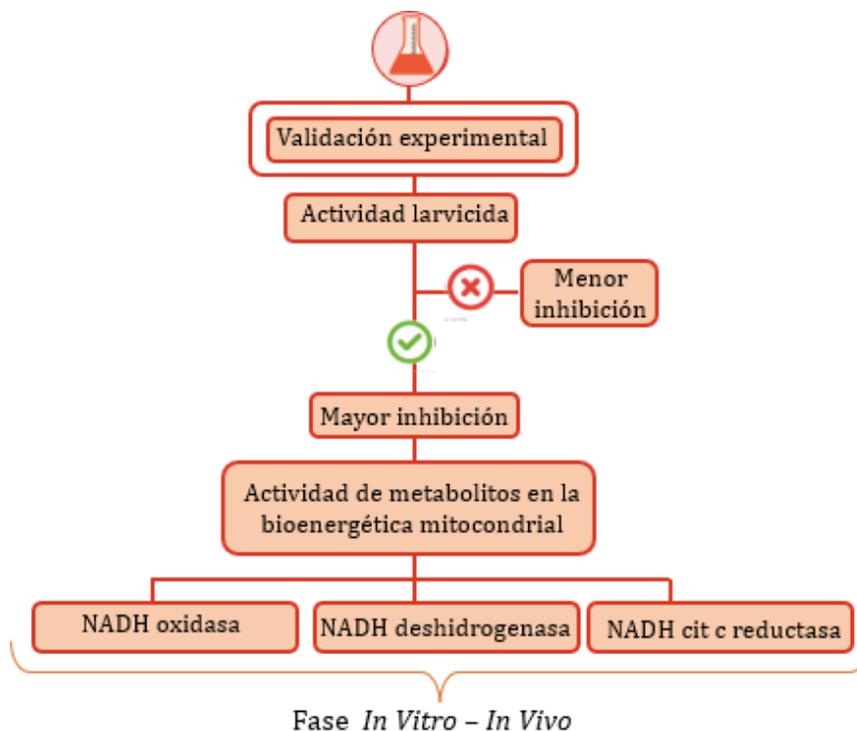


Figura 14. Esquema metodológico experimental del proyecto de investigación.

### 2.1. Actividad larvica

La actividad larvica se evaluó sobre larvas en tercer y cuarto estadio larval de *Ae. aegypti* cepa rockefeller de la colonia del laboratorio de entomología médica y Centro de investigación en enfermedades tropicales CINTROP.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

La colonia se mantuvo en jaulas de cría con dimensiones 40×40×40 cm en un insectario a 25 ± 5°C, humedad de 70 ± 5%, alimentada con una solución azucarada de miel al 10%. Las hembras fueron alimentadas, según la necesidad experimental, con sangre de rata albina raza Wistar WI IOPS AF/Han, proveniente del bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, con el fin de obtener huevos a los que se induce a eclosionar en bandejas de plástico con agua declorada, hasta que alcancen la etapa larval requerida. Lo anterior, cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

La actividad larvicida de los metabolitos secundarios de plantas se evaluó transfiriendo 10 individuos a vasos plásticos de 200 mL con 99,5 mL de agua. A cada vaso de plástico se le agregó 0,5 mL de solución madre (compuesta del metabolito disuelto en DMSO), hasta un volumen final de 100 mL donde se realizaron los bioensayos concentración-respuesta. En primer lugar, se hicieron concentraciones diagnósticas de 30, 90 y 190 ppm (Vera et al. 2014). Posteriormente, se evaluaron concentraciones múltiples para cada compuesto para establecer mortalidades entre 2 y 98 %. En cada caso, el tratamiento de control negativo fue DMSO al 0.5 %. Se realizaron pruebas por cuadruplicado (40 larvas) para cada concentración evaluada repitiendo el experimento tres veces en días diferentes hasta utilizar un total de 120 larvas por cada tratamiento. Las larvas no fueron alimentadas durante todo el tratamiento. En cada ensayo se registró la mortalidad a las 24 y 48 h.

Finalmente, luego de obtener los porcentajes de mortalidad, se realizó un procesamiento de datos, en función a la concentración, calculando los parámetros estadísticos, por medio de un método de regresión logarítmica usando los softwares PoloPlus y Graphpad Prism 5, para de esta manera

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

determinar Concentraciones Letales Media, CL<sub>95</sub>, CL<sub>50</sub> (Dharmagadda et al., 2005), ayudando a establecer los metabolitos con mejor score de actividad larvicida.

### **2.2. Actividad de metabolitos en la bioenergética mitocondrial**

Las actividades de las enzimas relacionadas con el complejo I (NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa) y el complejo III (NADH cit c reductasa) de la cadena respiratoria se determinaron en un espectrofotómetro, Multiscan GO (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) utilizando el programa SkanIt, y polarográficamente en un oxígrafo Oroboros O2k-Respirómetro utilizando el programa Oroboros DatLab CD. Se evaluó la actividad para los compuestos que presentaron un efecto larvicida óptimo en las pruebas *in vivo*, en ensayos con tres repeticiones durante tres días diferentes.

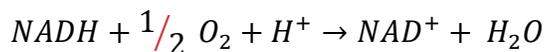
Adicionalmente, se utilizaron, para cada ensayo, 50 larvas L3 y L4, las cuales fueron lavadas con agua tipo I, separadas por filtración con gasa quirúrgica y colocadas en 500 µL de medio de aislamiento compuesto de sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, a un pH 7.2, EGTA 1 mM y BSA 0,1%, para posteriormente ser homogenizada en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. Finalmente se realizó la cuantificación de la proteína de larva de mitocondria homogenizada mediante el método de Bradford (Bradford & Marion, 1976).

#### **2.2.1. NADH oxidasa**

La enzima NADH oxidasa se puede evaluar determinando la velocidad de oxidación del NADH, ya que se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, observando la entrega de electrones al oxígeno, y es representada la reacción como se observa en la ecuación 1, y se evaluó mediante el método de Signer (Signer, 1974), teniendo un sistema de reacción compuesto por buffer

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

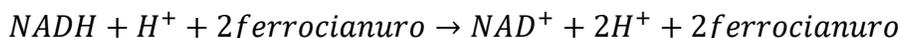
fosfato 80 mM (pH 7.4), EDTA 50  $\mu$ M, NADH 0.17 mM y 0.1 mg/mL de proteína mitocondrial a una temperatura controlada de 25° C a una absorbancia de 340 nm.



Ecuación 1. Esquema de reacción de NADH

### 2.2.2. NADH deshidrogenasa

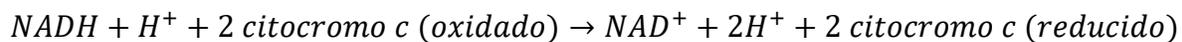
La actividad de la enzima se evaluó por medio del método de Singer (Singer, 1974), usando ferricianuro de potasio como receptor artificial de electrones en la presencia de rotenona, a una absorbancia de 420 nm, para observar el consumo de oxígeno. El sistema de reacción que se observa en la ecuación 2, compuesto de un buffer fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, NADH 0.15 mM, ferricianuro de potasio 0.6 mM, rotenona 1  $\mu$ M, KCN 1 mM y 0.1 mg de proteína mitocondrial. Para luego determinar la concentración de ferricianuro de potasio por medio del coeficiente de extinción redox ( $\epsilon_{redox}$ ) 1.043 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.



Ecuación 2. Esquema de reacción de NADH deshidrogenasa.

### 2.2.3. NADH citocromo c reductasa.

La actividad de esta enzima se determinó haciendo seguimiento de la velocidad de reducción del citocromo *c* de la enzima con a una absorbancia de 550 nm, mediante el método de Somlo (Somlo, 1965). El sistema de reacción que se describe en la ecuación 3, fue compuesto de un buffer fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, NADH 50  $\mu$ M, citocromo *c* (oxidado) 40  $\mu$ M, KCN 1 mM y 0,1 mg de proteína mitocondrial con una incubación por 10 minutos a una temperatura controlada de 27°C, determinando así la concentración del citocromo *c* reducido por medio de su coeficiente de extinción molar redox ( $\epsilon_{redox}$ ) 19,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 550 nm.



Ecuación 3. Esquema de reacción de NADH citocromo c reductasa.

### 2.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos se representaron por la media  $\pm$  desviación estándar (SD) de tres ensayos independientes cada uno por triplicado, y se analizaron estadísticamente usando el software GraphPad Prism 5 mediante un análisis de varianza (ANOVA) en una vía, seguido por el test de Tukey y Kruskal-Wallis para la comparación de las medias. Los resultados con un valor  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos respecto al control.

## 3. Resultados y discusión del capítulo

### 3.1. Actividad larvicida

La actividad larvicida se evaluó en base a los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$ , que corresponden a las concentraciones letales que causan el 50% y 95% de mortalidad de los individuos expuestos al tratamiento respectivamente. Inicialmente se evaluaron concentraciones diagnósticas de 30, 90 y 190 ppm (figura 15), donde se encontró la mortalidad entre el 2 y el 98% para cada compuesto. Los compuestos quercetina, ácido láurico y n octanol, obtuvieron una mortalidad que no alcanzó ni el 30% después de 48 horas en la concentración más alta (190 ppm), n octanol con un porcentaje de 14,2% (figura 15.A), ácido láurico, 17,5% (figura 15.B) y quercetina con un porcentaje de 26% (figura 15.C), por lo que fueron descartados para la evaluación de concentraciones múltiples. Por otra parte, carvacrol presentó una mortalidad de 98,3% (figura 15.D) y farnesol una mortalidad de 99,9% (figura 15.E), después de 48 horas en la concentración más alta (190 ppm), por lo que se procedió a realizar la evaluación de concentraciones menores variables para determinar la

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

concentración de letalidad del 50% de los individuos ( $CL_{50}$ ) bajo cada uno de los tratamientos. Los análisis estadísticos se ajustaron al modelo probit el cual es un tipo de regresión donde la variable dependiente puede tomar solo dos valores,  $\chi^2$  chi cuadrado.

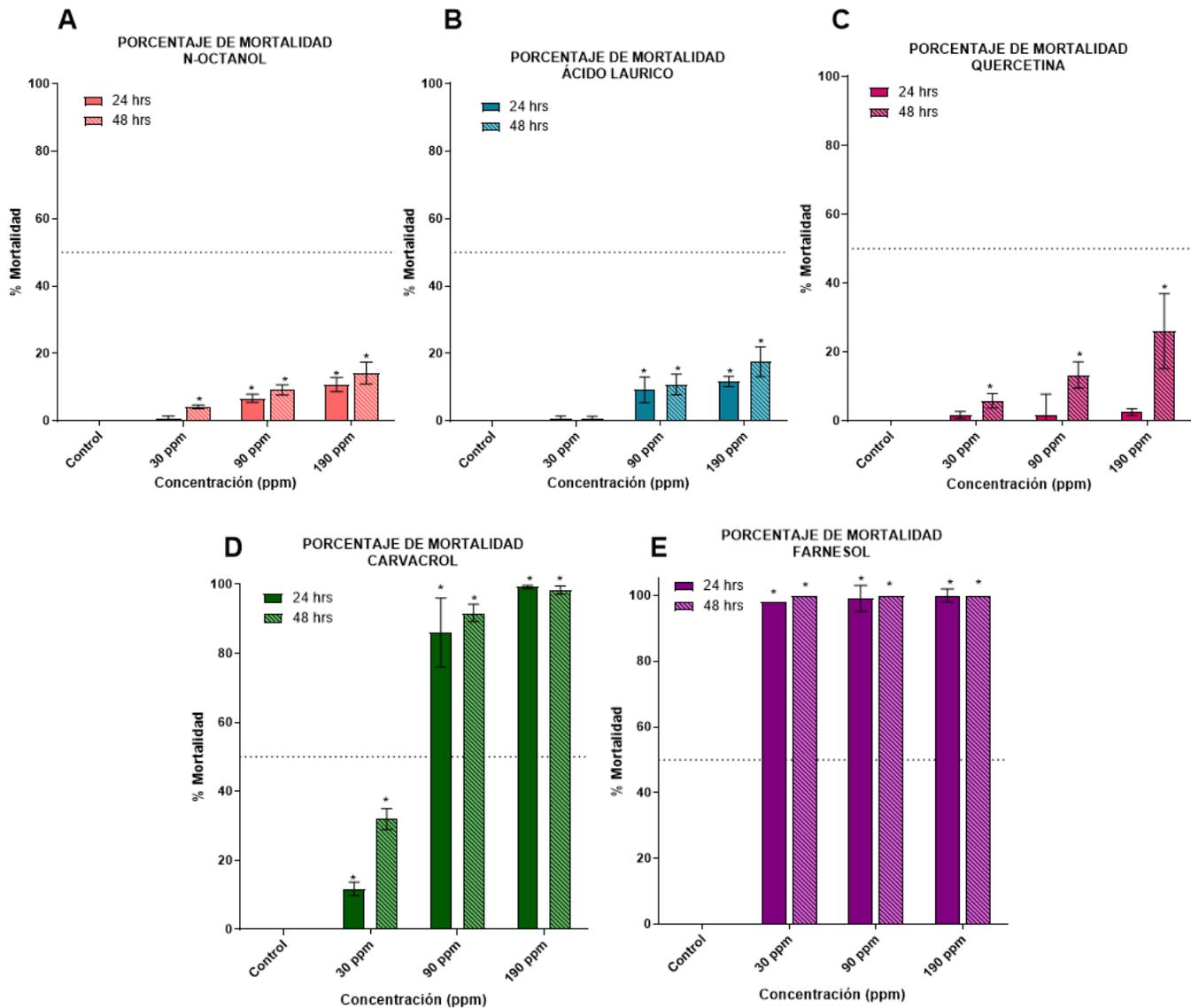


Figura 15. Porcentaje de mortalidad de concentraciones diagnosticas de 30 ppm, 90 ppm y 190 ppm para (A) N octanol, (B) ácido láurico (C) quercetina, (D) carvacrol y (E) farnesol sobre *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos en días diferentes. \*Diferencia significativa respecto al control ( $p \leq 0,05$ ),  $n=3$ .

### 3.1.1. Carvacrol

Los resultados de la actividad larvica de carvacrol sobre individuos *Ae. aegypti* se describe en porcentajes de mortalidad, evaluado en tiempos de 24 horas y 48 horas de exposición a concentraciones de 24 ppm, 32 ppm, 43 ppm y 51 ppm (Figura 16).

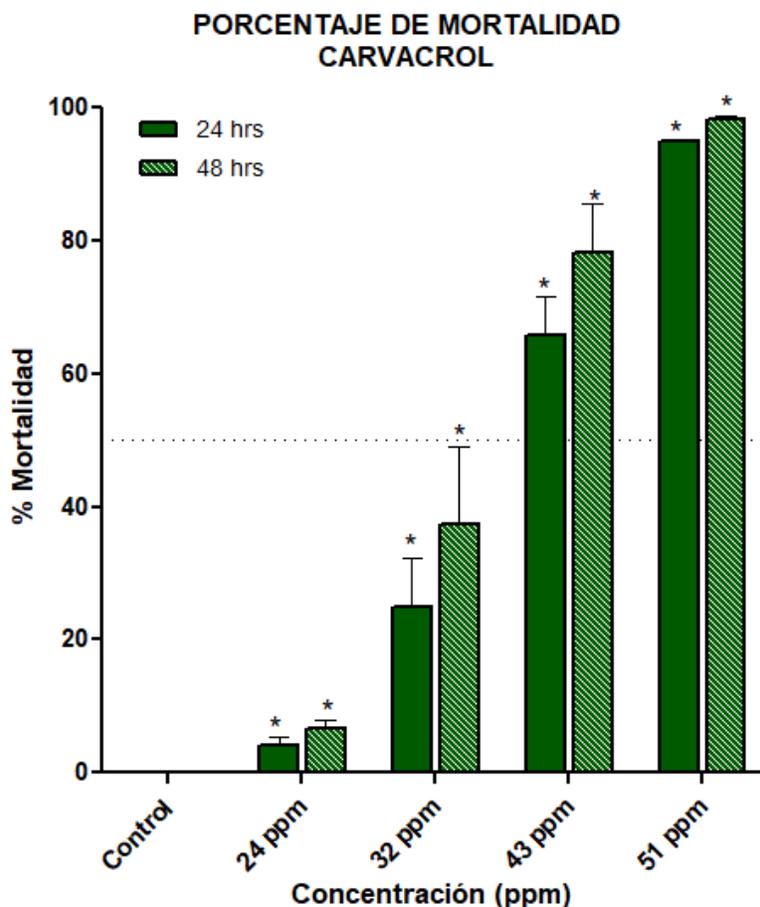


Figura 16. Porcentaje de mortalidad de carvacrol sobre *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos en días diferentes. \*Diferencia significativa respecto al control ( $p \leq 0,05$ ),  $n=3$ .

Los datos mostraron una distribución normal donde existen diferencias significativas entre el tratamiento de carvacrol y el control, esto se observó por medio de un test ANOVA, donde el

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

metabolito presenta mortalidad desde 4.2% (concentración de 24 ppm) a las 24 horas, hasta una mortalidad del 98.3% (concentración de 51 ppm) a las 48 horas.

Se obtuvo una mortalidad considerable con el metabolito, ya que las CL<sub>50</sub> a las 24 horas y 48 horas son de 37,4 ppm y de 34,5 ppm, respectivamente, como se observan en la tabla 3. Dado que la probabilidad observada por medio de probit y chi cuadrado es mayor, se acepta la hipótesis nula, esto significa que los datos observados se ajustan a la distribución teórica.

Tabla 3. Concentraciones letales de Carvacrol sobre *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza.

Concentración Letal					
24h			48 h		
CL <sub>50</sub>	CL <sub>95</sub>	$\chi^2$	CL <sub>50</sub>	CL <sub>95</sub>	$\chi^2$
37,4	55,1	5,85	34,5	50,5	4,27
[34,1-40,9]	[48,6-88,5]		[31,8-37,2]	[45,4- 60,2]	

Cuando las concentraciones CL<sub>50</sub> de un metabolito, se encuentran en un valor superior a 100 ppm, se considera compuesto inactivo con respecto al individuo, como lo describen en su revisión Días y Moraes (Días & Moraes, 2014). Por lo que carvacrol se considera activo en *Ae. aegypti*, ya que los valores de CL<sub>50</sub> tanto para las 24 como las 48 horas, no superan los 38 ppm.

### 3.1.2. Farnesol

La actividad larvicida de farnesol se evaluó sobre individuos *Ae. aegypti*, en concentraciones de 0,8 ppm, 5 ppm, 8 ppm, 12 ppm, 15 ppm, observado la mortalidad a las 24 y 48 horas, como se observa en la Figura 16.

Los datos obtenidos por farnesol, fueron analizados con un test Kruskal-Wallis, presentando una distribución normal donde existen diferencias significativas entre el tratamiento de farnesol y el control a partir de la concentración de 5ppm a 24 y 48 horas de tratamiento (Figura 17).

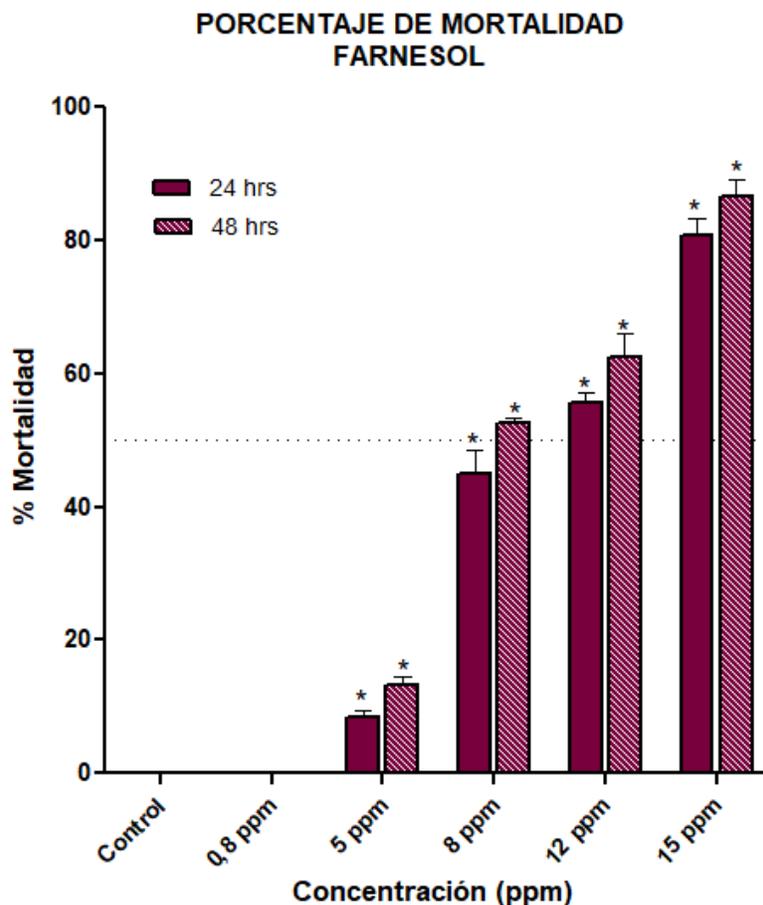


Figura 17. Porcentaje de mortalidad de farnesol sobre *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. Se realizaron tres ensayos en días diferentes. \*Diferencia significativa respecto al control ( $p \leq 0,05$ ),  $n=3$ .

La mortalidad presentada por farnesol sobre los individuos fue considerablemente alta, ya que, en la menor concentración evaluada con resultado significativo, (5 ppm) se dio una mortalidad del 8,3% a las 24 horas y 13,3% a las 48 horas. El mayor porcentaje de mortalidad se presentó en la concentración de 15 ppm, con 80,8% a las 24 horas y 86,7% a las 48 horas.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Como se menciona anteriormente, el estándar de mortalidad que indica qué tan activo es un compuesto se establece con respecto a un valor de CL<sub>50</sub> por debajo de 100 ppm, por lo que farnesol se puede considerar un metabolito altamente activo para la mortalidad de los individuos, ya que los valores de CL<sub>50</sub> a las 24 horas y 48 horas son de 9,78 ppm y de 8,73 ppm, respectivamente, como se observan en la Tabla 4. La probabilidad observada por medio de probit y chi cuadrado es mayor y se acepta la hipótesis nula, esto significa que los datos observados se ajustan a la distribución teórica.

Tabla 4. Concentraciones letales de Farnesol sobre *Ae. aegypti*, a las 24 y 48 horas. En paréntesis se muestran los intervalos de confianza.

<b>Concentración Letal</b>					
<b>24h</b>			<b>48 h</b>		
<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>CL<sub>95</sub></b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>CL<sub>95</sub></b>	<b><math>\chi^2</math></b>
9,78	24,3	9,84	8,73	21,93	10,1
[8,33-11,5]	[18,2 - 45,3]		[7,30 - 10,2]	[16,7 -39,3]	

### 3.2. Efecto del farnesol y carvacrol sobre la actividad de enzimas mitocondriales

Debido a la mortalidad presentada por el efecto del carvacrol y farnesol, se decidió determinar si ese efecto en la mortalidad era debido una alteración en el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, puntualmente en los complejos I y III.

Razón por la cual se evaluó el efecto de los compuestos sobre la actividad de las enzimas NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa y NADH cit c reductasa.

### 3.2.1. NADH oxidasa

Esta enzima flavoprotéica es considerada como el paso inicial de electrones desde el NADH hasta el oxígeno, ya que se encarga de catalizar la reducción monovalente de oxígeno utilizando NADPH como fuente de electrones para formar un anión superóxido (Mironova et al., 2022). En este ensayo, se determinó polarográficamente el consumo de oxígeno, al ser reducido por agua, con los electrones aportados por NADH.

Los resultados se representan por el promedio del porcentaje de actividad de las mediciones con su desviación estándar (figura 18). Carvacrol presentó una diferencia estadísticamente significativa respecto al control con  $p < 0,001$  (\*\*\*) con  $SD \pm 1,2$ , mientras que farnesol no mostró una diferencia que fuera considerable frente al control con  $SD \pm 0,89$ .

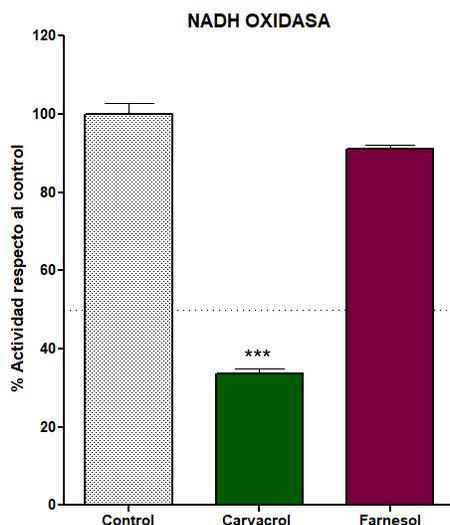


Figura 18. Actividad para NADH oxidasa, en mitocondria de larva *Ae. aegypti* en presencia de carvacrol (24 ppm) y farnesol (8 ppm) El control fue tomado como el 100 % y corresponde a  $85,96 \pm 2,83$  nmol  $O_2$ / min·mg de proteína. \*\*\*Estadísticamente significativo.

La actividad de la enzima NADH oxidasa en presencia de carvacrol muestra una disminución considerable de 66,36 %, lo que indica que se está generando un bloqueo en el paso de electrones

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

en algún punto de la cadena respiratoria mitocondrial, desde el NADH, hasta el aceptor final de esos electrones, el oxígeno. Por otra parte, aunque farnesol presentó una inhibición del 5,9%, no fue estadísticamente significativa, por lo que la inhibición no resulta ser representativa.

### 3.2.2. NADH deshidrogenasa

Esta enzima corresponde al primer paso de electrones del complejo I, y es la encargada de la reducción de NADH, catalizando la transferencia de electrones del NADH al FMN y posteriormente a centros de oxidoreducción que reducen la coenzima Q en la cadena de fosforilación oxidativa (Pryde & Hirst, 2011).

Con este ensayo se determina la concentración de ferricianuro de potasio. Los resultados son la representación del promedio de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Tanto carvacrol ( $SD \pm 3,52$ ), como farnesol ( $SD \pm 8,41$ ) mostraron diferencias estadísticamente significativas con relación al control  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,05$  (\*), respectivamente, y son descritos porcentualmente como se observa en la figura 19.

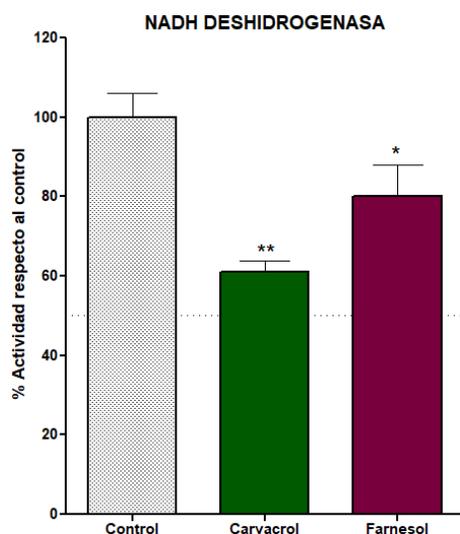


Figura 19. Actividad para NADH deshidrogenasa, en mitocondria de larva *Ae. aegypti* en presencia de carvacrol (24 ppm) y farnesol (8 ppm) El control fue tomado como el 100 % y corresponde a  $560,25 \pm 18,39 \mu$  moles de ferricianuro de potasio/min·mg de proteína.  $p < 0,01$  (\*\*), y  $p < 0,05$  (\*), estadísticamente significativo.

Los ensayos sobre NADH deshidrogenasa muestran que carvacrol y farnesol presentan una disminución en la actividad enzimática, dando un comportamiento congruente con los resultados de la enzima NADH oxidasa confirmando que los dos compuestos contribuyen a la inhibición del complejo I, pero farnesol induce mayor inhibición en la enzima NADH deshidrogenasa. Para carvacrol, se generó una disminución de la actividad de la NADH deshidrogenasa de 39,11%, demostrando que el paso de los electrones se ve afectado en el complejo I, esta inhibición posiblemente afecte también la producción de ATP (King et al., 2009). El metabolito farnesol por su parte, tuvo una inhibición del 19,98%, lo que confirma que el farnesol actuaría directamente en el complejo I, causando la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) como lo confirmó Machida en su artículo (Machida, K et al., 1998).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la evaluación del complejo III mediante la enzima correspondiente.

### **3.2.3. NADH citocromo c reductasa.**

El complejo III fue evaluado por medio de un ensayo de NADH citocromo c reductasa, donde ocurre el paso de los electrones desde el complejo I el ubiquinol hasta el complejo III, monitoreando la reducción del citocromo c y, evitando la acción del complejo IV con cianuro según el método propuesto porde Singer (Singer, 1974).

La figura 20 representa el promedio de las mediciones con desviación estándar de cada promedio. Diferencia significativa con respecto al control  $p < 0,001$  (\*\*\*). Carvacrol ( $SD \pm 1,51$ ) no

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, mientras que farnesol sí, con un porcentaje de actividad del 342,08% (SD±2,19).

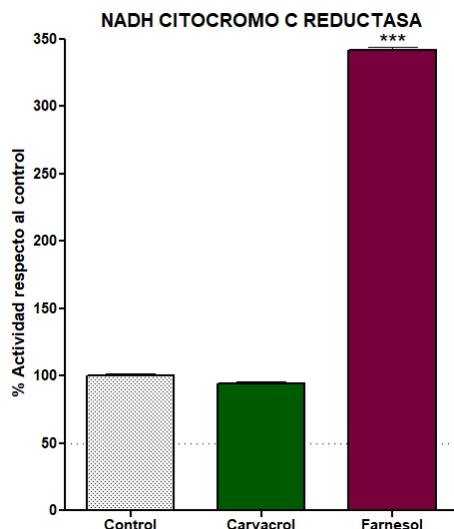


Figura 20. Actividad para NADH citocromo c reductasa, en mitocondria de larva *Ae. aegypti* en presencia de carvacrol (24 ppm) y farnesol (8 ppm). El control se tomó como el 100 %, el cual corresponde a  $41,51 \pm 1,82$  nmoles de citocromo c reducido/min·mg de proteína.  $p < 0,001$  (\*\*\*) estadísticamente significativo.

La actividad enzimática que se observó en carvacrol con respecto al control tuvo una inhibición del 5,6%, por lo que demuestra que, aunque hay inhibición, no representa una inhibición significativa en el complejo III, como sí se observó en el complejo I. Por otra parte, el farnesol generó un aumento de la actividad del complejo III del 242,08%, lo cual se puede deber a que el farnesol es un precursor de la hormona juvenil convirtiéndose en farnesal durante la biosíntesis de la hormona juvenil a través de la ruta del mevalonato (Noriega, 2014). Lo anterior teniendo en cuenta que el farnesol y la homeostasis del farnesal son esenciales para las células en los tejidos de los individuos *Ae. aegypti*, teniendo funciones celulares, incluidas la proliferación y la apoptosis (Joo, et al., 2010; Rouillet, et al., 1999; Journe, et al., 2008).

#### 4. Conclusiones

Según las concentraciones de CL50 se observó que luego de realizar ensayos larvicidas, carvacrol obtuvo un valor de 34,5 ppm y farnesol uno de 8,73 ppm, por lo que se consideran metabolitos de alta efectividad.

El carvacrol presentó una disminución en el consumo de oxígeno debido a la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria, según los resultados obtenidos en el ensayo NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa, con valores de actividad que descendieron del 100% (control) al 33,64 % y 60,89%, respectivamente.

La actividad de carvacrol para el complejo III no disminuyó drásticamente, ya que tuvo un valor de 94,4%, lo que representa una disminución del 5,6%.

Se observó un efecto activador de farnesol sobre la enzima NADH citocromo *c* reductasa, que hace referencia al complejo III, con una puntuación porcentual de 342,08%.

### Capítulo 3. Discusión y conclusiones finales

#### 1. Discusión global

En el siguiente apartado se presentará una discusión hacia aspectos que impliquen abordar todos los resultados obtenidos en el trabajo de investigación. Es decir, se relacionarán los resultados obtenidos para el capítulo 1 y el capítulo 2.

El carvacrol es un fenol monoterpénico que ha sido utilizado ampliamente en estudios que involucran diferentes especies y su mecanismo de control, siendo parte de diferentes plantas y aceites esenciales (Park et al., 2017). En este estudio el carvacrol contó con las características fisicoquímicas consignadas en el anexo 2, que incluyen polaridad, masa, hidrofobicidad y reactividad, lo cual permitió su avance en las siguientes fases de ensayo que monitorearon la potencia larvicida y actividad enzimática.

En los resultados de docking molecular se pudo observar que las interacciones polares que se presentaron tanto en la subunidad 5 del complejo I como la subunidad cyt b del complejo III fueron debido al grupo funcional que posee el compuesto haciendo que el par de electrones solitario deslocalizado en el oxígeno hidroxilo pueda formar interacciones con residuos (Ile 235, Asn 238 y Met 125) y a su vez, en el complejo I, permitió una interacción del tipo  $\pi$ - $\pi$  (Tyr 295), esto podría estar promoviendo la liberación de protones del grupo hidroxilo fenólico en la mitocondria, incrementando su acidez, y de esta manera aumentando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) ya que los sitios de generación de superóxido están ubicados tanto en el complejo I como en el complejo III (Lenaz et al., 2002; Ohnishi et al., 2005; Selivanov et al., 2008).

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Por otro lado, el carvacrol presentó, para la actividad larvicida, un  $CL_{50}$  de 37,4 ppm a las 24 horas y 34,5 ppm a las 48 horas, este eficiente resultado puede deberse a que, fenoles como el carvacrol, presentan al daño mitocondrial, ya que desestabilizan la estructura de la membrana mitocondrial, produciendo permeabilidad irregular de radicales, iones de calcio y citocromo c (Aydın et al., 2013; Kong et al., 2019; Ozkan & Erdogan, 2012). La liberación de citocromo c lleva a una activación de caspasa 9 en el apoptosoma, como resultado de estrés oxidativo y las fallas bioenergéticas, reduciendo el gradiente de pH que afecta la bomba de protones y la reserva de ATP, causando lisis y muerte celular (figura 21) (Braun et al., 2010; Ozkan & Erdogan, 2012).

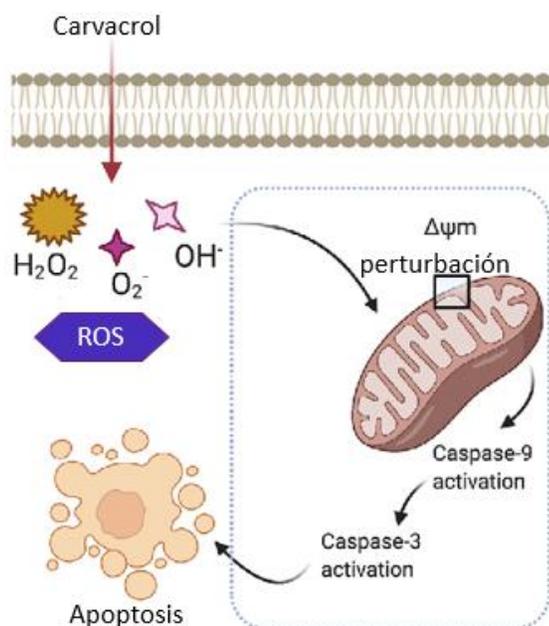


Figura 21. Posible mecanismo de apoptosis mitocondrial generado por carvacrol. Adaptada de Bano et al., 2022.

Se evaluó el efecto de carvacrol sobre las enzimas NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa, las cuales corresponden al complejo I y NADH cit c reductasa, que corresponde al complejo III. El carvacrol presentó una inhibición de 66,36%, 39,11% y 5,6%, sobre las enzimas NADH oxidasa,

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

NADH deshidrogenasa y NADH cit c reductasa respectivamente, demostrando la alta inhibición del metabolito con el complejo I, que como se mencionó anteriormente, puede deberse a la capacidad del compuesto para distribuirse en las membranas ( $\log PO/W = 3,29$ ) y permeabilizarlas provocando un proceso de formación de ROS e incluso apoptosis por vía mitocondrial (Ozkan & Erdogan, 2012). Por otra parte, la poca inhibición del complejo III puede deberse a que las mitocondrias utilizadas para desarrollar la metodología fueron homogenizadas, por lo que la función del carvacrol de modular ciertos canales  $Ca^{2+}$  permeables de potencial dentro del complejo tuvo menor relevancia debido a su quelación por EDTA de estos canales (Ràfols et al., 2016; Monzote et al., 2009).

Por su parte, el farnesol un isoprenoide producido endógenamente por plantas por medio del pirofosfato de farnesilo (Thai et al., 1999). Entre sus aplicaciones se encuentran propiedades antifúngicas, insecticidas y anticancerígenas (Joo et al., 2010; Seon et al., 2021; Halbert et al., 2009). Para los insectos, el farnesol actúa como un precursor en la biosíntesis de HJ (hormona juvenil) por medio de la ruta del mevalonato. La vía del mevalonato comienza con la formación de HMG-CoA que se convierte en mevalonato mediante la HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa), la enzima limitante de la velocidad y el mevalonato conduce a la síntesis de farnesil-PP (figura 22), donde se desencadenan varias vías, en las que se incluye la síntesis del colesterol y metabolización de distintos alcoholes (Joo et al., 2010).

De acuerdo con lo anterior, se puede relacionar los datos de actividad larvica obtenidos para el compuesto, donde el  $CL_{50}$  es de 9,78 ppm y 8,73 ppm a las 24 y 48 horas, respectivamente, con una afectación de la hormona juvenil, que se encarga del desarrollo, la metamorfosis y la reproducción del individuo, como mencionó Dong en el 2020 (Dong et al., 2020).

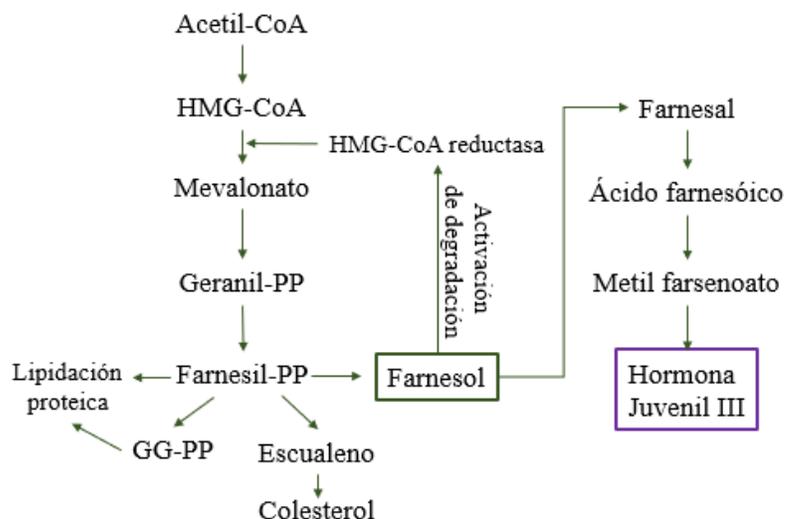


Figura 22. Vía de biosíntesis de JH. La biosíntesis de JH III implica 9 reacciones enzimáticas principales, en donde relaciona la participación de farnesol como precursor.

En cuanto a los resultados obtenidos para los complejos I y III de la cadena mitocondrial, se puede afirmar que las interacciones polares presentadas por el compuesto con la mitocondria (subunidad 5: Ile 235; subunidad cyt b: Ile 147) se deben al grupo funcional que interactúa con los aminoácidos, esto puede justificar su carácter insecticida que ha sido anteriormente demostrado (Halbert et al.,2009).

La evaluación mitocondrial por medio de los complejos enzimáticos presentó resultados en donde la inhibición para el complejo I, con las enzimas NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa no fue de 5,9% y 19,58%, respectivamente, mostrando que la inhibición en ese complejo se debe espacialmente a la enzima NADH deshidrogenasa, esta inhibición podría deberse a los procesos que realiza farnesol para llegar a la apoptosis, entre los que se encuentran la inducción de la activación de las caspasas 3, 6, 7 y 9, pero no de la caspasa 8, lo que indica que la apoptosis inducida por farnesol está mediada por la vía intrínseca de la mitocondria y no una vía extrínseca que dependa

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

de la caspasa 8 (Wiseman et al.,2007; Joo et al.,2007), además del aumento de ROS que induce la inhibición del crecimiento y la degradación mitocondrial (Lagace et al.,2002)..

Por otra parte, en el ciclo Q, ocurre la reoxidación de la subunidad citocromo b de complejo III que se unen inhibidores, como farnesol que pueden potenciar directamente la acumulación del radical inestable semiquinona como donante de electrones al oxígeno (De Loof et al.,2019; Machida et al.,1998; Fairn et al., 2007). La acumulación del radical semiquinona inestable en el ciclo Q del complejo III también podría ser una causa de la generación de especies reactivas de oxígeno inducida por farnesol ya que estudios previos han proporcionado evidencia que sugiere la generación mitocondrial de radicales de oxígeno por parte del componente hierro-azufre de Rieske del complejo III de la cadena de transporte de electrones en la muerte celular inducida por farnesol (Machida et al.,1998; Fairn et al., 2007) por lo que el aumento de actividad mostrado en la enzima NADH citocromo c reductasa de 242%, podría deberse a la acumulación del radical semiquinona.

### **2. Conclusiones globales**

El acoplamiento molecular demuestra que los compuestos farnesol y carvacrol presentan interacciones con el complejo I por medio de aminoácidos como Ile 235, Tyr 295, Tyr 173 y Phe 172, y por el complejo III con los residuos como Phe 122, Phe 275 y Leu 295.

Tanto carvacrol como farnesol son compuestos con excelente actividad larvicida, con un CL<sub>50</sub> de 34,5 ppm y 8,73 ppm, respectivamente, aportando nuevos conocimientos de metabolitos secundarios de plantas que constituyan insecticidas naturales.

El complejo I se vio afectado por medio de la inhibición de las enzimas NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa al interactuar con carvacrol y farnesol, obteniendo un porcentaje de inhibición

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

de 66,36% y 39,11% para carvacrol, mientras que para farnesol se dio un porcentaje de 5,9% y 19,58%.

La enzima NADH citocromo c reductasa, que relaciona la actividad del complejo III, se vio afectada por la elevación de actividad por farnesol de 242.08%, estableciendo a farnesol como un potenciador del complejo III.

### 3. Recomendaciones

El control de vectores como *Ae. aegypti* debe ser estudiado desde diferentes ángulos, por lo que el aporte de este trabajo y futuros trabajos podría alimentar una base de datos con compuestos naturales más amplia, por lo que son necesarios nuevos estudios que se enfoquen en el descubrimiento de más metabolitos activos para el control de individuos.

Se recomienda ampliar la cantidad de subunidades que son tomadas de cada complejo, para que se pueda definir que residuos son los que presentan actividad en cada proteína completa.

De igual manera, se recomienda ampliar el número de dianas a las que se les evalúa la acción insecticida, enfoque computacional, y la actividad enzimática, para ampliar con esto, la posibilidad de descubrir los mecanismos de acción de los compuestos que puedan servir como mecanismos de control.

### 4. Divulgación de resultados

Los resultados de este trabajo titulados fueron presentados en los siguientes eventos:

- 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, con el título “Estudio *in silico* de metabolitos de plantas que afectan los complejos mitocondriales I y III de mosquitos *Aedes aegypti*” (anexo 3).

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas 2021 con el título “Computational análisis of plant metabolites with a possible effect on mitochondrial complexes I and III in *Ae. aegypti*” (anexo 4).
- 49° congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN con el título “Actividad insecticida de metabolitos de plantas medicinales identificados mediante técnicas in silico, y su efecto sobre la mitocondria de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)” (anexo 5).

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

ANEXOS

Anexo 1. Base de datos metabolitos con actividad insecticida

PubChem ID	Nombre del metabolito	Planta de origen	Score de Biodisponibilidad	Masa molecular (g/mol)
11261615	pipsaedine	<i>P. nigrum</i>	0,55	570,7
11203891	Pipbinine	<i>P. nigrum</i>	0,55	570,7
5372162	Pipercide	<i>P. nigrum</i>	0,55	355,7
6442405	Guineensine	<i>P. nigrum</i>	0,55	383,52
5318516	Pellitorine	<i>P. nigrum</i>	0,55	223,35
11222182	pipnoohine	<i>P. nigrum</i>	0,55	361,6
157010714	Pipwaqarine	<i>P. nigrum</i>	0,55	397,55
94896	tert-butylododecadienamida	<i>P. nigrum</i>	0,55	255,44
108624	tert-butylhexadecadienamida	<i>P. nigrum</i>	0,55	311,55
5320618	Piperanine	<i>P. nigrum</i>	0,55	287,35
247220	[(2E)-hexadecanoyl]-pyrrolidina	<i>P. nigrum</i>	0,55	309,53
11141599	(E)-Piperolein A	<i>P. nigrum</i>	0,55	315,41
638024	Piperine	<i>P. nigrum</i>	0,55	285,34
10970518	Pipzorine	<i>P. nigrum</i>	0,55	363,62
12309449	delta-Elemene		0,55	204,35
442359	alpha-Cubebene		0,55	204,35
19725	Copaene		0,55	204,35
99856	Cyperene		0,55	204,35
93081	beta-Cubebene		0,55	204,35
6918391	Beta Elemelene		0,55	204,35
91354	Aromadendrene		0,55	204,35
13894537	Bicyclogermacrene		0,55	204,35
12313020	gamma-murolene		0,55	204,35
441005	delta-Cadinene		0,55	204,35
6432404	gamma-Cadinene		0,55	204,35
92231	Spathulenol		0,55	220,35
16590	Diallyl disulfide	<i>Allium sativum L</i>	0,55	146,27
16315	Diallyl trisulfide	<i>Allium sativum L</i>	0,55	178,34
5368821	Alloocimene	<i>Blumea eriantha DC</i>	0,55	136,23
519872	Santolina triene	<i>Crossostephium chinense (L.) Makino</i>	0,55	136,23
8815	Estragole	<i>Tagetes lucida Cav</i>	0,55	148,2
10955174	Patchouli alcohol	<i>Lonicera caprifolium L</i>	0,55	222,37
12592	n-Tetracosane	<i>Coccinia grandis (L.) Voigt</i>	0,55	338,65
6949	β-trans-Guaiene	<i>Croton argyrophylloides Muell</i>	0,55	204,35
8222	n-Eicosane		0,55	282,55
595385	epi-Zonarene	<i>Cupressus arizonica var. glabra Little</i>	0,55	204,35
341779	Sesquicineole	<i>Croton rhamnifolioides Pax &amp; K.Hoffm.</i>	0,55	222,37
121719	Pinocarvone	<i>Hyssopus officinalis L.</i>	0,55	150,22
6427105	Pinocamphone		0,55	152,23
92762	alpha-Eudesmol	<i>Melaleuca leucadendra (L.) L.</i>	0,55	222,37
227829	Guaiol		0,55	222,37
12304570	Sylvestrene	<i>Zanthoxylum fagara (L.) Sarg.</i>	0,55	136,23
637520	Methyl cinnamate		0,55	162,19
3036	Clofenotane		0,55	354,49
3346	Fenthion		0,55	278,33
12304985	Globulol	<i>P. arboreum</i>	0,55	222,37
11996452	Viridiflorol	<i>Calycolpus moritzianus, Piper aduncum</i>	0,55	222,37
10398656	α-Cadinol	<i>Ocimum basilicum</i>	0,55	222,37
442353	beta-Chamigrene	<i>P. marginatum</i>	0,55	204,35
14601153	(E)-isocroweacin	<i>P. aduncum</i>	0,55	192,21
558221	AR-tumerone		0,55	216,32

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

441612	Squamocin	<i>Annonaceae</i>	0,55	622,92
16871	2-Methoxy-1,4-naphthoquinone	<i>Balsaminaceae</i>	0,55	188,18
160006	Bruceine A	<i>Simaroubaceae (Brucea javanica)</i>	0,17	522,54
167963	Mahanimbine	<i>Rutaceae</i>	0,55	331,45
96943	Girinimbine		0,55	263,33
96942	Murrayanine		0,55	225,24
68229	Seselin		0,55	228,24
72307	Sesamin		0,55	354,35
6440616	Sarniensine	<i>Nerine sarniensis</i>	0,55	221,34
375117	3-Epimacronine		0,55	329,35
345501	Desoxypodophyllotoxin	<i>Berberidaceae</i>	0,55	398,41
11972305	Cappariloside B	<i>Capparidaceae</i>	0,55	496,46
5280666	Chrysoeriol		0,55	300,26
13942832	Glochidone		0,55	422,69
222284	$\beta$ -Sitosterol	<i>Melanthiaceae</i>	0,55	414,71
445154	Resveratrol		0,55	228,24
445639	Oleic acid	<i>Piperaceae</i>	0,85	282,46
479931	Elatol		0,55	333,69
100633	Karanjin		0,55	292,29
14033983	Karanjachromene		0,55	334,37
97487	Koenimbine		0,55	293,36
10467	Arachidic acid		0,85	312,53
8215	Behenic acid		0,85	340,58
73067	(+)-Medicarpin		0,55	270,28
5280378	Formononetin		0,55	268,26
10978265	Lanceolatin B		0,55	262,26
24772948	Violanone		0,55	316,31
6432475	Carvotanacetone	<i>Asteraceae</i>	0,55	152,23
5353001	Spilanthol		0,55	221,34
8205	Dodecyl acetate		0,55	228,37
28481	Calarene		0,55	204,35
26049	careno	<i>Elaphandra quinquenervis</i>	0,55	136,24
100199	Burchellin	<i>Lauraceae</i>	0,55	340,37
5470187	Zerumbone	<i>Zingiberaceae</i>	0,55	218,33
443014	Podophyllotoxone	<i>Berberidaceae</i>	0,55	412,39
11851219	Pacharin	<i>Caesalpinioideae</i>	0,55	270,28
64971	Betulinic acid	<i>Platanaceae</i>	0,55	456,7
643779	Neral	<i>Cymbopogon nardus</i>	0,55	152,23
638011	Geranial	<i>Backhousia citriodora (90-98%), Litsea citrata (90%), Litsea cubeba (70-85%), Cymbopogon (65-85%)</i>	0,55	152,23
6987	Piperitona	<i>Lippia alba</i>	0,55	152,23
381152	Piperitenona	<i>Cymbopogon, Andropogon, and Mentha</i>	0,55	150,22
62566	$\beta$ -Bourboneno	<i>Teucrium montanum, Chromolaena odorata</i>	0,55	204,35
519764	Biciclosesquifelandreno	<i>Baccharis L.</i>	0,55	204,35
17868	$\alpha$ -Tujeno	<i>Origanum syriacum, Teucrium asiaticum</i>	0,55	136,23
31253	$\beta$ -mirceno	<i>Teucrium montanum, Xylopija aromatica</i>	0,55	136,23
7462	$\alpha$ -terpineno	<i>Xylopija aromatica, Eupatorium cannabinum</i>	0,55	136,23
7463	p-cimeno	<i>Nepeta nepetella, Xylopija aromatica, Lippia origanoides</i>	0,55	134,22
7461	$\gamma$ -terpineno	<i>Teucrium montanum, Xylopija aromatica</i>	0,55	136,23
6989	Timol	<i>Xylopija aromatica, Stachys obliqua</i>	0,55	150,22
10364	Carvacrol	<i>Xylopija aromatica, Lonicera japonica</i>	0,55	150,22
7150	Benzoato de metilo	<i>Vitis rotundifolia, Lonicera japonica</i>	0,55	136,15
8785	Acetato de bencilo	<i>Cananga odorata, Vitis rotundifolia, Tanacetum parthenium</i>	0,55	150,17
7731	p-cresol metil éter	<i>Cananga odorata and Antidesma laciniatum</i>	0,55	122,16
2758	1,8-Cineol	<i>Pimenta racemosa</i>	0,55	154,25
6654	$\alpha$ -Pino	<i>Teucrium montanum, Xylopija aromatica</i>	0,55	136,23
14896	$\beta$ -Pino	<i>Nepeta nepetella, Teucrium montanum</i>	0,55	136,23
17100	Terpineol	<i>Nepeta nepetella, Xylopija aromatica</i>	0,55	154,25
31253	Mirceno	<i>Teucrium montanum, Xylopija aromatica</i>	0,55	136,23
29025	Verbenona	<i>Eucalyptus fasciculosa, Eucalyptus intertexta</i>	0,55	150,8
3314	Eugenol	<i>Syzygium aromaticum, pimineta racemosa</i>	0,55	164,2
442497	Rotundifolona	<i>Platostoma hispidum, Mentha arvensis</i>	0,55	166,22

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

5144	safrol	<i>Piper auritum</i>	0,55	162,18
4276	miristicina	<i>Piper auritum</i>	0,55	192,21
10231	Dilapiol	<i>Piper auritum</i>	0,55	222,24
13187	2-Nonanona		0,55	142,24
8163	2-Undecanona		0,55	170,29
23634636	Triterpeno	<i>Ruta graveolens</i>	0,55	516,799
12741	2-Decanona		0,55	156,26
12310053	Geijereno	<i>Chromolaena odorata, Lalllantia peltata</i>	0,55	162,27
7460	$\alpha$ -felandreno	<i>Annona vepretorum</i>	0,55	136,23
326	cuminaldehído	<i>Xylopiya aromatica, Thymus longicaulis</i>	0,55	148,2
7439	carvona	<i>Tanacetum vulgare, Lindera erythrocarpa</i>	0,55	150,22
637563	trans-anetol	<i>Erucaria microcarpa, Anemopsis californica</i>	0,55	148,2
10659	apiol	<i>Niphogeton dissecta, Asarum hypogynum</i>	0,55	222,24
442347	carotol	<i>Ligusticum striatum, Ligusticum chuanxiang</i>	0,55	222,37
10248	elemicina	<i>Anemopsis californica, Asarum celsum</i>	0,55	208,25
617233	aliltetrametoxibenceno	<i>Arabidopsis thaliana and Licaria chrysophylla</i>	0,55	238,28
10856614	$\alpha$ -selinene	<i>Rhododendron mucronulatum, Hypericum dyeri</i>	0,55	204,35
176983	1,3,8- p- mentatrieno	<i>Dracocephalum kotschyi, Vitis vinifera</i>	0,55	134,22
11869417	asaricina	<i>Zanthoxylum austrosinense, Horsfieldia irya</i>	0,55	354,4
636750	isoasarona	<i>Blumea mollis, Asarum yakusimense</i>	0,55	208,25
636822	trans-asarona	<i>Sphallerocarpus gracilis, Asarum hypogynum</i>	0,55	208,25
22311	limoneno	<i>Teucrium montanum, Xylopiya aromatica</i>	0,55	136,23
5284507	(E) nerolidol	<i>neroli, jengibre, jazmín, lavanda, árbol de té, Cannabis sativa , y hierba de limón.</i>	0,55	222,37
5281553	$\beta$ -ocimene	<i>Porophyllum ruderale</i>	0,55	136,24
65575	cedrol	<i>Cunninghamia konishii</i>	0,55	222,37
442461	$\delta$ -3-Carene	<i>Dysphania multifida, Nasutitermes ephratae</i>	0,55	136,24
440966	(-)-Camphene	<i>Juniperus drupacea, Molopospermum peloponnesiacum</i>	0,55	136,23
28930	$\alpha$ -Fenchene	<i>Xylopiya aromatica, Juniperus drupacea</i>	0,55	136,23
18818	Sabinene	<i>Teucrium montanum, Xylopiya aromatica</i>	0,55	136,23
10545	Ascaridole	<i>Athamanta macedonica, Achillea millefolium</i>	0,55	168,23
64685	Borneol	<i>Eupatorium capillifolium, Chromolaena odorata</i>	0,55	154,25
442495	Pulegone	<i>Hedeoma multiflora, Clinopodium dalmaticum</i>	0,55	152,23
77844	3,5- dimetoxitoluene		0,55	152,19
80922	3,4,5- Trimetoxitoluene		0,55	182,22
21160126	Pregeijerene	<i>Lalllantia peltata, Pimpinella anisum, and Ruta graveolens</i>	0,55	162,27
27208	$\beta$ -Bisabolol	<i>Persicaria mitis, Teucrium asiaticum</i>	0,55	222,37
12044484	(E),(E)-Farnesol	<i>Lonicera japonica, Alpinia hainanensis</i>	0,55	312,5
520687	16-Kaurene	<i>Podocarpus nivalis, Sinapis arvensis, and Liochlaena subulata</i>	0,55	272,5
637563	(E)-Anethole	<i>Erucaria microcarpa, Anemopsis californica</i>	0,55	148,2
636822	E)-Asarone	<i>Sphallerocarpus gracilis, Asarum hypogynum</i>	0,55	208,25
5281758	(Z)-Asarone	<i>Asarum hypogynum, Asarum costatum</i>	0,55	208,25
8815	Estragole	<i>Vitis rotundifolia, Pinus sylvestris var. hamata</i>	0,55	148,2
71402779	2,2-Dimethyl-6- vinylchroman	<i>Trichogonia grazielae</i>	0,55	202,25
14104353	2-Seneciol-4- vinylphe-nol	<i>Platypodanthera melissifolia, Trichogonia campestris, and Trichogonia villosa</i>	0,55	202,25
17525	Hexyl butyrate	<i>Malpighia emarginata, Pelargonium quercifolium</i>	0,55	172,26
8163	Undecan-2-one		0,55	170,29
1615	3,4,5'-trimetóxi-3',4'- metilendióxi-7-9:7'9 diepoxilignan		0,55	193,24
9974595	pipernonaline	<i>Piper retrofractum, Piper nigrum</i>	0,55	341,4
11012859	retrofractamide A	<i>Piper mullesua, Piper retrofractum</i>	0,55	327,4
131751424	Retrofractamide D	<i>Piper retrofractum</i>	0,55	341,4
10022321	1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene		0,55	375,2
6755	2-Hidroxy-1,4-naphthoquinone	<i>Hojas de Lawsonia inermis</i>	0,55	174,15
9651	Galantamine		0,55	287,35
62566	B-bourbonene	<i>Teucrium montanum, Chromolaena odorata</i>	0,55	204,35
91457	b-eudesmol	<i>Rhododendron calostrotum, Rhododendron lepidotum</i>	0,55	222,37
7020	Xantona	<i>Maclura cochinchinensis, Harungana madagascariensis</i>	0,55	196,2
13894537	Bicyclogermacrene	<i>Teucrium montanum, Dacrydium nausoriense</i>	0,55	204,35
12097317	Borneol acetate	<i>Pinaceae</i>	0,55	196,29

**Anexo 2.** Propiedades ADME de los metabolitos seleccionados.

Compuesto	mol MW	W PSA	Donor HB	Accept HB	Log Po/w	Log HERG	Caco-2	MDC K	Log Kp	% Human Oral Absorption	PSA
2-Hidroxi-1,4-naftoquinona	174.15	0.000	1.000	4.750	0.189	-3.770	357.706	162.84	-3.491	73.758	77.28
6-Metilcoumarina	160.17	0.000	0.000	2.500	1.466	-3.850	2056.261	1078.3	-2.128	94.826	40.68
α-Felandreno	136.23	0.000	0.000	0.000	4.022	-3.432	9906.038	5899.2	-1.092	100.000	0.00
β-Cariofileno	204.35	0.000	0.000	0.000	5.888	-3.825	9906.038	5899.2	-1.406	100.000	0.00
δ-3-Careno	136.23	0.000	0.000	0.000	3.899	-3.109	9906.038	5899.2	-1.395	100.000	0.00
Ácido laurico	200.32	0.000	1.000	2.000	3.748	-2.538	284.175	161.50	-2.398	92.808	49.09
Ácido nonanóico	338.65	0.000	0.000	0.000	13.844	-6.152	9906.038	5899.2	7.633	100.000	0.00
Ácido octanóico	144.21	0.000	1.000	2.000	2.635	-1.768	239.170	134.04	-2.927	84.947	50.71
Canfeno	136.23	0.000	0.000	0.000	3.347	-2.571	9906.038	5899.2	-1.425	100.000	0.00
Carvacrol	150.22	0.000	1.000	0.750	3.298	-3.609	3687.620	2027.3	-1.815	100.000	21.46
Farnesol	222.37	0.000	1.000	1.700	4.191	-3.592	5623.792	3199.2	-1.129	100.000	21.70
Metil benzoato	136.15	0.000	0.000	2.000	2.119	-4.120	2767.828	1486.7	-1.790	100.000	36.37
n-Tetracosano	158.24	0.000	1.000	2.000	2.641	-1.932	240.797	135.02	-2.826	85.037	50.53
p-Cimeno	134.22	0.000	0.000	0.000	3.668	-3.713	9906.038	5899.2	-0.967	100.000	0.00
Quercetina	302.24	0.000	4.000	5.250	0.363	-5.115	18.195	6.510	-5.544	51.623	143.3
Sabineno	136.23	0.000	0.000	0.000	3.814	-2.863	9906.038	5899.9	-1.298	100.000	0.00
Timol	150.22	0.000	1.000	0.750	3.299	-3.589	3816.505	2104.0	-1.782	100.000	20.86
Valenceno	204.35	0.000	0.000	0.000	5.401	-3.449	9906.038	5899.2	-1.206	100.000	0.00
Verbenona	150.22	0.000	0.000	2.000	1.924	-2.516	3152.519	1711.3	-2.420	100.000	28.03
Xantona	196.20	0.000	0.000	2.500	2.722	-4.755	3521.282	1928.7	-1.144	100.000	35.41

NOTA: Valores e intervalos de valores de las propiedades ADME basados en el manual de QikProp del software Schrodinger Inc.: Mol MW: 130.0-725.0; WPSA: 0.0-174.0; DonorHB: 0.0-6.0; AcceptHB: 2.0-20.0; PlogPo/w: -2.0 - 6.5; QPlogHERG: > -5; QPPCaco (nm/sec): >25 -<500; QP log Kp for skin permeability: -8.0 - -1.0; MDCK Permeability (nm/sec): >25 -<500; % human oral absorption: >25%- <80%; PSA: 7.0 - 200.0

Anexo 3. Certificado 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020



Anexo 4. Certificado I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas 2021



Anexo 5. 49° congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN



La Sociedad Colombiana de Entomología  
SOCOLEN

Hace constar que:

María Fernanda Pérez Rojas

Participó en el 49° Congreso Colombiano de Entomología  
Celebrado los días 6, 7 y 8 de julio de 2022 en la Universidad El Bosque en Bogotá D.C.  
En calidad de:

PONENCIA ORAL

Del trabajo:

“Actividad insecticida de metabolitos de plantas medicinales identificados  
mediante técnicas *in silico*, y su efecto sobre la mitocondria de  
*Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)”



Efraín Becerra  
Presidente del Congreso



Diego Rincón  
Presidente de SOCOLEN



**BIBLIOGRAFIA**

- Abdel-Tawab H. Mossa, Samia M. M. Mohafrash, Natarajan Chandrasekaran, "Safety of Natural Insecticides: Toxic Effects on Experimental Animals", *BioMed Research International*, vol. 2018, Article ID 4308054, 17 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4308054>.
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86091-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86091-9).
- Arimori et al., Fv-clasp: An Artificially Designed Small Antibody Fragment with Improved Production Compatibility, Stability, and Crystallizability, *Structure* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2017.08.011>.
- Arun P. Kulkarni, Ernest Hodgson, Metabolism of insecticides by mixed function oxidase systems, *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 8, Issue 2, 1980, Pages 379-475, ISSN 0163-7258, [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(80\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(80)90054-6).
- Adasme et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. *NAR* 2021.
- Aydın, E., Türkez, H., & Keleş, M. S. (2013). The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology*, 66(1), 149157.
- Bano, I., Skalickova, S., Arbab, S., Urbankova, L., & Horký, P. (2022). Toxicological effects of nanoselenium in animals. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13.
- Batista, J., Tan, L. & Bajorath, J. Atom-centered interacting fragments and similarity search Applications. *J Chem Inf Model*. 50(1), 79–86 (2010).

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- Berticat, C., Bonnet, J., Duchon, S. et al. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evol Biol* 8, 104 (2008). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-104>.
- Bisset Juan. Uso correcto de los insecticida: Control de la resistencia. *Rev Cuv Med Trop*. 54(3): 202-219 (2002).
- Borrero L, Mayra; Mendez Stelia, C, Duque L, Jhonny E “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 el daño ADN” Universidad Industril de Santander Bucaramanga 2018.
- Bradford, Marion (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry*. 72 (1–2): 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999. PMID 942051.
- Braun, S & Gaza, N & Werdehausen, Robert & Hermanns, Henning & Bauer, Inge & Durieux, M & Hollmann, Markus & Stevens, Markus. (2010). Ketamine induces apoptosis via mitochondrial pathway in human lymphocytes and neuronal cells. *British journal of anaesthesia*. 105. 347-54. 10.1093/bja/aeq169.
- Byeoung-Soo Park, Hyun-Kyung Lee, Sung-Eun Lee, Xiang-Lan Piao, Gary R. Takeoka, Rosalind Y. Wong, Young-Joon Ahn, Jeong-Han Kim, Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*, 2006, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.005>.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Byers, N.M.; Fleshman, A.C.; Perera, R.; Molins, C.R. Metabolomic Insights into Human Arboviral Infections: Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses. *Viruses* 2019, 11, 225 <https://doi.org/10.3390/v11030225>.

Campbell-Lendrum, D., Manga, L., Bagayoko, M. & Sommerfeld, J. Climate change and vector-borne diseases: what are the implications for public health research and policy? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370, 20130552 (2015).

Chalchat, J.-C., Garry, R.-P., Michet, A., Benjilali, B., & Chabart, J. L. (1993). Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*L.). The Chemical Composition of Oils of Various Origins (Morocco, Spain, France). *Journal of Essential Oil Research*, 5(6), 613–618. doi:10.1080/10412905.1993.9698293.

Cheng SS, Chang HT, Chang ST, Tsai KH, Chen WJ. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresour Technol.* 2003 Aug;89(1):99-102. doi: 10.1016/s0960-8524(03)00008-7. PMID: 12676507.

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.

Christophe Wirth, Ulrich Brandt, Carola Hunte, Volker Zickermann, Structure and function of mitochondrial complex I, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 1857, Issue 7, 2016, Pages 902-914, ISSN 0005-2728, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.013>.

De Loof, A., & Schoofs, L. (2019). Mode of Action of Farnesol, the "Noble Unknown" in Particular in Ca<sup>2+</sup> Homeostasis, and Its Juvenile Hormone-Esters in Evolutionary Retrospect. *Frontiers in neuroscience*, 13, 141. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00141>.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- Degolda, R., & Murray, J. (2017). Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites. Chapter 7. In: S, Badal & R, Delgoda. Pharmacognosy. Applications and Strategy. Academic press. 93-100.
- Detmer, S., Chan, D. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 870–879 (2007). <https://doi.org/10.1038/nrm2275>.
- Dharmagadda V.S.S., S.N. Naik, P.K. Mittal, y P. Vasudevan, “Larvicidal activity of Tagetes patula essential oil against three mosquito species,” *Bioresour. Technol.*, vol. 96, no. 11, pp. 1235-1240, 2005.
- Dias, C. N., & Moraes, D. F. C. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitology Research*, 113, 565–592. <http://doi.org/10.1007/s00436-013-3687-6>.
- Dickman, S., & Bray, R. (1940). Colorimetric determination of phosphate. *Industrial Ad Enginnering Chemistry*, 12(11), 665–668. <https://doi.org/10.1021/ac50151a013>.
- DNVLA, 2012. Manual de Normas y Procedimientos técnicos. Para la Vigilancia y lucha antivectorial. Editorial Ciencias Médicas La Habana, Cuba.
- Dominguez, M., Economopoulou, A., Helynck, B., Sissoko, D., Wichmann, O., Quenel, P. Quatresous, I. (2009). Atypical Chikungunya virus infections: Clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. *Epidemiology and Infection*, 137(4), 534-541. doi:10.1017/S0950inst268808001167.
- Dong Hwan Parka , Jae Young Choia , Seok-Hee Leea , Jong Hoon Kima , Min Gu Parka , Jun Young Kima , Minghui Wanga , Hyun Ji Kima , Yeon Ho Je. Mosquito larvicidal activities of farnesol and

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

farnesyl acetate via regulation of juvenile hormone receptor complex formation in *Aedes* mosquito.

Journal of Asia-Pacific Entomology. Volume 23, Issue 3, 2020, Pages 689-693, ISSN 1226-8615,

<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.05.006>.

Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:145-69. doi: 10.1007/978-1-4614-3573-0\_6. PMID: 22729857.

Dumoulin, R., Sagnol, I., Ferlin, T., Bozon, D., Stepien, G. and Mousson, B. (1996) A novel gly290asp mitochondrial cytochrome b mutation linked to a complex III deficiency in progressive exercise intolerance. *Mol. Cell Probes*, 10, 389–39.

Elson WH, Riley-Powell AR, Morrison AC, Gotlieb EE, Groessl EJ, Cordova JJ, et al. (2020) Measuring health related quality of life for dengue patients in Iquitos, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 14(7): e0008477. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008477>.

Esser, B. Quinn, Y.F. Li, M. Zhang, M. Elberry, L. Yu, C.A. Yu, D. Xia, Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome bc(1) complex, *J. Mol. Biol.* 341 (2004) 281–302.

Fairn GD, Macdonald K, McMaster CR. A chemogenomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* uncovers a primary role for the mitochondria in farnesol toxicity and its regulation by the Pkc1 pathway. *J Biol Chem.* 2007;282:4868–4874.

Ferreira L. G., R. N. Dos Santos, G. Oliva, and A. D. Andricopulo. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7):13384–421, 2015

Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays Of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114–120.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- Friesner, R.A., J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, J.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis, P.S. Shenkin, Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy, *Journal of Medicinal Chemistry*. 47 (2004) 1739–1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>.
- Gerth, H. Irschik, H. Reichenbach, W. Trowitzsch, Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (myxobacterales). Cultivation, isolation, physicochemical and biological properties, *J. Antibiot.* 33 (1980) 1474–1479.
- Ghosh, A., Chowdhury, N., & Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The Indian journal of medical research*, 135(5), 581–598
- Gomes, F., Teixeira, P., Cerca, N. et al. Effect of Farnesol on Structure and Composition of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Matrix. *Curr Microbiol* 63, 354 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9984-3>
- Goyal, M., et al. Recent development in the strategies projected for chikungunya vaccine in humans. *Drug Design Development and Therapy*, 2018. 12: p. 4195-4206.
- Group Department of Computer Science University College, Building Homology Models with Prime: A Case Study with Factor Xa Bioinformatics London Gower Street London WC1E 6BT United Kingdom.
- Gubler, D. J., & Clark, G. G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging infectious diseases*, 1(2), 55–57. <https://doi.org/10.3201/eid0102.952004>
- Gunther, F. A. y Jeppson, L. R. 1969. *Insecticidas modernos y la producción mundial de alimentos*. Campaña Editorial Continental. 3ª impresión. 293 p.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- Halbert, Susan & Corsini, D. & Wiebe, M. & Vaughn, S.F.. (2009). Plant-derived compounds and extracts with potential as aphid repellents. *Annals of Applied Biology*. 154. 10.1111/j.1744-7348.2008.00300.x.
- Halgren, T. A. , R. B. Murphy, R. A. Friesner, H. S. Beard, L. L. Frye, W. T. Pollard, and J. L. Banks. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. enrichment factors in database screening. *J Med Chem*, 47(7):1750–9, 2004.
- Halstead, S. B. (2018). Which dengue vaccine approach is the most promising, and should we be concerned about enhanced disease after vaccination? There is only one true winner. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(6), a030700.
- Hannah R. Bridges, James A. Birrell, Judy Hirst; (2011) The mitochondrial-encoded subunits of respiratory complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase): identifying residues important in mechanism and disease. *Biochem Soc Trans* 1 June 2011; 39 (3): 799–806. doi: <https://doi.org/10.1042/BST0390799>.
- Harborne J.B (1980) Plant phenolics. *Plant physiology*. Pp 329-395
- Hirst Judy Mitochondrial Complex I *Annual Review of Biochemistry* Vol. 82:551-575 (Volume publication date June 2013) First published online as a Review in Advance on March 18, 2013 <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-070511-103700>
- Hltje H , Sippl W , Rognan D Folkers G. *Molecular Modeling : Basic Principles and Applications* . Wiley VCH , 2 edition , 2003.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331:717-R719

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Instituto Nacional de Salud (INS) , Boletín semanal por las entidades territoriales (ET) al Instituto Nacional de Salud (INS) a través del Sistema de vigilancia en salud pública (Sivigila), del gobierno nacional de Colombia, boletín epidemiológico semana 13, año 2022.  
[https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2022\\_Boletin\\_epidemiologico\\_semana\\_13.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2022_Boletin_epidemiologico_semana_13.pdf)

Iqra Naveed Akhtar, Chapter 6 - Viral genetics and structure, Dengue Virus Disease, Academic Press 2020, Pages 85-113, ISBN 9780128182703, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818270-3.00006-0>.

Iwamura, T., Guzman-Holst, A., & Murray, K. A. (2020). Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nature Communications*, 11(1). doi:10.1038/s41467-020-16010-4.

J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 5, 1399–140 Publication Date: January 22, 2003  
<https://doi.org/10.1021/jf020872f>.

Jeng M, Hall C, Crane FL, Takahashi N, Tamura S, Folkers K. Inhibition of mitochondrial electron transport by piericidin A and related compounds. *Biochemistry*. 1968 Apr;7(4):1311-22.

Jiménez-Jiménez Sara, Natalia Casado, María Ángeles García, María Luisa Marina, Enantiomeric analysis of pyrethroids and organophosphorus insecticides, *Journal of Chromatography A*, Volume 1605, 2019, 360345, ISSN 0021-9673, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.06.066>.

Joo and A. M. Jetten, “Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis,” *Cancer Letters*, vol. 287, no. 2, pp. 123–135, 2010.

Joo JH, Liao G, Collins JB, Grissom SF, Jetten AM. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res*. 2007;67:7929–7936.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Journe, G. Laurent, C. Chaboteaux et al., “Farnesol, a mevalonate pathway intermediate, stimulates MCF-7 breast cancer cell growth through farnesoid-X-receptor-mediated estrogen receptor activation,” *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 107, no. 1, pp. 49–61, 2008.

Karine Megy, Scott J. Emrich, Daniel Lawson, David Campbell, Emmanuel Dialynas, Daniel S.T. Hughes, Gautier Koscielny, Christos Louis, Robert M. MacCallum, Seth N. Redmond, Andrew Sheehan, Pantelis Topalis, Derek Wilson, the VectorBase Consortium, VectorBase: improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics, *Nucleic Acids Research*, Volume 40, Issue D1, 1 January 2012, Pages D729–D734, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1089>.

Kendall C, Hudelson P, Leontsini E, Winch P, Lloyd L, Cruz F. Urbanization, dengue, and the health transition: Anthropological contributions to international health. ; 5: p. 257-268.

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.

Kong, J., Zhang, Y., Ju, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Quek, S., & Yao, W. (2019) Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes. *Food Chemistry*, 285 (1), 380- 388.

Lagace TA, Miller JR, Ridgway ND. Caspase processing and nuclear export of CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha during farnesol-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2002;22:4851–4862.

Lenaz, G., Bovina, C., D'Aurelio, M., Fato, R., Formiggini, G., Genova, ML, Giuliano, G., Merlo, PM, Paolucci, U., Parenti, CG y Ventura, B. (2002) *Ann. Academia de Nueva York. ciencia* 959 199-213.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. and Feeney, P.J. (1997) Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- Lobo N.F., Lovin D., DeBruyn B., Puiu D., Shumway M., Haas B., Nene V., Severson D.W. The mitochondrial genome of the Yellow fever mosquito - *Aedes aegypti*. Submitted (DEC-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases
- M.J. Jordán, R.M. Martínez, K.L. Goodner, E.A. Baldwin, J.A. Sotomayor, Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition, 2006, Pages 253-263, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.011>.
- Machida, K., Tanaka, T., Fujita, K., & Taniguchi, M. (1998). Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 180(17), 4460–4465. <https://doi.org/10.1128/JB.180.17.4460-4465.1998>
- Mason, T. L., Poyton, R. O., Wharton, C. D., & Schatz, G. (1973). Cytochrome c oxidase from bakers' yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(4), 1346–1354. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/248/4/1346%0AFind>.
- Masatoshi Murai, Sayako Habu, Sonomi Murakami, Takeshi Ito & Hideto Miyoshi (2015) Production of new amilorides as potent inhibitors of mitochondrial respiratory complex I, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79:7, 1061-1066, DOI: 10.1080/09168451.2015.1010479.
- Marrufo T, Nazzaro F, Mancini E, Fratianni F, Coppola R, De Martino L, Agostinho AB, De Feo V. Composición química y actividad biológica del aceite esencial de hojas de *Moringa oleifera* Lam.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Cultivado en Mozambique. Moléculas . 2013; 18 (9): 10989-11000.  
<https://doi.org/10.3390/molecules180910989>.

Martin Y.C., Let's not forget tautomers, Journal of Computer-Aided Molecular Design. 23 (2009) 693–704. <https://doi.org/10.1007/s10822-009-9303-2>.

Mellors, A; Tappel, AL (1966). "The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol". The Journal of Biological Chemistry. 241 (19): 4353–6. PMID 5922959.

Melo-Santos, J.J.M. Varjal-Melo, A.P. Araújo, T.C.S. Gomes, M.H.S. Paiva, L.N. Regis, A.F. Furtado, T. Magalhaes, M.L.G. Macoris, M.T.M. Andrighetti, C.F.J. Ayres, Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil, Acta Tropica, Volume 113, Issue 2, 2010, Pages 180-189, ISSN 0001-706X, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.015>.

Mironova, Galina Yu; Mazumdar, Neil; Hashad, Ahmed M; El-Lakany, Mohammed A; Welsh, Donald G. "Defining a role of NADPH oxidase in myogenic tone development". Microcirculation ; 29(3): e12756, 2022 Apr. Texto en inglés | MEDLINE | ID: mdl-35289024.

Monzote L, Stamberg W, Staniek K, Gille L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Nov 1;240(3):337-47. doi: 10.1016/j.taap.2009.08.001. Epub 2009 Aug 8. PMID: 19666043.

Morrison AC, Zielinski-Gutierrez E, Scott TW, Rosenberg R (2008) Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti*. PLoS Med 5(3): e68. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050068>.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- Mossa, Abdeltawab. (2016). Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. *Journal of Environmental Science and Technology*. 9. 354-378. 10.3923/jest.2016.354.378.
- Muhayimana S, Zhang X, Xu J, Xiong H, Luan S, Zhu Q, Huang Q. Cytotoxic selectivity and apoptosis induction of piericidin A contributes potentially to its insecticidal effect against *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pestic Biochem Physiol*. 2019 Jun;157:19-25. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.03.002. Epub 2019 Mar 5. PMID: 31153468.
- Muñoz Jazmín Adriana, Elena Staschenko, Clara Beatriz Ocampo D Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Insecticidal activity of essential oils from native plants against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología* 40 (2): 198-202 (Julio - Diciembre 2014).
- Mura, M., & Tournier, J. N. (2020). Chikungunya vaccine: a single shot for a long protection? *The Lancet Infectious Diseases*. doi:10.1016/s1473-3099(20)30286-3.
- Myers S, Baker A. Drug discovery--an operating model for a new era. *Nat Biotechnol*. 2001 Aug;19(8):727-30. doi: 10.1038/90765. PMID: 11479559.
- Naini, Ali B.; Lu, Jiesheng; Kaufmann, Petra; Bernstein, Richard A.; Mancuso, Michelangelo; Bonilla, Eduardo; Hirano, Michio; DiMauro, Salvatore (2005). Novel Mitochondrial DNA ND5 Mutation in a Patient With Clinical Features of MELAS and MERRF. *Archives of Neurology*, 62(3), 473–. doi:10.1001/archneur.62.3.473.
- Nakamaru-Ogiso, E., Kao, M.-C., Chen, H., Sinha, S. C., Yagi, T., & Ohnishi, T. (2010). The Membrane Subunit NuoL(ND5) Is Involved in the Indirect Proton Pumping Mechanism of *Escherichia coli* Complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 39070–39078.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Nishikimi, M., Appaji Rao, N., & Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849–854. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(72\)80218-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(72)80218-3).

Noriega, G. Fernando .Department of Biological Sciences, Florida International University, Miami, FL 33199, USA Correspondence should be addressed to Fernando G. Noriega; [noriegaf@fiu.edu](mailto:noriegaf@fiu.edu)  
Received 11 May 2014; Accepted 26 July 2014; Published 19 October 2014. Volume 2014, Article ID 967361, 16 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/967361>.

Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica*. 2011;118:37-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.007>.

Ohnishi, ST, Ohnishi, T., Muranaka, S., Fujita, H., Kimura, H., Uemura, K., Yoshida, K. y Utsumi, K. (2005) *J. Bioenerg. biomembrana* 37 1-15.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). El agravamiento de la situación del dengue y dengue hemorrágico en las Américas, Trienio 1996-1998- Recursos de información OPS.

Organización Panamericana de la Salud (PAHO) Epidemiological Update for Dengue and other Arboviruses, 2022 Actualizado: Jul 11 2022 [https://ais.paho.org/ha\\_viz/arbo/pdf/OPS%20Arbo%20Boletin%202022.pdf](https://ais.paho.org/ha_viz/arbo/pdf/OPS%20Arbo%20Boletin%202022.pdf).

Organización Panamericana de la Salud (OPS) OPS/OMS Plataforma de Información de Salud para las Américas (PLISA) (2022).

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Ozkan A, Erdogan A. A comparative study of the antioxidant/prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant H1299 cells. *Nat Prod Commun.* 2012 Dec;7(12):1557-60. PMID: 23413548.

Pan American Health Organization (PAHO) Chikungunya worldwide overview Geographical distribution of dengue cases reported worldwide, 2020 Period: 01 Jan 2020 – 24 Nov 2020 Geographical distribution of dengue cases reported worldwide, 2020, European Centre for Disease Prevention and Control An agency of the European Union: <https://www.ecdc.europa.eu/en/chikungunya-monthly>.

Park, JH., Jeon, YJ., Lee, CH. et al. Toxicidades insecticidas de carvacrol y timol derivados de *Thymus vulgaris* Lin. contra *Pochazia shantungensis* Chou & Lu., plaga de reciente registro. Informe científico 7, 40902 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep40902>.

Peter Mitchell (1976). Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. 62(2), 327–367. doi:10.1016/0022-5193(76)90124-7.

Pergaud, L; Kuete, V. (2013). Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa. En V, Kuete., (Ed.). (2013). Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry.

Pietro Miscione Dr. Gian, Dr. Marco De Vivo, Sebastian Franco Ulloa. Application of Molecular Mechanics for the Discovery of Novel Microbial IIA Topoisomerases Inhibitors Chemistry Department Faculty of Sciences University of Los Andes Colombia May, 2016.

Pimsamarna S, Sorpengb W, Akksilpb S, Paepornc S, Limpawitthayakulb M. Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* to organophosphate and synthetic pyrethroid compounds in the north-east of Thailand. *Dengue Bull.* 2009;33:194-202.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- Pitarokili, D., Tzakou, O., & Loukis, A. (2006). Essential oil composition of *Salvia verticillata*, *S. verbenaca*, *S. glutinosa* and *S. candidissima* growing wild in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(4), 670–673. doi:10.1002/ffj.1647.
- Pryde KR, Hirst J. 2011. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J. Biol. Chem.* 286:18056–65.
- Pullman, M., Penefsky, H., Datta, A., & Racker, E. (1960). Partial resolution oxidative of the enzymes phosphorylation catalyzing. *The Journal of Biological Chemistry*, 235(11), 3322– 3329. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13738472>.
- Ràfols, C., Bosch, E., Barbas, R., & Prohens, R. (2016). The Ca(2+)-EDTA chelation as standard reaction to validate Isothermal Titration Calorimeter measurements (ITC). *Talanta*, 154, 354-9 .
- Regnault-Roger , C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews* 2, 25–34 (1997). <https://doi.org/10.1023/A:1018472227889>.
- Regnault-Roger, C. 2004. Nuevos insecticidas para el tercer milenio. En: *Biopesticidas de origen vegetal*. En: Regnault-Roger, C.; Philogene, B. y Vincent, C, (Ed). Ediciones Mundiprensa, Madrid, p19-40.
- Reina, J. (2018). Situación actual de las vacunas frente al virus Zika. *Vacunas*, 19(1), 18–23. doi:10.1016/j.vacun.2017.05.004.
- Rich PR, Maréchal A. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* 2010;47:1-23. doi: 10.1042/bse0470001. PMID: 20533897.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Rodriguez M, Bisset J, Fernandez Ditter, Perez O. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos, *Rev Cubana Med Trop.* 2004;56(1):54-60.

Rodríguez María M., Juan A. Bisset, Yaxsier De Armas, Francisco Ramos "Pyrethroid Insecticide-Resistant Strain Of *Aedes Aegypti* From Cuba Induced By Deltamethrin Selection," *Journal Of The American Mosquito Control Association*, 21(4), 437-445, (1 December 2005).

Roullet, R. L. Spaetgens, T. Burlingame, Z. Feng, and G. W. Zamponi, "Modulation of neuronal voltage-gated calcium channels by farnesol," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 36, pp. 25439–25446, 1999.

Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F. & Schroeder, M. PLIP: fully automated protein – ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* 43(W1), W443–W447 (2015).

Sastry G.M., G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments, *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* 27 (2013) 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>.

Selivanov, V. A., Zeak, J. A., Roca, J., Cascante, M., Trucco, M., & Votyakova, T. V. (2008). The role of external and matrix pH in mitochondrial reactive oxygen species generation. *The Journal of biological chemistry*, 283(43), 29292–29300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801019200>.

Seon Yeon Cho, Seona Lim, Kwang Seok Ahn, Hyun Jeong Kwak, Jinbong Park, Jae-Young Um, Farnesol induces mitochondrial/peroxisomal biogenesis and thermogenesis by enhancing the

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

AMPK signaling pathway in vivo and in vitro, *Pharmacological Research*, Volume 163, 2021, 105312, ISSN 1043-6618, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105312>.

Shaalán EAS, Canyonb D, Younesc MWF, AbdelWahaba H, Mansoura AH. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ Int.* 2005 Oct; 3(8): 1149–66.

Sharma L. K., Lu J., Bai Y. (2009) Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr. Med. Chem.* 16, 1266-1277.

Schrödinger Release 2021-2: Maestro, Schrödinger Manual Protein Structure Alignment, LLC, New York, NY, 2021.

Sies, H., Koch, O. R., Martino, E., & Boveris, A. (1979). Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Letters*, 103(2), 287–290. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81346-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81346-0).

Signer, T. P. (1974) Determination of the activity of succinate, NADH, choline α-glycerophosphate dehydrogenases. In D Glick (Ed) *Methods of Biochemical analysis* (Vol. 22, pp 123-175) Hoboken, NJ USA: John Wiley & Sons, Inc, <https://doi.org/10.1002/978047011023.ch3>.

Singh, K., Muthusamy, K. Molecular modeling, quantum polarized ligand docking and structure-based 3D-QSAR analysis of the imidazole series as dual AT1 and ETA receptor antagonists. *Acta Pharmacol Sin* 34, 1592–1606 (2013). <https://doi.org/10.1038/aps.2013.129>.

Sisay, B., Tefera, T., Wakgari, M., Ayalew, G., & Mendesil, E. (2019). The Efficacy of Selected Synthetic Insecticides and Botanicals against Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Maize. *Insects*, 10(2), 45. <https://doi.org/10.3390/insects10020045>.

ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- Slater, E.C. (1967). Oxidation and Phosphorylation Volume 10 Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation., 48–57. doi:10.1016/0076-6879(67)10011-6.
- So Iwata, Joong W. Lee, Kengo Okada, John Kyongwon Lee, Momi Iwata, Bjarne Rasmussen, Thomas A. Link, S. Ramaswamy, Bing K. Jap, Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc1 Complex, *Science* 281, 64 (1998).
- Somlo, M (1965) Induction des lactico-cytochrome c reductase de la levure aerobie par es actates. *Biochimica e Singt Biophysica Acta*, 4, 183-201. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(65\)90083-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(65)90083-8)
- Sousa JS, D'Imprima E, Vonck J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Subcell Biochem.* 2018;87:167-227. doi: 10.1007/978-981-10-7757-9\_7. PMID: 29464561.
- Sukumar K, Perich MJ, Boobar LR. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J Am Mosq Control Assoc.* 1991;7:210–37.
- Sulimov Vladimir B, Danil C. Kutov, Alexey V. Sulimov, *Advances in Docking, Current Medicinal Chemistry*, 10.2174/0929867325666180904115000, 26, 42, (7555-7580), (2020).
- Sunaiyana Sathantriphop, Kanutcharee Thanispong, Unchalee Sanguanpong, Nicole L. Achee, Michael J. Bangs, Theeraphap Chareonviriyaphap, Comparative Behavioral Responses of Pyrethroid–Susceptible and –Resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations to Citronella and Eucalyptus Oils, *Journal of Medical Entomology*, Volume 51, Issue 6, 1 November 2014, Pages 1182–1191, <https://doi.org/10.1603/ME13191>.
- Strack D. (1997) Phenolic Metabolism *Plant physiology* pp 399-416.

## ATIVIDADE DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

Tássio Rômulo Silva Araújo Luz, Ludmilla Santos Silva de Mesquita, Flavia Maria Mendonça do Amaral, Denise Fernandes Coutinho, Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae, Volume 212, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105705>.

Taylor, R., Morris, A., Hutchinson, M. et al. Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation. *Eur J Hum Genet* 10, 141–144 (2002). <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200773>.

Thai L, Rush JS, Maul JE et al. Farnesol is utilized for isoprenoid biosynthesis in plant cells via farnesyl pyrophosphate formed by successive monophosphorylation reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 13080–13085.

The UniProt Consortium, UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue D1, 08 January 2019, Pages D506–D515, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>.

Tine Y, Renucci F, Costa J, Wélé A, Paolini J. A Method for LC-MS/MS Profiling of Coumarins in *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) B. Zepernich and Timler Extracts and Essential Oils. *Molecules*. 2017; 22(1):174. <https://doi.org/10.3390/molecules22010174>.

Unwalla, R. J., Cross, J. B., Salaniwal, S., Shilling, A. D., Leung, L., Kao, J., & Humblet, C. (2010). Using a homology model of cytochrome P450 2D6 to predict substrate site of metabolism. *Journal of computer-aided molecular design*, 24(3), 237-256.

Vasilakis, N., & Gubler, D. J. (Eds.). (2016). *Arboviruses : Molecular biology, evolution and control*. ProQuest Ebook Central <https://ebookcentral.proquest.com>.

Von Jagow G, Ljungdahl PO, Graf P, Ohnishi T, Trumpower BL (1984). An inhibitor of mitochondrial respiration which binds to cytochrome b and displaces quinone from the iron-sulfur protein of the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 259(10): 6318-26.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- Von Jagow G, Ohnishi T (1985). The chromone inhibitor stigmatellin-binding to the ubiquinol oxidation center at the C-side of the mitochondrial membrane. *FEBS Lett* 185(2): 311-5.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242:1427-1430.
- Wan, Hong. "What ADME Tests Should Be Conducted for Preclinical Studies?" *Admet & Dmpk*, 1, no. 3, 2013, doi:10.5599/admet.1.3.9.
- Weaver S C, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 523-40.
- Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320:1163–1170.
- Wojtek Steffen, Anja C. Gemperli, Nevena Cvetic, Julia Steuber, Organelle-specific expression of subunit ND5 of human complex I (NADH dehydrogenase) alters cation homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research*, Volume 10, Issue 6, September 2010, Pages 648–659, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00643.x>.
- Xiao YM, Esser L, Zhou F, Li C, Zhou YH, Yu CA, Qin ZH, Xia D. Studies on inhibition of respiratory cytochrome bc1 complex by the fungicide pyrimorph suggest a novel inhibitory mechanism. *PLoS One.* 2014 Apr 3;9(4):e93765. doi: 10.1371/journal.pone.0093765. PMID: 24699450; PMCID: PMC3974799.

## ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS SOBRE *Aedes aegypti*

- Xiao Y , Williams D. Molecular docking using genetic algorithms . In SAC 94 : Proceedings of the 1994 ACM symposium on Applied computing , pages 196-200 , New York , NY , USA , 1994. ACM.
- Xie, Y. Yang, A.E. Muruato, J. Zou, C. Shan, B.T. Nunes, et al. Understanding zika virus establiity and developing a chimeric vaccine through functional analysis. Laboratory Inovio Pharmaceuticals (EE. UU.).
- Yang J , Kao C. A family competition evolutionary algorithm for auto mated docking of flexible ligands to proteins . Information Technology in Biomedicine IEEE Transactions on , 4 ( 3 ) : 225-237 , Sept. 2000
- You J, Tang T, Wang F, Mao T, Yuan B, Guo J, Guo X, Duan Y, Huang J. Baseline Sensitivity and Control Efficacy of Strobilurin Fungicide Pyraclostrobin Against *Sclerotium rolfsii*. *Plant Dis.* 2021 Nov;105(11):3503-3509. doi: 10.1094/PDIS-01-21-0176-RE. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34003039.
- 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](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_28).