

Actividad insecticida de metabolitos secundarios de plantas medicinales contra *Aedes aegypti* y estudio del mecanismo de acción basado en la bioenergética mitocondrial, inhibición de la acetilcolinesterasa y daño en ADN.

Mayra Alejandra Borrero Landazábal

Trabajo de grado para optar por el título de Magister en Química

Director:

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Doctora en Bioquímica

Codirector:

Jonny Edward Duque Luna

Doctor en Ciencias Biológicas (Entomología)

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Magister en Química

Bucaramanga

2018

*A mis queridos hermanos Laura, Carlos y Daniel.*

### **Agradecimientos**

A la vida por permitirme cumplir este objetivo y por toda la sabiduría que trajo consigo.

A mi familia y amigos por su compañía y amor incondicional.

A Elkin por todo su apoyo durante esta etapa, por escucharme, darme ánimos y por inspirarme para ser cada día mejor.

A la profesora Stelia por todas sus enseñanzas, por ser mi maestra dentro y fuera del laboratorio, y por creer en mis capacidades. Al profesor Jonny por enseñarme a valorar más lo que hacemos y por obligarme a dar siempre lo mejor de mí.

A mis compañeros del GIBIM-laboratorio 402, por el buen ambiente de trabajo y la buena vibra, especialmente a mi amiga Natalia por hacer las horas de trabajo más divertidas y a mi amigo Luisk por siempre estar ahí para reírse de mis problemas y hacerlos ver más pequeños de lo que parecen.

A mis compañeros del CINTROP-LEM, por toda su colaboración durante esta investigación, especialmente a Ruth por su amabilidad y disposición para ayudar.

A COLCIENCIAS por hacerme beneficiaria del programa Jóvenes Investigadores e Innovadores durante los años 2015 y 2016.

A la Universidad Industrial de Santander, especialmente al programa de Posgrado en Química por hacerme beneficiaria de la beca de Maestría durante un semestre.

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

**Tabla de contenido**

Introducción .....	15
1. Marco de referencia y antecedentes .....	18
1.1 <i>Aedes aegypti</i> como vector de enfermedades.....	18
1.2 Control epidemiológico y resistencia.....	20
1.3 Insecticidas botánicos .....	22
1.4 Mecanismos de acción .....	27
1.4.1 Acetilcolinesterasa .....	31
1.4.1.1 Insecticidas organofosforados.....	36
1.4.1.2 Carbamatos .....	37
1.4.2 Bioenergética mitocondrial.....	38
1.4.2.1 La mitocondria.....	39
1.4.2.2 Cadena respiratoria mitocondrial .....	40
1.4.2.3 Complejo I .....	41
1.4.2.4 Complejo II .....	43
1.4.2.5 Complejo III.....	44
1.4.2.6 Complejo IV.....	46
1.4.2.7 Complejo V .....	48
1.4.2.8 Insecticidas que afectan la cadena respiratoria mitocondrial .....	50
1.4.3 Daño sobre el ADN.....	52

2. Objetivos.....	56
2.1 Objetivo general.....	56
2.2 Objetivos específicos .....	56
3. Metodología .....	57
3.1 Análisis in silico y selección de metabolitos secundarios.....	57
3.1.1 Propiedades fisicoquímicas.....	59
3.1.2 Puntajes de bioactividad .....	60
3.1.3 Riesgo de toxicidad.....	61
3.1.4 Similitud con drogas .....	62
3.1.5 Análisis de componentes principales (CP).....	62
3.1.6 Cálculo del CL <sub>50</sub> relativo.....	63
3.2 Evaluación de metabolitos con actividad insecticida.....	63
3.2.1 Cría de mosquitos .....	64
3.2.2 Actividad larvicida.....	64
3.3 Estudio del mecanismo de acción .....	65
3.3.1 Evaluación del daño sobre ADN de <i>Aedes aegypti</i> .....	66
3.3.2 Inhibición de la acetilcolinesterasa .....	67
3.3.2.1 Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa comercial .....	67
3.3.2.2 Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa a partir de extracto de larvas .....	68
3.3.3 Enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.....	68
3.3.3.1 Aislamiento de mitocondrias de larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	68

3.3.3.2 Preparación de la suspensión de mitocondrias para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales .....	69
3.3.3.3 Cuantificación de proteína .....	69
3.3.3.4 Determinación de la actividad enzimática .....	69
3.3.3.4.1 NADH oxidasa.....	70
3.3.3.4.2 NADH deshidrogenasa .....	70
3.3.3.4.3 NADH citocromo c reductasa .....	70
3.3.3.4.4 Succinato deshidrogenasa .....	71
3.3.3.4.4 Succinato oxidasa.....	71
3.3.3.4.5 Citocromo c oxidasa.....	72
3.3.3.4.6 Actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas .....	72
3.4 Preparación y evaluación de mezclas de metabolitos secundarios .....	73
3.5 Análisis estadístico.....	73
3.6 Disposición de residuos .....	74
4. Resultados y discusión.....	74
4.1 Análisis in silico y selección de metabolitos secundarios.....	75
4.2 Evaluación de la actividad larvicida .....	81
4.3 Estudio del mecanismo de acción .....	83
4.3.1 Efecto sobre ADN de <i>Ae. aegypti</i> .....	84
4.3.2 Efecto sobre acetilcolinesterasa .....	87
4.3.2.1 Acetilcolinesterasa comercial .....	87
4.3.2.2 Acetilcolinesterasa de homogeneizado de larvas de <i>Ae. aegypti</i> . .....	89

4.3.3 Efecto sobre las enzimas de la cadena respiratoria .....	91
4.4 Actividad adulticida .....	101
4.5 Preparación y evaluación de las mezclas de metabolitos secundarios .....	103
5. Conclusiones .....	107
6. Recomendaciones .....	109
Referencias.....	111
Apéndices.....	137

**Tabla de figuras**

Figura 1. Hidrólisis de la acetilcolina .....	32
Figura 2. Mecanismo de acción de AChE en la neurotransmisión. ....	33
Figura 3. Garganta de AChE y triada catalítica. ....	33
Figura 4. Mecanismo de hidrólisis de la acetilcolina catalizada por AChE .....	34
Figura 5. Insecticidas organofosforados. ....	37
Figura 6. Carbamatos insecticidas. ....	38
Figura 7. Cadena respiratoria mitocondrial. ....	41
Figura 8. Sistema de bombeo de protones de NADH ubiquinona oxidoreductasa.....	42
Figura 9. Succinato-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II).....	43
Figura 10. Complejo III, citocromo bc <sub>1</sub> y ciclo de la ubiquinona Q.....	45
Figura 11. Estructura del complejo citocromo aa <sub>3</sub> .....	47
Figura 12. ATPasa. ....	48
Figura 13. Estructuras de algunos insecticidas inhibidores del complejo I. ....	51
Figura 14. Estructura de algunos insecticidas inhibidores del complejo III. ....	52
Figura 15. Reacción de Ellman.....	67
Figura 16. Gráfico de sedimentación del análisis CP. ....	75
Figura 17. Puntaje de bioactividad de los metabolitos asignado por <i>Molinspiration</i> . ....	79
Figura 18. Estructura molecular de los metabolitos seleccionados por el análisis <i>in silico</i> . ....	81
Figura 19. Electroforesis de ADN aislado de larvas de <i>Ae. aegypti</i> tratadas durante 24h. ....	85
Figura 20. Electroforesis de ADN aislado de larvas de <i>Ae. aegypti</i> tratadas durante 48h.....	85

Figura 21. Electroforesis de ADN aislado de larvas de <i>Ae. aegypti</i> tratado durante el proceso de homogenización .....	86
Figura 22. Electroforesis de ADN aislado de larvas de <i>Ae. aegypti</i> y tratado directamente.. .....	87
Figura 23. Efecto de metabolitos secundarios sobre la actividad de AChE comercial.....	88
Figura 24. Efecto de metabolitos secundarios sobre la actividad de AChE de homogeneizado de larvas.....	90
Figura 25. Actividad de la NADH oxidasa .....	92
Figura 26. Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de NADH deshidrogenasa.. .....	94
Figura 27. Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de succinato oxidasa.. .....	95
Figura 28. Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de succinato deshidrogenasa.. .....	96
Figura 29. Efecto de los metabolitos secundarios sobre NADH citocromo c reductasa. ....	98
Figura 30. Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de citocromo c oxidasa. ....	99
Figura 31. Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de ATPasa.....	100
Figura 32. Porcentaje de mortalidad de mezclas de metabolitos sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> . ...	105

**Tabla de Apéndices**

Apéndice A. Matriz de valores obtenidos por las herramientas Molinspiration y Osiris. .... 137  
Apéndice B. CL<sub>50</sub> relativo calculado para los metabolitos. .... 139

## RESUMEN

**TÍTULO:** ACTIVIDAD INSECTICIDA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS MEDICINALES CONTRA *Aedes aegypti* Y ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN BASADO EN LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA Y DAÑO EN ADN \*

**AUTOR:** MAYRA ALEJANDRA BORRERO LANDAZÁBAL\*\*

**PALABRAS CLAVE:** ACTIVIDAD INSECTICIDA, *Aedes aegypti*, METABOLITOS SECUNDARIOS, BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, ACETILCOLINESTERASA.

### DESCRIPCIÓN:

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de los virus del Dengue, Zika y Chikunguña. Debido a la ausencia de un tratamiento específico o una vacuna efectiva, el control de estas enfermedades se centra en la eliminación de potenciales criaderos y al uso de insecticidas. Los insecticidas más usados se han asociado con resistencia en el vector, por lo que surge la necesidad de descubrir nuevos compuestos insecticidas. En este estudio, se usaron herramientas bioinformáticas para seleccionar siete compuestos a partir de un grupo de 33 metabolitos reportados en un estudio previo. Se realizó un análisis de componentes principales, en donde se compararon las propiedades fisicoquímicas, bioactividad, similitud con fármacos y riesgo de toxicidad de los metabolitos evaluados. Posteriormente, se evaluó la actividad larvica de los siete metabolitos seleccionados, calculando las concentraciones ( $CL_{50}$ ): 44, 41, 48, 84, 87, 98 y 183 ppm, para el acetato de geranilo,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno, geraniol, nerol, n-octanol y 1,8-cineol, respectivamente. Las seis moléculas con  $CL_{50} < 100$  ppm fueron evaluadas en la enzima acetilcolinesterasa y en los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial de *Ae. aegypti*. Cuatro de estos metabolitos mostraron una inhibición marcada en varias dianas. El acetato de geranilo inhibió principalmente la actividad de acetilcolinesterasa en 38%,  $\alpha$ -humuleno inhibió los complejos II, III y IV de la cadena respiratoria (38, 35 y 30%, respectivamente),  $\beta$ -cariofileno inhibió los complejos II y III (30 y 36%, respectivamente) y geraniol inhibió los complejos I y II (27 y 29%, respectivamente). Se prepararon 11 mezclas con estos metabolitos y se evaluaron sobre *Ae. aegypti*. Se observó un efecto sinérgico entre los compuestos acetato de geranilo y geraniol, mientras que los compuestos  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno mostraron un efecto antagónico.

---

\* Trabajo de Investigación

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D. Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Departamento de Ciencias Básicas. Codirector: Jonny Edward Duque Luna, Ph.D.

**ABSTRACT**

**TITLE:** ACTIVIDAD INSECTICIDA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS MEDICINALES CONTRA *Aedes aegypti* Y ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN BASADO EN LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA Y DAÑO EN ADN \*

**AUTHOR:** MAYRA ALEJANDRA BORRERO LANDAZÁBAL\*\*

**KEYWORDS:** ACTIVIDAD INSECTICIDA, *Aedes aegypti*, METABOLITOS SECUNDARIOS, BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL, ACETILCOLINESTERASA.

**DESCRIPTION:**

*Aedes aegypti* is the principal vector of dengue, zika and chikungunya diseases. Due to the absence of a specific treatment or an effective vaccine, the control of this illnesses focusses on the elimination of the mosquito. In addition, many colonies have developed resistance to the most common insecticides such as organophosphorus and pyrethroids. Therefore, there is a need to discover new compounds with insecticidal activity and many studies point at plants as source of new structures with insecticidal effect. In this study, we used bioinformatic tools to do a virtual screening and select seven secondary metabolites (of 33 reported in a previous study), using physical-chemical properties and the prediction of biological activity as selection criteria. Larvicidal activity on *Ae. aegypti* of these metabolites was assessed, calculating the lethal concentrations 50% (LC<sub>50</sub>): 44, 41, 48, 84, 87, 98 and 183 ppm, for geranyl acetate,  $\alpha$ -humulene,  $\beta$ -caryophyllene, geraniol, nerol, n-octanol and 1,8-cineol, respectively. The six molecules with LC<sub>50</sub><100 ppm were tested on DNA of *Ae. aegypti* showing no-degradation or fragmentation effect. Additionally, these compounds were assessed on acetylcholinesterase and complexes of mitochondrial respiratory chain. Four secondary metabolites showed striking inhibition on several targets. Geranyl acetate inhibited the acetylcholinesterase activity in 38%,  $\alpha$ -humulene inhibited complexes II, III and IV (38, 35 and 30%, respectively),  $\beta$ -caryophyllene inhibited complexes II and III (30 and 36%, respectively) and geraniol inhibited complexes I and II (27 and 29%, respectively). Those compounds were used to make 11 mixtures that were assessed on *Ae. aegypti* larvae. The larvicidal activity of geranyl acetate, geraniol,  $\alpha$ -humulene and  $\beta$ -caryophyllene was greater than nerol and n-octanol. A synergic effect was observed between geranyl acetate and geraniol. In contrast, an antagonistic effect was observed between  $\alpha$ -humulene and  $\beta$ -caryophyllene. These compounds are potential insecticide active ingredients to the vector control.

---

\* Master thesis

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D. Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Departamento de Ciencias Básicas. Co-director: Jonny Edward Duque Luna, Ph.D.

### **Introducción**

El mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) es el principal vector del virus Dengue (DENV), el cual es causante de una de las enfermedades febriles más antiguas y comunes en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. Actualmente, este artrópodo es también transmisor de los virus Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) y Mayaro (MAY). Se cree que los primeros casos reportados de dengue en América se presentaron entre 1600 y 1700, sin embargo, no fue hasta 1943 que se aisló por primera vez el virus y se dispuso de una prueba diagnóstica de laboratorio (Dick et al., 2012). Entre 1947 y 1972, se desarrolló el primer plan de erradicación del mosquito en América, usando DDT como insecticida, teniendo éxito en 21 países. A pesar de los esfuerzos por eliminar el vector, no todos los países del continente estaban dispuestos a erradicar el *Ae. aegypti*, y eventualmente se convirtieron en una fuente de reinfestación para los países en donde ya estaba erradicado (Pan American Health Organization, 1997).

Para 1997 todos los países de América estaban reinfestados lo que incrementó la dispersión del *Ae. aegypti* y por lo tanto la circulación del virus reflejada en un marcado aumento del número de casos de la enfermedad. Hasta el día de hoy el virus afecta a todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En 2016 se reportaron en las Américas 2'249.842 casos de dengue y dengue severo, de los cuales 947 fueron mortales (World Health Organization, 2016b). Sumado a esto, el mismo vector adquirió la capacidad de transmitir otros virus como el Chinkunguña, Zika y Mayaro, los cuales han causado varias alertas epidemiológicas en el continente durante la última

década, y actualmente junto con el virus del Dengue, siguen conformando uno de los principales problemas de salud pública alrededor del mundo (Cugola et al., 2016; World Health Organization, 2012; Zayed et al., 2012).

A pesar de que el dengue, por ser una enfermedad tan antigua ha sido ampliamente estudiada, aún no existe ningún tratamiento específico y la vacuna tetravalente registrada en varios países aún se encuentra en fase clínica (World Health Organization, 2016a). Por lo tanto, el control de la enfermedad se enfoca principalmente en el control del vector (Benelli, 2015). Los compuestos sintéticos como los piretroides, carbamatos y organofosforados, son los más ampliamente estudiados y usados como insecticidas contra *Ae. aegypti*. Sin embargo, varios estudios realizados en la década de 1950 demostraron que los mosquitos desarrollaron cierta resistencia contra estos compuestos. Debido a esto, surge la necesidad de encontrar nuevos compuestos con actividad insecticida que reemplacen a los tradicionales.

Por otra parte, muchos compuestos de origen natural como los metabolitos secundarios de plantas han sido usados contra artrópodos; un ejemplo de estos son la azaridactina, piretrina y la nicotina, cuyas estructuras fueron tomadas como base para el diseño de varios insecticidas que conocemos actualmente (Colovic, Krstic, Lazarevic-Pasti, Bondzic, & Vasic, 2013; Isman, 2006; Pathak & Tiwari, 2012). Es por esto, que la comunidad científica ha dirigido su atención hacia las plantas en búsqueda de nuevos insecticidas. Diferentes extractos, aceites esenciales y metabolitos secundarios de plantas, han mostrado tener efecto larvicida sobre *Ae. aegypti* (Bosire, Deyou, Kabar, Kimata, & Yenesew, 2014; Tennyson, Ravindran, & Arivoli, 2012). Además, se cree que mezclas de ciertos metabolitos secundarios (como son los aceites esenciales) pueden presentar no sólo una actividad incrementada con respecto a los compuestos individuales, sino que también

presentan mayor dificultad para generar resistencia en el vector, esto debido a los diferentes *targets* que afecta dicha mezcla (Zoubiri & Baaliouamer, 2011).

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estudiar el mecanismo de acción de una mezcla de metabolitos secundarios de plantas medicinales con actividad insecticida sobre *Ae. aegypti*. Lo anterior con el propósito de encontrar una nueva alternativa insecticida para el control de este vector. Para lograr este objetivo se usaron herramientas bioinformáticas para predecir ciertas propiedades fisicoquímicas y posibles actividades biológicas de acuerdo con la estructura química de 33 metabolitos reportados por Vera y colaboradores en 2014 (Vera et al., 2014). Posteriormente, se desarrolló un análisis estadístico de componentes principales para determinar el criterio de cribado de los metabolitos. Considerando este análisis, se seleccionaron siete moléculas que fueron evaluadas según su actividad larvicida, actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa, actividad sobre el metabolismo energético mitocondrial y daño sobre ADN de larvas de *Ae. aegypti*.

Finalmente, teniendo en cuenta los diferentes *targets* que presentaron los metabolitos, se seleccionaron cuatro moléculas las cuales fueron empleadas para diseñar 11 mezclas que fueron evaluadas según su actividad larvicida sobre *Ae. egypti*. De esta manera, se determinó la mezcla que presentó el mayor efecto insecticida sobre el vector.

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

En este capítulo se presenta el marco teórico y la revisión de antecedentes de los temas más relevantes considerados durante el desarrollo de esta investigación. Inicialmente, se hace la descripción del mosquito *Ae. aegypti* como el principal vector de los virus Dengue, Zika y Chikunguña, y se discuten los diferentes métodos de control que se emplean actualmente. Luego nos enfocaremos en el control químico, en donde se discuten temas como la resistencia y la búsqueda de nuevos compuestos con acción insecticida, además se profundizar en el uso de los metabolitos secundarios de plantas como una alternativa a los compuestos sintéticos ya conocidos. Finalmente, se discute acerca de los diferentes mecanismos de acción de los insecticidas haciendo énfasis en los tres mecanismos de acción estudiados en esta investigación: Efecto sobre la acetilcolinesterasa, bioenergética mitocondrial y degradación del ADN.

### **1.1 *Aedes aegypti* como vector de enfermedades**

Se cree que la llegada de *Ae. aegypti* en América se remonta al comercio de esclavos en el siglo 16 y 17 donde los barcos introdujeron poblaciones de estos mosquitos al caribe. Actualmente, *Ae. aegypti* se encuentra presente en la mayoría de países tropicales y subtropicales alrededor del mundo y es el principal vector de arbovirus en humanos (Chadee, Ward, & Novak, 1998).

Los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos), constituyen actualmente una de las mayores amenazas a la salud pública en el mundo. El Dengue, Chikunguña y Zika son

arbovirus transmitidos por *Ae. aegypti* (Aspilcueta-gho, Villafane, Calderón Sánchez, & Calderón Yberico, 2017; Lo Presti, Lai, Cella, Zehender, & Ciccozzi, 2014; Zoubiri & Baaliouamer, 2011). El dengue y el chikunguña se clasifican entre los arbovirus con mayor propagación (Justin, Georg, Esen, Gottfried, & Peter, 2016; Weaver & Lecuit, 2015). Por otra parte, en abril de 2016, la organización panamericana de salud confirmó la presencia del virus Zika en 35 países desde que se declaró la alerta por el alto potencial de propagación en 2015 en Brasil (Panamerican Health Organization, 2017).

Debido a su antigüedad (Dick et al., 2012), el dengue ha sido foco de interés para la comunidad científica en general, sin embargo, no existe un tratamiento antiviral específico para tratar la enfermedad. Actualmente, hay una vacuna tetravalente registrada en varios países como Dengvaxia®, que se encuentra en la tercera fase clínica y su eficacia es del 65.5% para cualquier serotipo en la población mayor de nueve años de edad. De esta forma, el manejo clínico se basa principalmente en la terapia de apoyo y el control de la enfermedad se enfoca en el vector (World Health Organization, 2012).

A diferencia del dengue, enfermedades como el zika y chikunguña no llevan más de una década en estudio debido a que su expansión ha sido relativamente reciente (Mattar et al., 2015; Rodríguez-Morales, 2015). sin embargo, son numerosos los estudios realizados en torno a la búsqueda de un tratamiento o vacuna contra los virus ZIKV y CHIKV. Por ejemplo, en 2016, Larocca, R. y colaboradores, desarrollaron una vacuna de ADN contra el zika que mostró ser exitosa en ratones (Larocca et al., 2016). En 2014, un candidato a vacuna contra la chikunguña fue probado en primates con buenas expectativas para usarse en humanos (Roy et al., 2014). A pesar de estos importantes avances, aún no existe un tratamiento específico ni una vacuna aprobada que

pueda emplearse como control de estas afecciones (Mattar et al., 2015; Panamerican Health Organization, 2017).

## **1.2 Control epidemiológico y resistencia**

Las medidas de control sobre el vector son imprescindibles para lograr reducir la incidencia de dengue, zika y chikunguña. Las intervenciones preventivas y de control del vector ayudan a reducir la transmisión y previene la aparición de brotes de estas enfermedades. Debido a esto, en los países más afectados se promueven frecuentemente campañas para la eliminación de criaderos potenciales (Kittayapong & McCall, 2006; World Health Organization, 2012).

De este modo, el método de control más común consiste precisamente en educar a la población sobre cómo eliminar estos criaderos. Ya que, el mosquito costumbra depositar sus huevos en lugares comunes de las zonas urbanas como tanques de agua, llantas, materas o cualquier lugar donde se acumule agua (World Health Organization, 2009). Sin embargo, este método es insuficiente para controlar la población del vector. Por lo tanto, adicionalmente se usan diferentes insecticidas como son los compuestos organofosforados, piretroides y carbamatos, los cuales han sido empleados por más de 50 años en los países donde las enfermedades transmitidas por mosquitos son consideradas endémicas (Casida, 1980; Fukuto, 1990).

A pesar de los programas de las entidades gubernamentales por promover la fumigación y la prevención, recientemente se han presentado brotes de chikunguña y zika en América (Cugola et al., 2016; Mattar et al., 2015; Zanluca et al., 2015). Además, se identificaron casos de estas enfermedades en al menos 17 países del continente como Puerto Rico, Perú, Haití,

República Dominicana, México, Bolivia, Ecuador, Uruguay, entre otros (Fauci & Morens, 2016; Weaver & Lecuit, 2015).

Varios estudios han mostrado que poblaciones del vector han adquirido resistencia a los insecticidas comerciales más usados (piretroides, organofosforados entre otros) (Cavalcanti, Da Silva, Da Silva, Leal, & Barbosa, 2014; Grisales et al., 2013; World Health Organization, 1992). Tan sólo en Colombia, un estudio realizado en 2011 revela el estado de resistencia a insecticidas del *Ae. aegypti* en 10 localidades del país. La investigación muestra que todas las regiones evaluadas presentaron 100% de resistencia a los insecticidas DDT, bendiocarb y Temefos (Ocampo, Salazar-Terreros, Mina, McAllister, & Brogdon, 2011). Otro estudio realizado en 2014 en Cuba, reveló los diferentes mecanismos relacionados con la resistencia a temefos, propoxur y deltametrina sobre larvas y adultos de *Ae. aegypti* (Bisset et al., 2014). En el desarrollo de la resistencia están implicados mecanismos como el incremento de la detoxificación metabólica y la disminución de la sensibilidad de las proteínas diana (Avenot & Michailides, 2010; Faucon et al., 2015). Estos mecanismos son producto de diversas mutaciones en el genoma del mosquito como resultado de la exposición prolongada a dosis sub-letales de los insecticidas (Desneux, Decourtye, & Delpuech, 2007; N. Liu, 2015).

Debido a esto, muchas investigaciones han sugerido la búsqueda de nuevos compuestos insecticidas con diferentes mecanismos de acción o con diferentes dianas (Park, Lee, Shin, Park, & Ahn, 2002). Actualmente hay un gran número de trabajos enfocados en el descubrimiento de nuevos insecticidas que van desde la síntesis de nuevas moléculas, hasta la evaluación de compuestos presentes en la naturaleza como lo son los metabolitos secundarios de plantas (Akamatsu, 2011; Bilal, Sahar, & Din, 2017; Carreño, Vargas, Duque, & Kouznetsov, 2014; Dias et al., 2015; Isman, 2006; Lindsay et al., 2017; Sumathi & Gaspar, 2016; Tennyson et al., 2012).

### 1.3 Insecticidas botánicos

Las plantas producen una gran variedad de compuestos que no están relacionados con el crecimiento, el desarrollo o la reproducción de las mismas, denominados metabolitos secundarios. Estas son moléculas orgánicas producidas por el metabolismo secundario de la planta y están relacionadas con la defensa contra herbívoros y patógenos (Bennett & Wallsgrove, 1994). Por esta razón, muchos científicos vieron las plantas como un recurso valioso que podía ser aprovechado para el descubrimiento de compuestos insecticidas o de estructuras que podrían servir como compuestos líderes en el desarrollo de nuevos insecticidas (Zoubiri & Baaliouamer, 2011).

De esta forma, a finales del siglo XIX se aislaron diferentes compuestos insecticidas a partir de plantas que eran comúnmente usadas contra las plagas, como el tabaco, el piretro, y las raíces de algunas plantas leguminosas *Derris elliptica* (Fabaceae) y algunas especies del género *Lonchocarpus*, entre otras (Roark, 1947). De estas plantas se lograron aislar la nicotina, las piretrinas y la rotenona respectivamente, que más adelante, en la década de los 40 se convirtieron en compuestos líderes que inspiraron la síntesis de estructuras similares con el fin de aumentar su actividad insecticida (Haller, Laforge, & Sullivan, 1942; Seiferle & Frear, 1948). Entre estos compuestos los más conocidos son los denominados piretroides, los cuales se derivan de las piretrinas (Casida, 1980; Elliott & Janes, 1978). La permetrina y la deltametrina son dos de los piretroides más usados actualmente como insecticidas y acaricidas (N. Liu, 2015; X. H. Liu et al., 2017).

Por varias décadas los estudios en el área fueron dirigidos a la síntesis de nuevas estructuras basadas en los compuestos líderes ya conocidos y se desarrollaron además otros compuestos como

los organofosforados y los carbamatos (Fukuto, 1990; Georghiou, Wirth, Tran, Saume, & Knudsen, 1987; Schoff, 1967). Sin embargo, como consecuencia del efecto de resistencia en algunas poblaciones de insectos (Davidson & Zahar, 1973; World Health Organization, 1992), a finales de la década de los 90 se observó un nuevo auge del estudio de las plantas como fuente de insecticidas y hoy en día el número de estudios en el tema sigue en aumento (Coats, 1994; Rattan, 2010; Rice & Coats, 1994). Este enfoque es basado en la hipótesis de que nuevas estructuras producidas por las plantas deben presentar nuevos mecanismos de acción (Arnason et al., 1989). Actualmente, las investigaciones en el área abarcan estudios de extractos, aceites esenciales, metabolitos secundarios separados y purificados, y derivados estructurales de estos metabolitos (Coria et al., 2008; Freitas et al., 2010; Houghton & Howes, 2006; Rattan, 2010; Soni & Prakash, 2012).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente y en la búsqueda de nuevos compuestos de origen botánico con actividad insecticida se consideró como punto de partida de este trabajo un estudio realizado por Vera y colaboradores publicado en el 2014 (Vera et al., 2014). En este artículo se reportó la actividad larvicida contra *Ae. aegypti* de los aceites esenciales de nueve plantas medicinales: *Tagetes lucida* (Asteraceae), *Lippia alba*, *Lippia origanoides* (Verbenaceae), *Eucalyptus citriodora* (Myrtaceae), *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus* (Poaceae), *Citrus sinensis*, *Swinglea glutinosa* (Rutaceae), y *Cananga odorata* (Annonaceae). Además, se reporta la composición química de cada aceite esencial y la proporción de los metabolitos secundarios en los mismos (Anexo 1). Los resultados mostraron que los aceites esenciales con mayor actividad fueron: *C. flexuosus* (CL<sub>50</sub>=17.1 mg/L) cuyos componentes mayoritarios son geranial, neral y acetato de geranilo, y *C. sinensis* (CL<sub>50</sub>=20.6 mg/L) donde el limoneno y linalool son los metabolitos con mayor proporción (Vera et al., 2014).

Algunos de estos metabolitos secundarios, han sido evaluados según su actividad insecticida en varias especies. El acetato de geranilo que es uno de los metabolitos principales del *C. flexuosus*, fue evaluado por Tsao y colaboradores, en 1995, sobre adultos y huevos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) (Tsao, Lee, Rice, Jensen, & Coats, 1995). Se encontró que inhibía la eclosión en la concentración de 833 µg/ml y en adultos se reportó la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de 55 µg/insecto. En contraste, en 2006, Samarasekera, R. y colaboradores reportan una actividad insecticida sobre esta misma especie con una dosis notablemente menor (DL<sub>50</sub>=1,45 µg/insecto) (Samarasekera & Radhika, 2006). otra parte, la actividad insecticida de este metabolito sobre *Ae. aegypti* aún no ha sido reportada.

β-cariofileno, es otro de los metabolitos presentes en *C. flexuosus* y además se encuentra en *C. odorata*, *L. alba*, *L. origanoides* y *S. glutinosa*. Este metabolito está presente en muchos más aceites esenciales con actividad insecticida reportada como los aceites extraídos de *Eugenia caryophyllata* (Myrtaceae) (24.9%), *Lippia sidoides* (Verbenaceae) (0.19-8.81%), *Melissa officinalis* (10.2%), *Mentha spicata* (3.08%), *Ocimum selloi* (2.1%), *Origanum onites* (Lamiaceae) (2.54%), *Phytolacca dioica* (Phytolaccaceae) (2.47%), *Piper marginatum* (Piperaceae) (6.8–13.1%), *Hyptis martiusii* (Lamiaceae) (6.5%) y *Artemisia lavandulaefolia* (Compositae) (15.5%), entre otros (Zoubiri & Baaliouamer, 2011). El aceite esencial de hojas de *H. martiusii* fue evaluado por Araújo y colaboradores en 2003 (Araujo et al., 2003), sobre larvas de *Ae. aegypti*, reportando una mortalidad del 100% después de un día de tratamiento a 250 mg/L. La actividad insecticida de *A. lavandulaefolia* sobre adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) fue evaluada por Liu Z. y colaboradores en 2010, donde se reporta un CL<sub>50</sub> de 11.5 mg/L de aire.<sup>61</sup> Sin embargo, aún no se reportan estudios de actividad insecticida del metabolito aislado sobre *Ae. aegypti*.

Un estudio realizado en 2015 por Dias y colaboradores (Dias et al., 2015), reporta la actividad larvicida sobre *Ae. aegypti* de aceites esenciales de cuatro plantas amazónicas *Eugenia piauiensis*, *Myrcia erythroxylon*, *Psidium myrsinites* (Myrtaceae) y *Siparuna camporum* (Siparunaceae Schodde). Los aceites mostraron actividad larvicida, con  $CL_{50}$  de 230 a 292mg/L después de 24h, a excepción de *M. erythroxylon* el cual no generó mortalidad en las larvas. Los componentes principales de *P. myrsinites* son  $\beta$ -cariofileno y  $\alpha$ -humuleno. Este último también está presente en varios aceites esenciales con actividad insecticida, como es el caso de los aceites esenciales de *L. origanoides* y *E. citriodora* (Anexo 1)(Vera et al., 2014), y en el aceite de *Piper capense* (Piperaceae) aunque en una baja concentración (0.85%), el cual presenta actividad larvicida contra *An. gambiae* ( $CL_{50}=34.9$  mg/L) (Matasyoh, Wathuta, Kariuki, & Chepkorir, 2011). También se encuentra presente los aceites esenciales de *E. caryophyllata* (2.8%) y *Ocimum canum* (Lamiaceae) (3.5%), los cuales presentan actividad acaricida sobre *Psoroptes cuniculi* (Sarcoptiformes: psoroptidae)(mortalidad del 77.8% a una dosis del 10%) y actividad larvicida sobre *Aedes gambiae* ( $CL_{50}=201\pm 0.9$  mg/L) respectivamente (Zoubiri & Baaliouamer, 2011).

Por otro lado, el geraniol es quizás el metabolito más ampliamente conocido en el comercio debido a su gran importancia en la industria de las fragancias. Generalmente el denominado “geraniol” es en realidad una mezcla de dos isómeros: nerol (*cis*) y geraniol (*trans*). Además, es conocido por sus propiedades insecticidas y repelentes.(Chen & Viljoen, 2010) Este se encuentra principalmente en aceites esenciales de *Monarda fistulosa* (Lamiaceae) (>95%) (Simon & Beliveau, 1986), ninde (66.0%) (Baser, Kürkçüoğlu, & Demirci, 2005), rosa (44.4%) (Baydar, Baydar, & Tucker, 2005), palmarosa (53.5%) (Dubey & Luthra, 2001), y citronela (24.8%) (Rajeswara Rao, Bhattacharya, Mallavarapu, & Ramesh, 2004). Su actividad repelente ha sido estudiada sobre ninfas de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: reduvidea), por Sfara y colaboradores en

el 2009, en donde se reporta que el metabolito presentó efecto repelente desde  $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Sfara, Zerba, & Alzogaray, 2009). Este metabolito también se encuentra en el aceite esencial de *Cymbopogon nardus* (Poaceae) en una proporción del 24.8% y se reportó su actividad insecticida sobre *M. domestica* con una dosis  $\text{DL}_{50}$  de  $3.10 \mu\text{g}/\text{insecto}$  (Samarasekera & Radhika, 2006). Un estudio realizado por Abdelgaleil y colaboradores en 2009, reporta el efecto insecticida (por contacto directo) del geraniol sobre *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) (gorgojo del trigo) con un  $\text{CL}_{50}=28.76 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , sin embargo este no presentó toxicidad en el ensayo de actividad fumigante (Abdelgaleil, Mohamed, Badawy, El-arami, & A., 2009).

El nerol, también está presente en diferentes aceites esenciales con actividad insecticida como, por ejemplo, en el aceite esencial de fruta fresca de *Zanthoxylum schinifolium* (Rutaceae), en donde se encuentra en una proporción del 4.56%. La actividad insecticida de este aceite contra *S. zeamais* fue reportada por Wang y colaboradores (2011), con una dosis  $\text{DL}_{50}$  de  $15.93 \mu\text{g}/\text{adulto}$  (Wang et al., 2011). Además, se reporta que la toxicidad es más alta en el aceite esencial de la fruta fresca (donde se encontró el nerol), que en el extraído de las hojas. También está presente en el aceite esencial de *Helichrysum italicum* (Asteraceae) (5.2%), el cual según Conti y colaboradores (2010) (Conti, Canale, Bertoli, Gozzini, & Pistelli, 2010), resultó tóxico para larvas de *Aedes albopictus* con un  $\text{CL}_{50}$  de  $178.1 \text{ mg}/\text{L}$ .

Varios estudios demuestran que el 1,8-cineol presenta efecto insecticida sobre diferentes especies de insectos de granos almacenados. Por ejemplo, Obeng-Ofori y colaboradores (1997) (Obeng-Ofori, Reichmuth, Bekele, & Hassanali, 1997), probaron el efecto repelente y tóxico de este metabolito sobre *Sitophilus granarius*, *S. zeamais* (Coleoptera: curculionidae), *Triholium castaneum* (Coleoptera: tenebrionidae) y *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: bostrichidae), (insectos conocidos como plagas de granos). En este estudio, el 1,8-cineol mostró ser altamente

tóxico en el tratamiento tópico, contacto por impregnación de papel y en granos de trigo y maíz tratados. Se observó una mortalidad del 100% a una dosis de 10 µg/insecto en todas las formas de aplicación. Además, se reportó mayor toxicidad por ingestión del grano tratado que por contacto en papel filtro a una dosis de 0.5 µg/insecto. En otro estudio realizado por Lee y colaboradores (2004),(Lee, Annis, Tumaalii, & Choi, 2004) se reporta el efecto insecticida contra *S. oryzae* de los aceites esenciales de las plantas *Eucalyptus nicholii*, *Eucalyptus codonocarpa*, *Eucalyptus blakelyi*, *Callistemon sieberi*, *Melaleuca fulgens* y *Melaleuca armillaris* (Myrtaceae). Los resultados muestran que los aceites esenciales con mayor concentración de 1,8-cineol presentaron mayor efecto insecticida.

El n-octanol es un compuesto que está presente en muchos aceites esenciales, sin embargo, siempre se encuentra en muy bajas proporciones. Debido a esto, la actividad insecticida de los aceites esenciales en donde este metabolito está presente no es atribuida a este compuesto (Kumar, Mishra, Malik, & Satya, 2012; Roy et al., 2014). Sin embargo, este podría jugar un papel importante en el sinergismo de la mezcla de metabolitos, aunque aún no hay estudios sobre esto.

A pesar de que se ha evaluado la actividad insecticida de muchos aceites esenciales, son pocos los estudios en donde se evalúan los metabolitos secundarios de forma individual. Además, la mayoría de estudios atribuyen la actividad del aceite al componente mayoritario, sin embargo, son pocos los estudios de sinergismo de los diferentes componentes. De este modo, es necesario profundizar en la búsqueda de compuestos de origen natural con actividad insecticida como alternativa a los compuestos comerciales ya existentes.

#### **1.4 Mecanismos de acción**

El mecanismo de acción juega un papel importante en la búsqueda de nuevos insecticidas, ya que este está estrechamente ligado a la facilidad con la que los insectos generan resistencia hacia un compuesto específico. De este modo, varios autores aseguran que es más probable que los vectores generen resistencia a compuestos cuyo mecanismo de acción envuelve una sola diana que a compuestos que afectan a más de una. En ese sentido, las mezclas de compuestos con diferentes mecanismos de acción, como son los aceites esenciales, podrían evitar la resistencia y potencializar su actividad. Sin embargo, es necesario estudiar cada compuesto por separado para elucidar cada uno de los mecanismos de acción y posteriormente evaluar el efecto sinérgico de sus mezclas.

Los mecanismos de acción de los insecticidas actuales han sido ampliamente estudiados, sin embargo, existen algunos cuyo mecanismo de acción es aún desconocido. Según el Comité de Acción de Resistencia de los Insecticidas IRAC (por sus siglas en inglés Insecticides Resistance Action Committee), los mecanismos de acción de los diferentes insecticidas comerciales se pueden clasificar según los tipos de dianas que afectan en insecticidas que actúan sobre: nervios y músculos, el crecimiento y desarrollo, la respiración mitocondrial, el intestino medio y sobre dianas desconocidas (Tabla 1). Esta clasificación está constantemente en actualización, y funciona como guía para el manejo de la resistencia.

Tabla 1. *Clasificación de los insecticidas según su mecanismo de acción (Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), 2016).*

<b>Tipo de diana</b>	<b>Grupo de insecticidas</b>
<b>Nervios y músculos:</b>	Inhibidores de la acetilcolinesterasa.  Antagonistas de los canales de cloro GABA.

<p>Los insecticidas más frecuentes actúan en objetivos nerviosos y musculares. Los insecticidas que actúan sobre estos objetivos son generalmente de acción rápida.</p>	<p>Moduladores de canales de sodio. Moduladores competitivos de receptores nicotínicos acetilcolina. Moduladores alostéricos de receptores nicotínicos acetilcolina. Moduladores alostéricos de canales de cloro asociado a glutamato. Moduladores de canales TRPV del órgano crototonal. Bloqueadores de canales de los receptores nicotínicos acetilcolinesterasa. Agonistas de receptor octopaminérgico. Bloqueadores de canales de sodio dependientes de voltaje. Moduladores de receptor de rianodina. Moduladores de órgano crototonal con sitio de unión no específico.</p>
<p><b>Crecimiento y desarrollo:</b> El desarrollo de los insectos está controlado por el equilibrio de dos hormonas principales: la hormona juvenil y la ecdisona. Los reguladores del crecimiento de insectos actúan imitando una de estas hormonas, o</p>	<p>Inhibidores de la biosíntesis de la quitina, Tipo 0. Inhibidores de la biosíntesis, Tipo 1. Mimetizadores de la hormona juvenil. Inhibidores de crecimiento. Disruptores moduladores. Agonistas receptores de ecisona. Inhibidores de la acetilcarboxilasa.</p>

<p>perturban directamente la formación, deposición o la biosíntesis de la cutícula. Los insecticidas que actúan sobre objetivos individuales en este sistema son generalmente lentos.</p>	
<p><b>Respiración mitocondrial</b></p> <p>Varios insecticidas son conocidos por interferir con la respiración mitocondrial mediante la inhibición del transporte de electrones o la fosforilación oxidativa. Los insecticidas que actúan sobre objetivos individuales en este sistema son generalmente rápidos para actuar.</p>	<p>Inhibidores de la ATP sintasa.</p> <p>Desacopladores de la fosforilación oxidativa vía disrupción del gradiente de protones.</p> <p>Inhibidores del complejo III del transporte de electrones mitocondrial.</p> <p>Inhibidores del complejo I del transporte de electrones mitocondrial.</p> <p>Inhibidores del complejo IV del transporte de electrones mitocondrial.</p> <p>Inhibidores del complejo II del transporte de electrones mitocondrial.</p>
<p><b>Intestino medio:</b></p> <p>Toxinas microbianas que afectan alepidópteros específicos.</p>	<p>Disruptores microbianos de las membranas del intestino medio de insectos.</p>
<p><b>Dianas desconocidas o no específicas:</b></p> <p>Varios insecticidas afectan dianas, sitios o funciones menos bien descritas,</p>	<p>Inhibidores variados no específicos (multi-sitio).</p>

---

o actúan de forma no específica en múltiples objetivos.	
---	--

---

En esta investigación se evaluaron metabolitos secundarios de plantas medicinales sobre los siguientes mecanismos de acción: el efecto de sobre la acetilcolinesterasa, la bioenergética mitocondrial y la capacidad de fragmentación del ADN. A continuación, se explica la función e importancia de cada uno de ellos:

**1.4.1 Acetilcolinesterasa.** La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima presente en insectos y mamíferos que juega un rol importante en la sinapsis entre células nerviosas y musculares. Esta enzima es la encargada de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina en acetato y colina (Figura 1). Esta reacción detiene la señal efectivamente, permitiendo que las partes puedan ser recicladas y reconstruidas formando nuevamente moléculas de acetilcolina que pueden ser usados en la siguiente señal. La inhibición de la AChE causa acumulación de la acetilcolina, lo que conlleva a la hiperestimulación de los receptores nicotínicos y muscarínicos, interrumpiendo la neurotransmisión y generando ataxia, es decir, pérdida total de la coordinación en el sistema neuromuscular y eventual muerte (Figura 2) (Fukuto, 1990; López & Pascual-Villalobos, 2010).

Esta enzima tiene una actividad catalítica de alta especificidad, cada molécula de AChE degrada alrededor de 25000 moléculas de acetilcolina por segundo. La enzima tiene una forma elipsoidal con dimensiones de 45 Å x 60 Å x 65 Å. El monómero de la enzima es una proteína  $\alpha/\beta$  que contiene 12 hojas  $\beta$  rodeadas por 14  $\alpha$  hélices. Lo más llamativo de su estructura es una profunda

y angosta garganta que lleva al sitio activo. Esta garganta tiene aproximadamente 20 Å de longitud y está rodeada por los anillos de 14 residuos aromáticos (Dvir, Silman, Harel, Rosenberry, & Sussman, 2010). El sitio activo de la enzima está localizado a 4 Å del fondo de la garganta y contiene dos sub-sitios: el aniónico y el estérico que corresponden al sitio de unión de la colina y a la maquinaria catalítica respectivamente. El sitio aniónico, no cargado y lipofílico, enlaza la amina cuaternaria positiva de la colina, mientras que el sub-sitio estérico, donde sucede la hidrólisis, contiene una triada catalítica de aminoácidos: serina 200, histidina 440 y glutamato 327 (Colovic et al., 2013) (Figura 3). La hidrólisis que se lleva a cabo en esta triada induce la formación de la enzima acetilada y la colina libre. Luego la enzima acetilada se somete a un ataque nucleofílico por una molécula de agua, y es asistida por la histidina 440, liberando el ácido acético y regenerando la enzima (Figura 4).

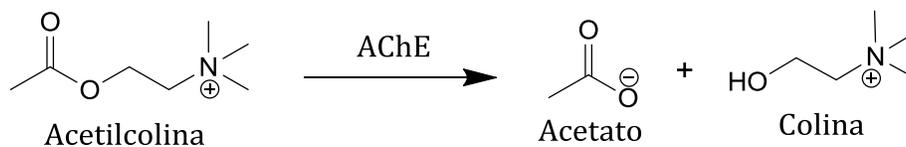


Figura 1. Hidrólisis de la acetilcolina

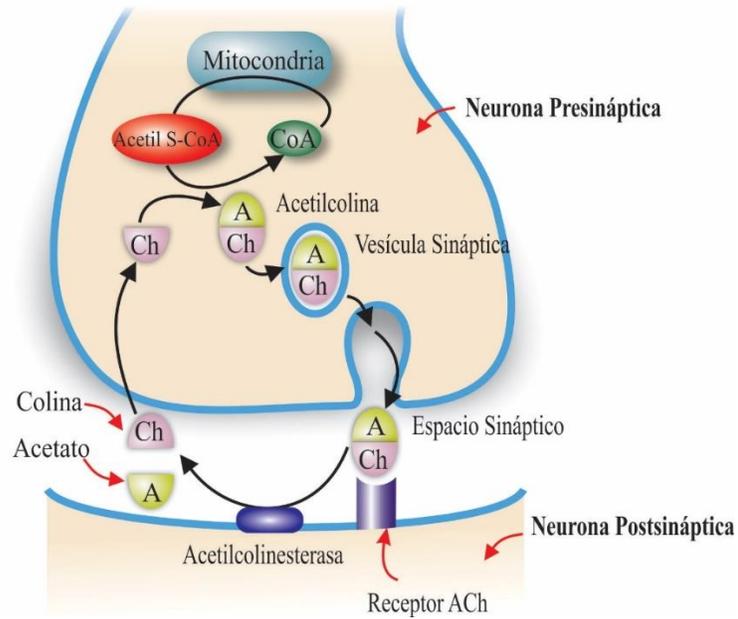


Figura 2. Mecanismo de acción de AChE en la neurotransmisión.

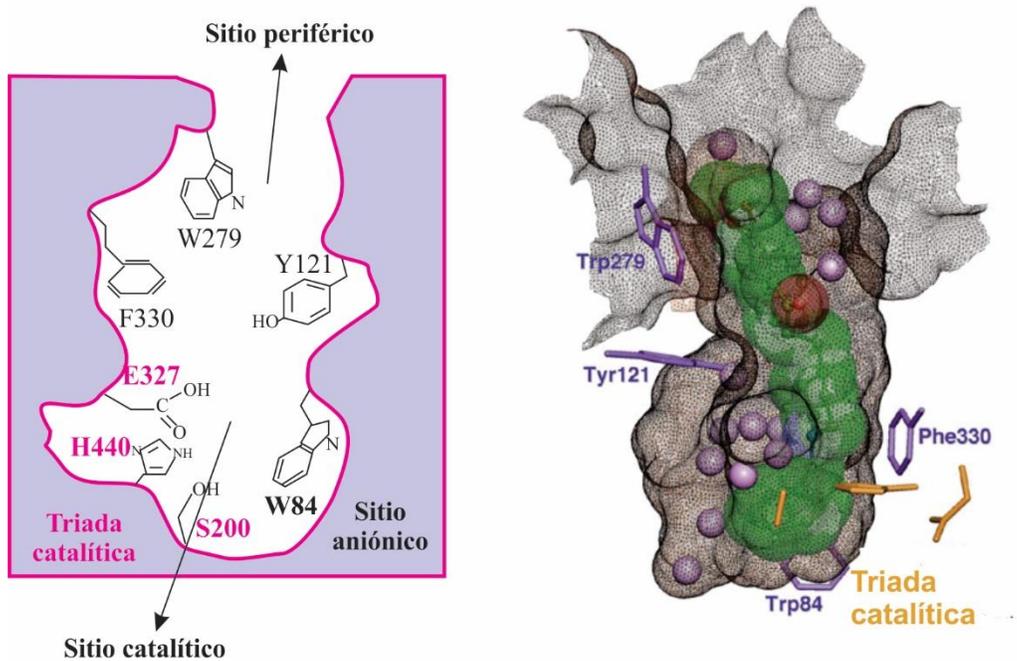


Figura 3. Garganta de AChE y triada catalítica Imagen adaptada de (Silman & Sussman, 2008).

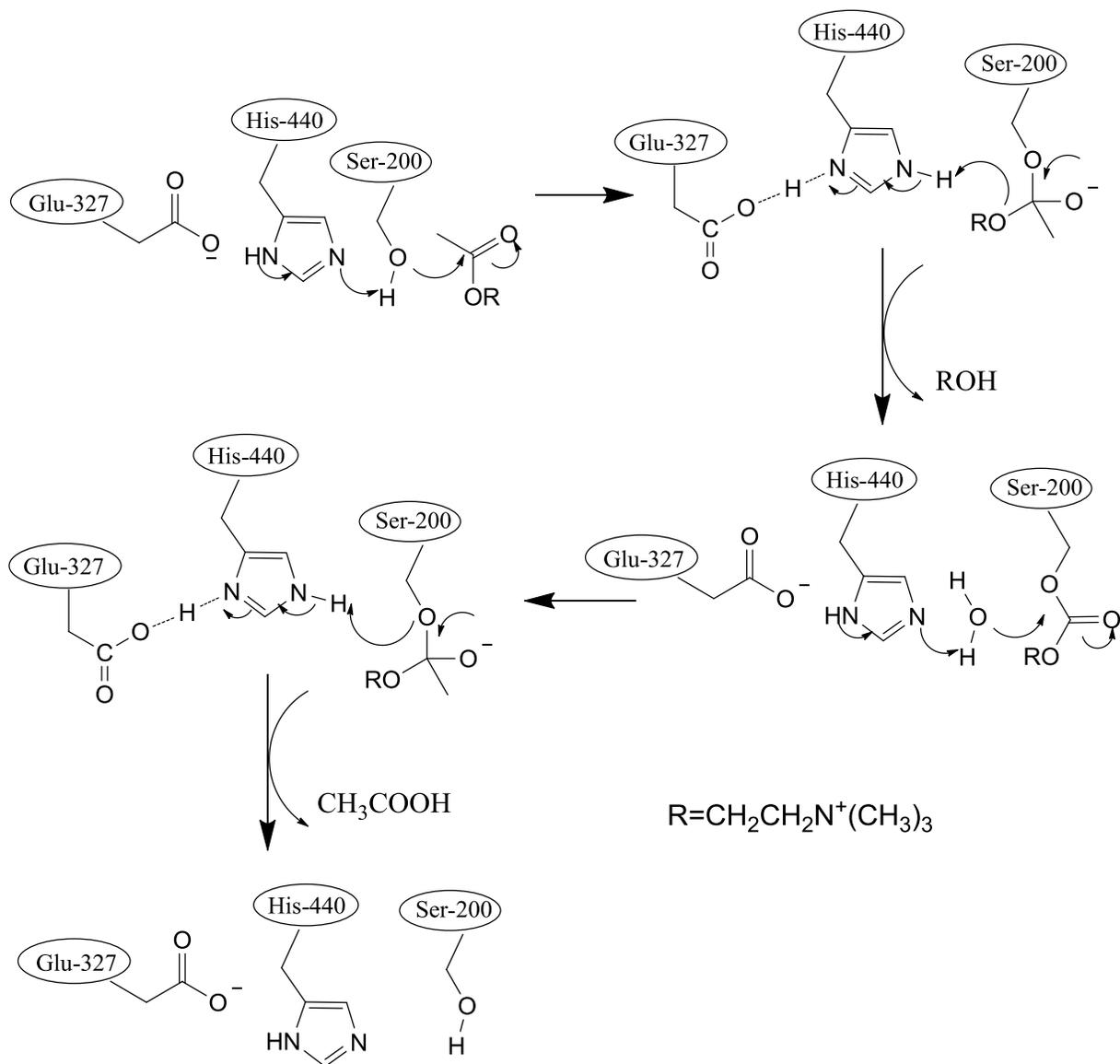
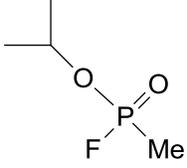
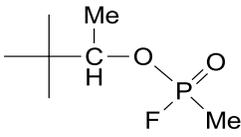
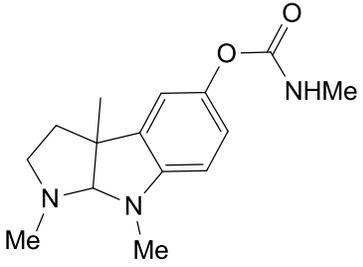
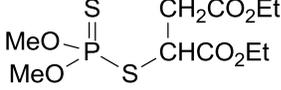
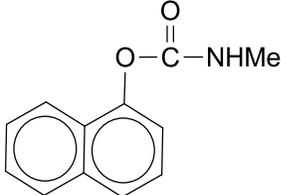


Figura 4. Mecanismo de hidrólisis de la acetilcolina catalizada por AChE. Imagen adaptada de (Colovic et al., 2013).

Además de estos dos sub-sitios, la enzima tiene uno o más sitios aniónicos periféricos diferentes al sitio de enlace de la colina del sitio activo. Estos pueden enlazar otros ligandos cuaternarios,

que actúan como inhibidores no competitivos que se enlazan en un sitio completamente diferente al que ocupan los inhibidores competitivos.

Tabla 2. Algunos inhibidores de AChE.

Estructura	Nombre	Comentarios
	<p>Isopropil metilfosfonofluoridato (sarín)</p>	<p>Arma química, muy tóxico, agente nervioso.</p>
	<p>Pinacolil metilfosfonofluoridato (soman)</p>	<p>Arma química, muy tóxico, agente nervioso.</p>
	<p>Fisostigmina</p>	<p>Sal de salicilato usada en el tratamiento del glaucoma.</p>
	<p>Malatión</p>	<p>Insecticida usado contra mosquitos, moscas y piojos.</p>
	<p>Carbaril</p>	<p>Componente principal del plaguicida comercializado como Sevin®.</p>

Como se mencionó anteriormente, la inhibición de esta enzima genera la acumulación de la acetilcolina en el espacio postsináptico causando hiperestimulación. Existen dos tipos de

inhibidores: reversibles e irreversibles. Los inhibidores reversibles, generalmente tienen aplicaciones médicas (tratamientos para Alzheimer), mientras que los irreversibles son asociados a efectos tóxicos (insecticidas) (Tabla 2).

A continuación, se describen dos de los insecticidas más conocidos como inhibidores de la acetilcolinesterasa, los compuestos organofosforados y carbamatos.

**1.4.1.1 Insecticidas organofosforados.** La mayoría de estos compuestos son comúnmente usados como insecticidas para controlar una gran variedad de insectos en agricultura y el hogar (Figura 5). La inhibición de AChE por estos compuestos se lleva a cabo en la parte hidroxil serina del sitio activo de la enzima de una forma análoga a la acetilación de la AChE (Fukuto, 1990). A diferencia de la enzima acetilada la cual genera la colina libre y la enzima regenerada, la enzima fosforilada es altamente estable y en algunos casos queda inhibida irreversiblemente. El grupo hidroxil de la serina es bloqueado por la parte fosforil y queda impedida para participar en la hidrólisis de la acetilcolina (Guizzetti, Pathak, Giordano, & Costa, 2005).

**1.4.1.2 Carbamatos:** Los carbamatos son compuestos orgánicos que se derivan del ácido carbámico (Figura 6). Debido a que su inhibición sobre la AChE es reversible, estos compuestos han sido usados como terapia para el glaucoma además de ser usados como insecticidas. Su mecanismo de acción es muy similar al de los compuestos organofosforados, los cuales forman un complejo con la enzima que genera su inhibición. Sin embargo, en este caso la enzima inhibida se regenera espontáneamente formando metilamina y dióxido de carbono (Colovic et al., 2013; Fukuto, 1990).

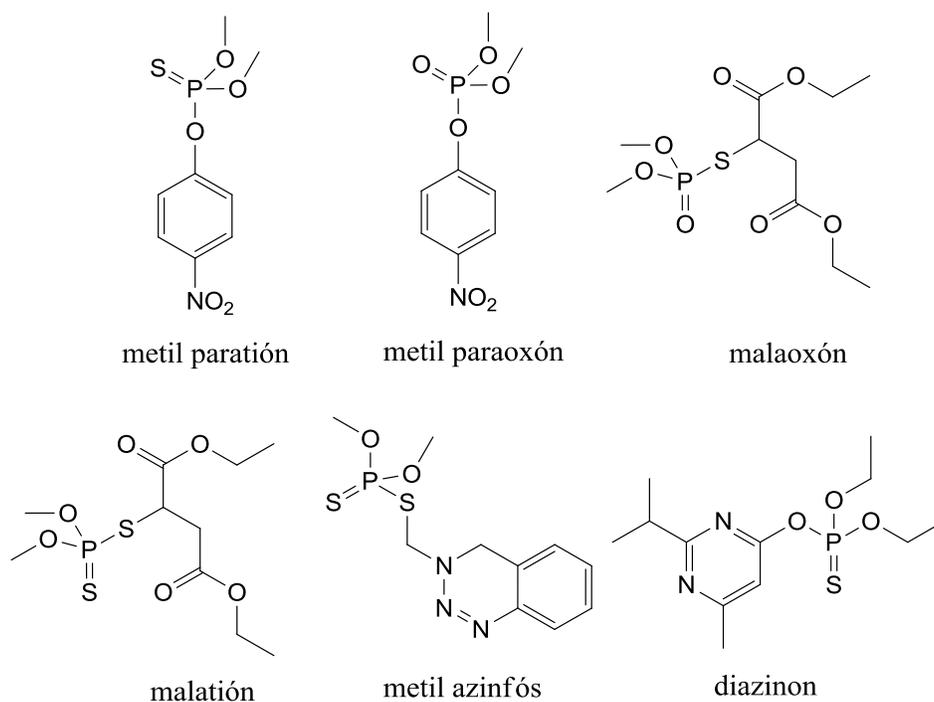
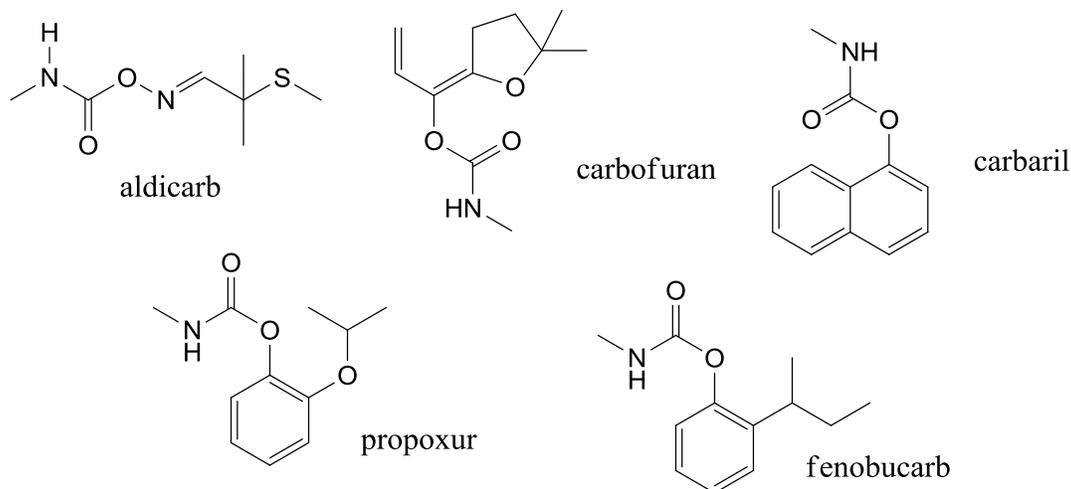


Figura 5. Insecticidas organofosforados. Imagen adaptada de (Houghton & Howes, 2006).



**Figura 6.** Carbamatos insecticidas. Imagen adaptada de (Fukuto, 1990).

**1.4.2 Bioenergética mitocondrial.** Se denomina bioenergética mitocondrial al mecanismo que se lleva a cabo dentro de la mitocondria, el cual envuelve las diferentes reacciones que conllevan a la síntesis de ATP partiendo de los sustratos generados en las diferentes vías metabólicas. La mitocondria es una organela con un papel muy importante en el metabolismo celular, ya que no sólo mantiene los niveles de ATP en la célula, sino que además regula los niveles de mensajeros secundarios como el  $\text{Ca}^{+2}$  y las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Zorov, Juhaszova, & Sollott, 2006). En la mitocondria también se llevan a cabo los procesos de inducción de muerte celular los cuales están relacionados con la permeabilización de la membrana mitocondrial (Sims & Muyderman, 2010).

Para entender el funcionamiento de este mecanismo es necesario conocer la estructura y la función de la mitocondria, a continuación, se describen cada uno de los complejos que hacen parte de esta maquinaria.

**1.4.2.1 La mitocondria.** La mitocondria puede medir de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y hasta 7  $\mu\text{m}$  de longitud. Su forma puede variar entre esferas, varillas u organismos filamentosos, pero la estructura general es la misma (Figura 5). El número de mitocondrias por célula varía dependiendo de los requisitos de energía: los tejidos con alta capacidad para realizar funciones metabólicas aeróbicas tales como el músculo esquelético tendrán un mayor número de mitocondrias (Youle & Van der Bliek, 2012).

Esta organela tiene dos membranas, una externa y otra interna, cada una formada por una bicapa lipídica. (Krauss, 2001) La membrana interna encierra el espacio de la matriz mitocondrial la cual contiene los sistemas de enzimas centrales del metabolismo intermediario de energía, incluyendo el ciclo del ácido tricarboxílico (CAT) y el sistema de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. En la matriz se producen las reacciones terminales de descomposición y oxidación de las moléculas combustible a dióxido de carbono, con la producción simultánea de equivalentes reductores para la cadena de transferencia de electrones. Una serie de complejos enzimáticos en la membrana interna mitocondrial (MIM), reducen el oxígeno a agua y convierten la energía de combustión en ATP, el cual tiene una gran carga de energía libre, capaz de conducir las reacciones endergónicas en redes de reacciones acopladas (Passarella, Atlante, Valenti, & de Bari, 2003). El mecanismo para la conversión de la energía de combustión, se basa en el bombeo de protones impulsados desde la matriz hacia el espacio intermembrana, formando un potencial electroquímico transmembrana a través de la membrana interna mitocondrial (Ernster & Schatz, 1981). El potencial es transformado en energía “química” de ATP por medio de la ATP sintasa  $F_1F_0$ , un motor nanoquímico, el cual, por medio de movimiento rotatorio provocado por el reflujo de protones, produce cambios de conformación en la proteína capaz de energizar la síntesis de ATP a partir de fosfato de dinucleótido de adenosina (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) (Krauss, 2001).

**1.4.2.2 Cadena respiratoria mitocondrial.** La cadena respiratoria mitocondrial se define como el grupo de complejos enzimáticos involucrados en la transferencia de electrones al oxígeno por medio de bombas de protones redox-impulsadas y la utilización de los gradientes eléctrico y de protones en la síntesis de ATP. Los componentes son denominados complejos I, II, III, IV y V (Figura 7). Las enzimas que suministran electrones a la cadena respiratoria son las enzimas ubiquinona-reductoras, que contienen flavin adenin dinucleótido (FAD), como la succinato-ubiquinona oxidorreductasa (Complejo II), la flavoproteína de transferencia de electrones (ETF)-ubiquinona oxidorreductasa y la glicerol-3-fosfato-ubiquinona oxidorreductasa. Sin embargo, estas enzimas no son capaces de bombear protones, a diferencia de la enzima NADH-ubiquinona oxidoreductasa o complejo I, la cual también suministra electrones a la cadena respiratoria y a su vez bombea cuatro protones por cada par de electrones captados. Los complejos III y IV también funcionan como bombas de protones, esta función de las enzimas redox genera un gradiente de protones ( $\Delta pH$ ) y un potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) a través de la membrana interna. Juntos, los gradientes de potencial de protones y de membrana representan una diferencia de potencial electroquímico de protones ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ) es decir, una carga de energía libre (kJ/mol) que conduce a la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi por la  $F_1F_0$ -ATPsintasa (Hassinen, 2014).

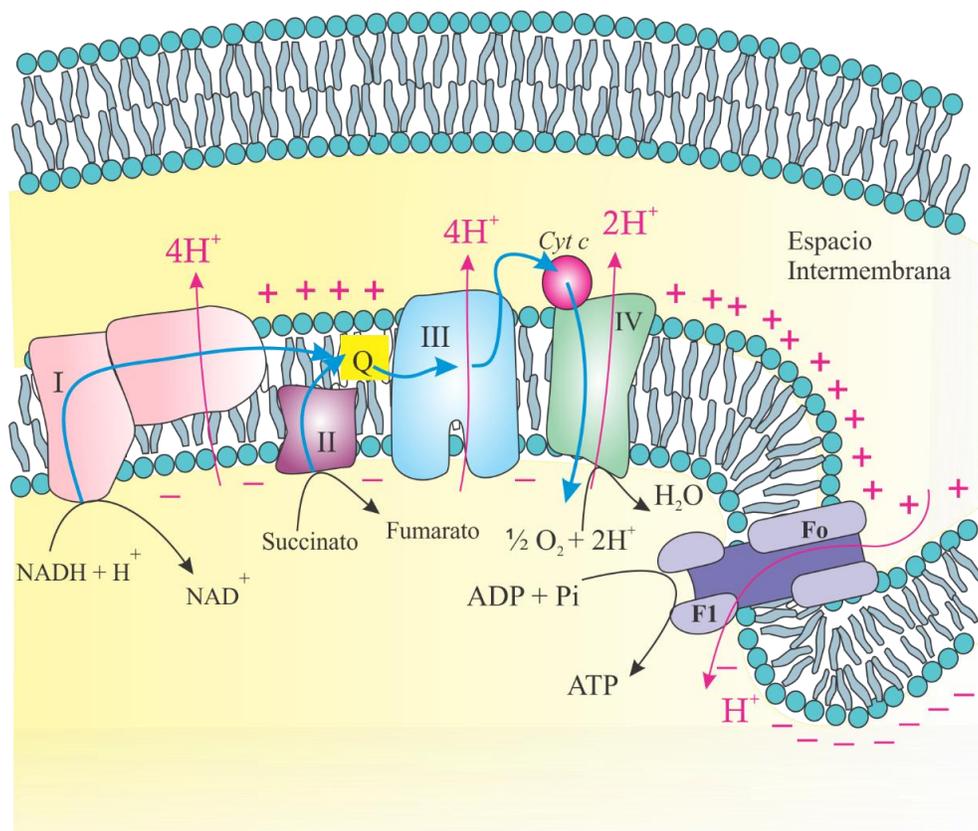


Figura 7. Cadena respiratoria mitocondrial. (Imagen adaptada de Nelson, D. & Cox, M. 2008).

**1.4.2.3 Complejo I.** El complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) es una de las más grandes enzimas con múltiples subunidades en la membrana interna de la mitocondria. En mamíferos, la enzima es un heterómero de 44 subunidades diferentes con una masa molecular de 980kDa.(Balsa et al., 2012) Se caracteriza por su forma en L, con un brazo hidrofílico dirigido hacia la matriz (lado N) y un brazo hidrofóbico embebido en la MIM. La enzima contiene una molécula de flavin mononucleótido (FMN), o riboflavina-5'-fosfato, unida no covalentemente en el sitio activo de unión del NADH en el dominio hidrofílico y presenta un sitio de unión para la ubiquinona en el dominio hidrofóbico. El NADH dona equivalentes reductores a FMN y desde allí los electrones son transportados a través de una secuencia de nueve centros de hierro-azufre hasta el sitio de reducción de la ubiquinona Q (formándose ubiquinol QH<sub>2</sub>). El complejo I funciona

como una bomba de protones redox-impulsada desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana (lado P) y la estequiometría aceptada es  $4\text{H}^+/2\text{e}^-$ . El sistema de bombeo de se muestra en la Figura 8.

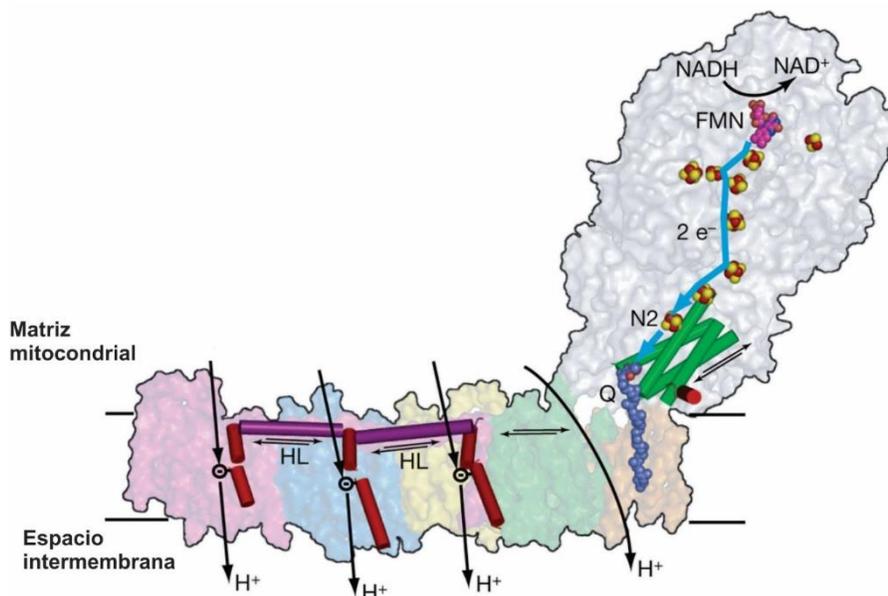


Figura 8. Sistema de bombeo de protones de NADH ubiquinona oxidoreductasa. Imagen adaptada de (Efremov, Baradaran, & Sazanov, 2016).

El NADH dona un par de electrones vía FMN (magenta) hacia los centros de hierro-azufre (rojo-amarillo), los cuales son transportados hacia la ubiquinona (Q, azul oscuro) vía terminal N2. La transferencia de electrones está acoplada a los cambios conformacionales en el dominio hidrofílico, observados en el grupo de cuatro hélices Nqo4 (cilindros verdes) y en la hélice Nqo6 H1 (rojo). Estos cambios son transmitidos a la hélice anfipática HL (magenta), la cual inclina tres hélices discontinuas (rojo), cambiando la configuración del residuo ionizable dentro de los canales de protones, resultando en la transferencia de tres protones. El cuarto protón es transferido en la interfase de los dos dominios principales (Efremov et al., 2016).

**1.4.2.4 Complejo II.** A pesar de que la succinato-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II, o succinato deshidrogenasa- SDH) no tiene la capacidad de conservar la energía redox como un potencial electroquímico, ésta es una enzima clave del ciclo del ácido tricarboxílico y ha sido considerada como un complejo de la cadena respiratoria ya que es una enzima intrínseca a la membrana interna mitocondrial. (Ishaaya, Nauen, & Horowitz, 2007b) La succinato-ubiquinona oxidoreductasa transmite los equivalentes de reducción directamente al ciclo ubiquinona/ubiquinol (Davis & Hatefi, 1971).

La estructura de la succinato-ubiquinona oxidoreductasa de mamíferos y aves ha sido determinada por medio de cristalografía de rayos X. En la Figura 9 se observa la estructura cristalina del complejo II aislado de corazón porcino (F. Sun et al., 2005).

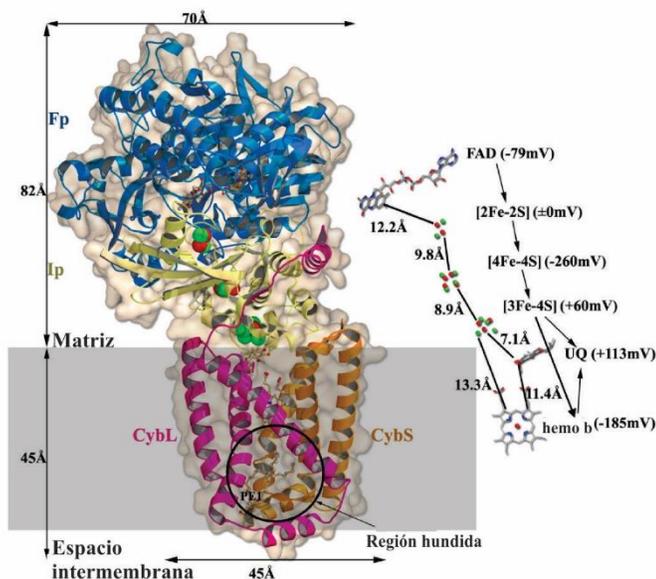


Figura 9. succinato-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II). Imagen adaptada de (F. Sun et al., 2005).

La enzima es un heterómero de cuatro proteínas: una proteína de unión de FAD (Fp, azul), una proteína hierro-azufre (Ip, crema), y dos proteínas de anclaje de membrana (CybL y CybS, fucsia y naranja). El complejo tiene una asimetría con forma de q, con un dominio hidrofílico globular en el lado N y un dominio de membrana. (Cecchini & Schro, 2002) La región transmembrana se encuentra en gris. Al lado derecho de la imagen se encuentran los grupos prostéticos que constituyen el camino de transferencia de electrones (FAD, [2Fe-2S], [4Fe-4S], [3Fe-4S] y el grupo hemo b se muestra junto con la ubiquinona UQ junto con las distancias y los puntos medios de potenciales redox. El flujo de electrones se indica con flechas.

**1.4.2.5 Complejo III.** El complejo III (ubiquinona- citocromo c-oxidoreductasa, o complejo citocromo bc<sub>1</sub>) es un complejo enzimático heteromérico de 11 a 12 subunidades diferentes, que transporta electrones desde el ubiquinol (QH<sub>2</sub>) hacia el citocromo c.

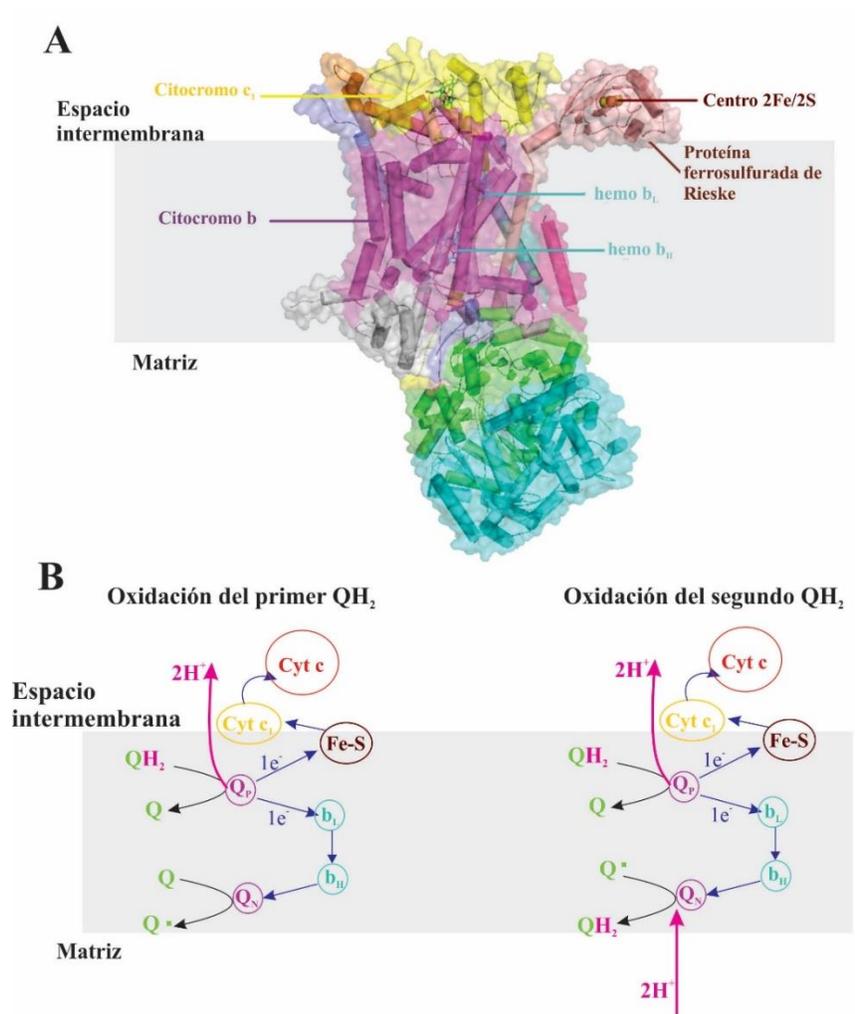


Figura 10. Complejo III, citocromo  $bc_1$  y ciclo de la ubiquinona Q. Imagen adaptada de (Mulkidjanian, 2010). A) unidad dimérica funcional del citocromo  $bc_1$ . B) Ciclo de la ubiquinona Q.

La unidad dimérica funcional del complejo se muestra en la Figura 10<sup>a</sup>. La función del complejo III se centra en el citocromo b (magenta), una proteína de membrana con 8 hélices, dos grupos hemo b ( $b_H$  y  $b_L$ ) y dos dominios de unión a la ubiquinona (uno cercano al espacio intermembrana,  $Q_P$ ; y otro cercano a la matriz mitocondrial,  $Q_N$ ) en cercanía a los grupos hemos. El grupo hemo de potencial bajo, ( $b_L$ , -30 mV) está localizado cerca al espacio intermembrana y el grupo hemo

de potencial alto ( $b_H$ , +90 mV) cerca de la matriz mitocondrial. Además, el complejo contiene una única proteína Fe-S (proteína Rieske) y un citocromo  $c_1$  (Mulkidjanian, 2010).

El complejo III opera como una bomba de protones redox-impulsada con una relación estequiométrica de  $4H^+/2e^-$ . Esto se basa en el llamado ciclo de la ubiquinona (Figura 10B), donde la molécula ubiquinol  $QH_2$ , es oxidada en  $Q_p$  por medio de un mecanismo bifurcado. En este caso, un electrón es donado hacia el hemo  $b_L$ , para luego ser transportado hacia  $b_H$  y el otro electrón es donado hacia la proteína Rieske, para ser transferidos hacia el citocromo  $c_1$  y luego hacia el citocromo  $c$  en la parte externa de la MIM. El electrón donado a  $b_H$ , es transferido hacia una molécula de ubiquinona  $Q$ , en el sitio  $Q_N$ , formando un radical ubiquinona el cual es reducido completamente a ubiquinol cuando se realiza nuevamente el ciclo, es decir cuando se oxida una segunda molécula de ubiquinol. En la figura, el movimiento de los electrones se indica por las flechas azules (Gao et al., 2003).

**1.4.2.6 Complejo IV.** El complejo IV (citocromo  $c$  oxidasa; citocromo  $aa_3$ ) cataliza la reducción del oxígeno a agua por medio del citocromo  $c$  reducido (ferrocitocromo  $c$ ). Este cosustrato se difunde lateralmente desde el complejo III y se adhiere al lado P de la MIM, de modo que la transferencia de electrones al sitio de reducción del oxígeno es vectorial y ocurre a través de la membrana. Debido a que la dirección de la transferencia de electrones es hacia la matriz mitocondrial y la captura de los protones para la reducción del oxígeno se produce cerca del lado N de la membrana, la enzima produce un potencial electroquímico de protones ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ). Este gradiente se ve aumentado por el bombeo transmembrana de protones redox-impulsado desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana con la estequiometría de  $2H^+/2e^-$  (Brunori, Antonini, Malatesta, Sarti, & Wilson, 1987).

La enzima en mamíferos es un heterómero con un tamaño de 220kDa de 13 subunidades, de las cuales las 3 más hidrofóbicas (I, II y III) están codificadas en el ADNmt. La subunidad II contiene dos iones de cobre que forman complejo con los grupos  $-SH$  de dos residuos de Cys en un centro binuclear ( $Cu_A$ ) que se parece a los centros  $2Fe-2S$  de las proteínas ferro-sulfuradas. La subunidad I contiene dos grupos hemo, designados  $a$  y  $a_3$ , y otro ión cobre ( $Cu_B$ ). El hemo  $a_3$  y el  $Cu_B$  forman un segundo centro binuclear que acepta los electrones del hemo  $a$  y los transfiere al  $O_2$  unido al hemo  $a_3$  (Figura 11) (Brunori et al., 1987).

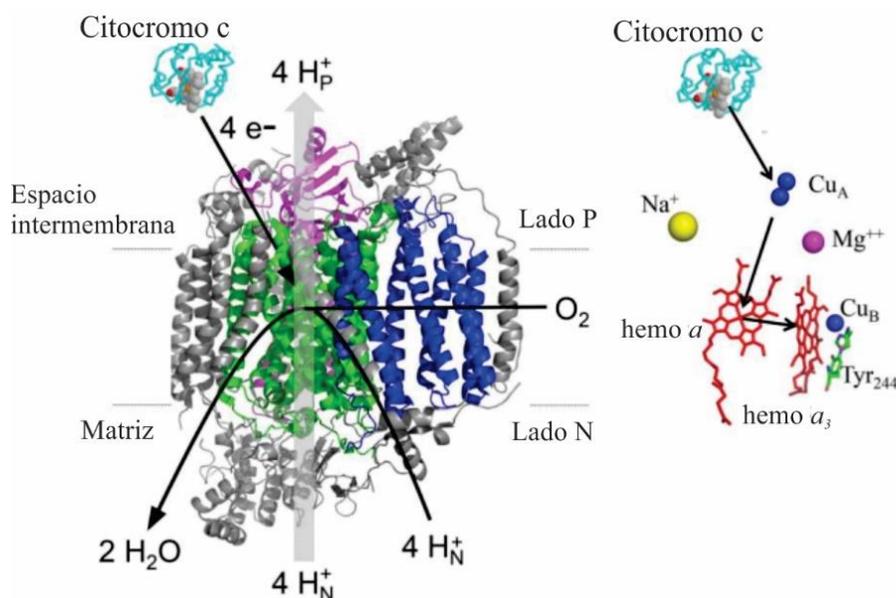


Figura 11. Estructura del complejo citocromo aa<sub>3</sub>. Imagen adaptada de (Rich, 2017).

La transferencia de electrones a través del complejo IV va del citocromo c al centro  $Cu_A$ , al hemo  $a$ , al centro hemo  $a_3-Cu_B$  y finalmente al  $O_2$ . Por cada cuatro electrones que pasan a través del complejo, la enzima consume cuatro  $H^+$  de la matriz (lado N) convirtiendo el  $O_2$  en  $2H_2O$ . También utiliza la energía de esta reacción para bombear un protón hacia el espacio intermembrana

(lado P) por cada electrón que pasa, sumándose al potencial electroquímico producido por el transporte de protones redox-impulsado de los complejos I y III.(Rich, 2017)

**1.4.2.7 Complejo V.** La F1Fo-ATPasa (complejo V, o F1Fo-ATP sintasa) sintetiza ATP celular a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi). La energía necesaria para la síntesis de ATP viene del transporte de protones a través de la membrana a favor del gradiente de potencial electroquímico ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ). La síntesis de ATP es la reacción química más prevalente en el mundo biológico y la ATP sintasa es una de las proteínas más abundantes en la tierra. Esta enzima usa rotación física de sus propias unidades como un paso de la catálisis, un mecanismo diferente al de cualquier enzima conocida (Yoshida, Muneyuki, & Hisabori, 2001).

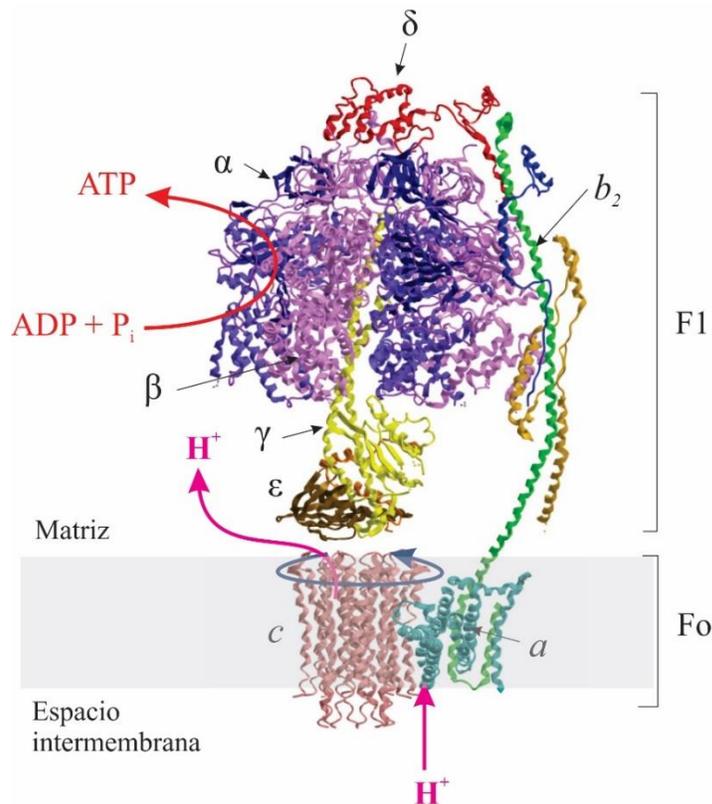


Figura 12. ATPasa. Imagen adaptada de (Nesci, Trombetti, Ventrella, & Pagliarani, 2017).

La ATPsintasa es un complejo proteico de aproximadamente 500kDa con una complicada estructura (Figura 12). El complejo enzimático se compone de tres dominios: un rotor incorporado en la membrana (Fo), un dominio catalítico hidrofílico (F1) en el espacio de la matriz, y un tallo de unión (b, verde y naranja). La parte F1 consta de tres subunidades  $\alpha$  (azul oscuro), tres subunidades  $\beta$  (morado) y tres subunidades denominadas  $\gamma$  (amarillo),  $\delta$  (rojo), y  $\epsilon$  (café). Los pares de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , forman tres sitios catalíticos capaces de hidrolizar o sintetizar ATP. Las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$  están fijadas a la parte Fo y por lo tanto giran con él y forman un eje que se extiende hacia el centro de la parte F1. El complejo Fo es el “rotor” y contiene las subunidades a (turquesa), b y c (rosa), en la proporción  $ab_2c_{8-15}$ . (Dmitriev, Jones, & Fillingame, 1999) La subunidad c es un polipéptido pequeño (8000 Da), muy hidrofóbico, que consisten exclusivamente de dos hélices transmembrana, con un pequeño lazo que se extiende desde el lado de la matriz de la membrana. (Abrahams, Leslie, Lutter, & Walker, 1994) La rotación del complejo está acoplada mecánicamente al flujo de protones, que se canaliza hacia la subunidad c por la subunidad a. La rotación impulsada por protones está unida a una protonación/desprotonación ordenada, de un residuo de ácido glutámico expuesto en la subunidad c. El número de protones necesarios para una revolución completa del rotor es igual al número de subunidades c que hay en el mismo. El rotor acciona el giro de la subunidad  $\gamma$  asimétrica, que produce cambios de conformación en los tres sitios activos del dominio F1. Estos proporcionan la energía para la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi. Una vuelta del rotor Fo, resulta en la síntesis de tres moléculas de ATP, mientras que la estequiometría ATP/H<sup>+</sup> depende del número de subunidades c en el rotor. Las ocho subunidades c del rotor Fo en células de mamífero, da una relación de H<sup>+</sup>/ATP de  $8/3 = 2,7$  (García & Morales, 2008).

**1.4.2.8 Insecticidas que afectan la cadena respiratoria mitocondrial.** Debido a que la cadena respiratoria juega un papel muy importante en el metabolismo energético, muchos insecticidas tienen como diana algunos de los complejos que la conforman. Existen un amplio número de insecticidas que afectan al complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) y al complejo III (ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa) (Khambay & Jewess, 2000; Lümmen, 1998). A pesar de que hasta ahora no hay reportes de compuestos insecticidas que afecten el complejo II, algunos inhibidores de este complejo presentan actividad antifúngica (Avenot & Michailides, 2010). Finalmente, no hay ejemplos de insecticidas reportados que inhiban el complejo IV.

Entre los inhibidores del complejo I están la rotenona y la piericidina A, los cuales son ampliamente conocidos como inhibidores de alta afinidad del complejo I (ver Figura 13). Sin embargo, estos últimos años se han descubierto nuevos compuestos que bloquean este complejo con alta eficiencia. Entre esos se encuentran algunos compuestos sintéticos, como los pirazoles, pirimidinas, piridinas y quinazolinas (Degli Esposti, 1998). Además, varios metabolitos secundarios han mostrado actividad inhibitoria sobre este complejo, entre esos están las acetogeninas, aisladas de plantas de la familia *Annonaceae*, y el tiangazol, aislado de *Polyangium* (Lümmen, 1998).

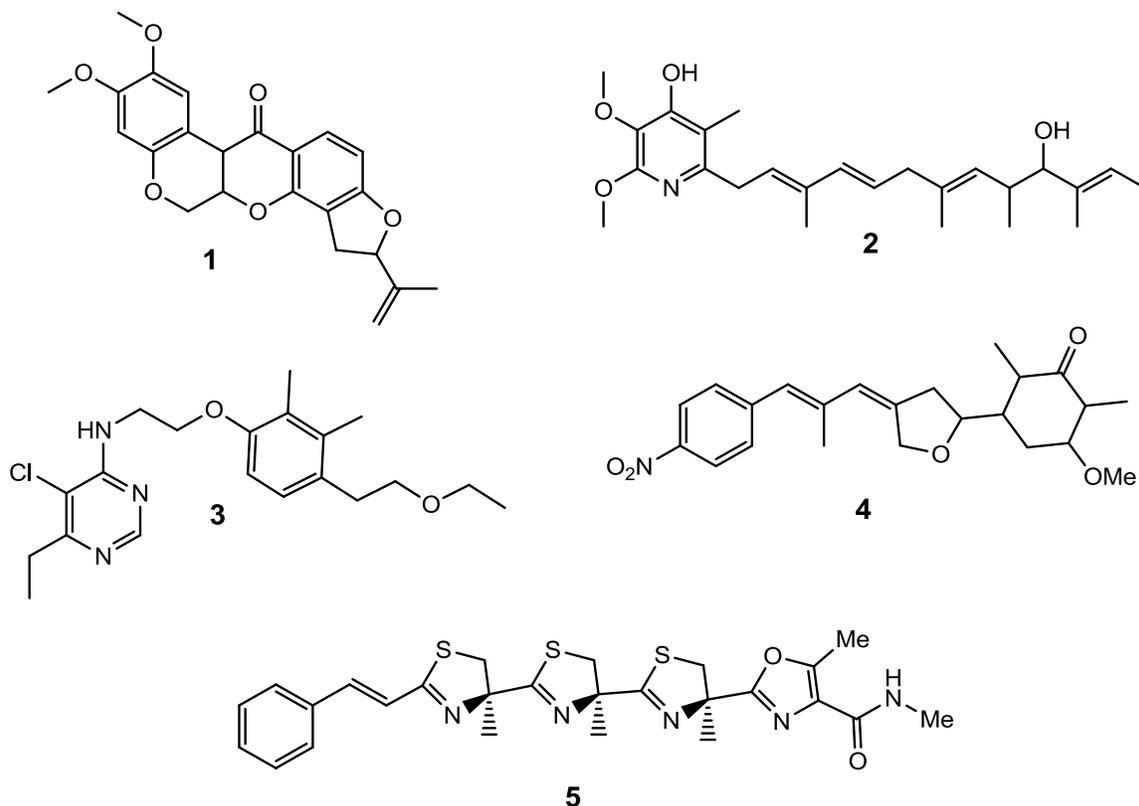


Figura 13. Estructuras de algunos insecticidas inhibidores del complejo I. 1) rotenona, 2) piericidina A, 3) pirimidifen, 4) benzimidazol, 5) tiangazol. (Friedrich et al., 1994; Ishaaya, Nauen, & Horowitz, 2007a).

La antimicina A es el inhibidor del complejo III más conocido el cual se acopla al sitio  $Q_N$  (donde ocurre la reducción de la ubiquinona), y por lo tanto representa al grupo de inhibidores de este sitio. Los inhibidores del sitio  $Q_P$  (donde ocurre la oxidación de la ubiquinona) son reconocidos por su efecto en el espectro de absorción del citocromo b (Lambert & Brand, 2004). Los insecticidas que inhiben el complejo III pertenecen al grupo de inhibidores del sitio  $Q_P$ . Entre los más conocidos se encuentran los  $\beta$ -metoxiacrilatos, mixotiazol, stigmatelina y 2-hidroxiquinonas (Figura 14) (Ishaaya et al., 2007a).

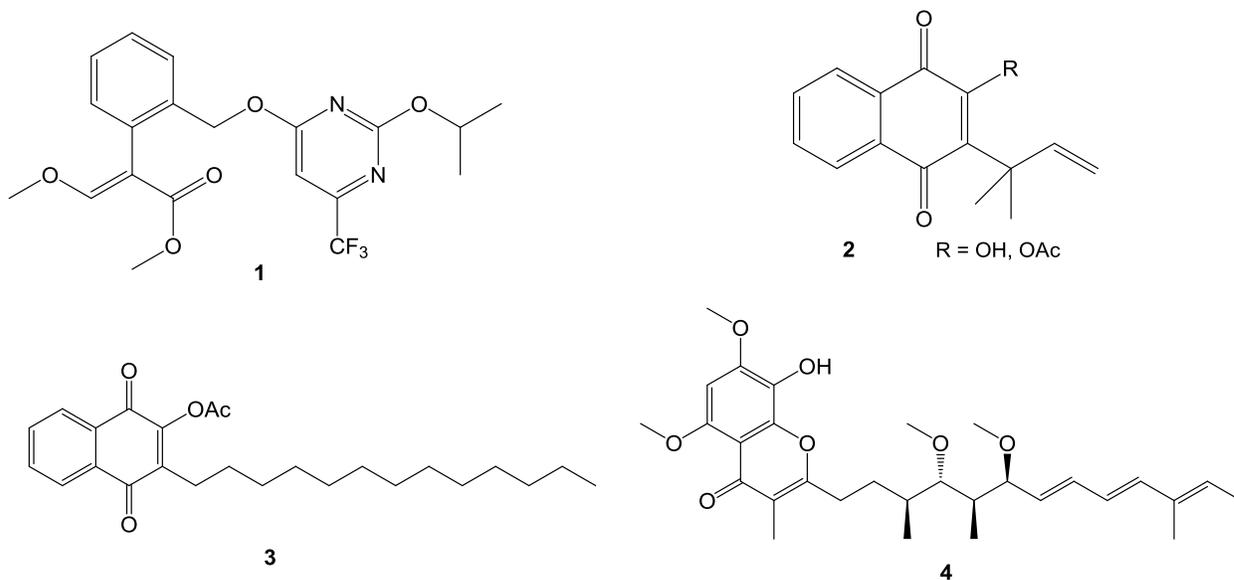


Figura 14. Estructura de algunos insecticidas inhibidores del complejo III. 1) fluacripirim, 2) hidroxinaftoquinonas, 3) acequinocil, 4) stigmatelina (Ishaaya et al., 2007a).

**1.4.3 Daño sobre el ADN.** A pesar de que los insecticidas más comunes (organofosforados, piretroides, carbamatos, entre otros) figuran como inhibidores de dianas específicas como las mencionadas en la sección 1.3, existen varios reportes de que estos compuestos también afectan otras dianas en organismos biológicos superiores, causando neuritis, manifestaciones psiquiátricas, desordenes hepato-renales, neurológicos, inmunológicos, metabólicos y endocrinos. (Prieto Garcia, Cortés Ascencio, Oyarzun, Hernandez, & Alavarado, 2012) Además, también se ha encontrado relación con la leucemia y otros tipos de cáncer. Tal es el caso de los insecticidas organofosforados y los carbamatos cuyo principal mecanismo de acción es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y sus efectos secundarios están relacionados con diferentes tipos de cáncer, tales como el linfoma no-Hodgkiniano, y leucemias (De Roos et al., 2003; Newcombe, 1992).

Diferentes estudios han demostrado el efecto genotóxico de ciertos insecticidas comerciales y su relación con la carcinogénesis, ya que la mayoría de compuestos que afectan el ADN son también cancerígenos (Hreljac, Zajc, Lah, & Filipi, 2010). Por ejemplo, en un estudio realizado por Ündeğer, Ü. & Başaran, N. (2005), (Ündeğer & Başaran, 2005) se reporta el daño sobre el ADN de linfocitos humanos causado por compuestos de la clase de los organofosforados, como el dimetoato y el metil paratión, los cuales mostraron efecto genotóxico a las concentraciones de 100 y 200 µg/mL; carbamatos, como el propoxur que mostró efectos a 50, 100 y 200 µg/mL y el pirimicarb a 200 µg/mL; y piretroides como la cipermetrina y la permetrina cuyo efecto se evidenció a 200 µg/mL. En un estudio similar realizado por Kaur, R. y colaboradores (2011) (Kaur, Kaur, & Lata, 2011), se evaluó el efecto genotóxico de diferentes insecticidas, encontrando efectos adversos en el ADN tomado de muestras sanguíneas de agricultores provenientes de Punjab (India), los cuales fueron expuestos a compuestos organofosforados, carbamatos, piretroides y ditiocarbamatos, entre otros. En la Figura 15 se muestran las estructuras de algunos insecticidas genotóxicos reportados en estos estudios.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, hay suficiente evidencia que soporta el hecho de que los insecticidas más usados están relacionados con efectos adversos sobre humanos y por lo tanto, la búsqueda de nuevos compuestos insecticidas también debe estar enfocada en la seguridad para la salud humana (Bonner & Alavanja, 2017). Es por esto que es de gran importancia evaluar el efecto de estos compuestos sobre el ADN, de esta forma, es posible prevenir el uso de compuestos que podrían ser potenciales agentes cancerígenos, mutagénicos o teratogénicos. Actualmente, se desarrollan varios ensayos para evaluar este efecto, usando generalmente células humanas en el caso de ensayos *in vitro* o ratones para los ensayos *in vivo*. En este tipo de ensayos, las células o los animales son expuestos a varias concentraciones del insecticida a probar y

posteriormente se aísla el ADN y se buscan patrones de fraccionamiento o degradación (Collins, 2004; Kaur et al., 2011; Villarini et al., 1998).

Numerosos estudios han demostrado que los insectos pueden ser usados como modelos para estudios de cambios genéticos y epigenéticos causados por muchos factores externos como patógenos, parásitos, agentes químicos y otros factores de estrés (K. Mukherjee, Twyman, & Vilcinskas, 2015). Además de que las bases estructurales del ADN son las mismas para bacterias, insectos, animales vertebrados y humanos; el modelo con insectos tiene grandes ventajas frente al modelo de ratones o células humanas en ensayos bioquímicos. Por ejemplo, considerando el número de animales que se usan en este tipo de ensayos, el mantenimiento y el monitoreo es mucho más económico, práctico y hay menos consideraciones éticas cuando se usan insectos (Simpson, Sword, & Lo, 2011; Srinivasan & Brisson, 2012). Además, los insectos proveen un sistema mucho más accesible para la manipulación experimental de diferentes mecanismos genéticos con el objetivo de estudiar los efectos de la exposición a patógenos o químicos externos. Los mecanismos genéticos investigados en modelos de insectos son relevantes a los procesos equivalentes en mamíferos y pueden ser usados para investigar bases epigenéticas de enfermedades humanas (Boros, 2012).

- *Mecanismos del daño sobre el ADN.* Los daños genéticos son causados por interacciones directas o indirectas con el material genético resultando en un daño del ADN o aberraciones cromosómicas y son considerados como un mecanismo primario para el desarrollo de enfermedades crónicas en el contexto de la carcinogénesis y la teratogénesis (Bolognesi, 2003). Los daños genéticos se pueden clasificar en tres grupos: 1) daños premutagénicos como

el rompimiento de la hebra de ADN y la combinación del ADN o la síntesis de ADN no programado; 2) mutaciones de genes, es decir inserción o eliminación de algunos pares de bases; bases; 3) aberraciones cromosómicas, incluyendo pérdida o ganancias de un cromosoma entero, eliminación o rompimiento y segmentos cromosómicos o re-arreglos. Los daños premutagénicos pueden ser reparados antes de la división celular, mientras que los daños en el segundo y tercer grupo son permanentes y tienen la habilidad de transmitirse a las células hijas después de la división (Guy, 2005).

Finalmente, en este proyecto se evaluó el efecto genotóxico de los metabolitos secundarios seleccionados con actividad insecticida, con el objetivo de descartar compuestos potencialmente riesgosos para la salud humana. El daño causado por los metabolitos sobre el ADN aislado de larvas se evaluó en tres diferentes ensayos que se describen en la metodología. A continuación, se muestran los objetivos planteados para este proyecto.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Estudiar el mecanismo de acción de una mezcla de metabolitos secundarios de plantas medicinales que crecen en el territorio colombiano y que presenten actividad insecticida sobre *Aedes aegypti*, usando el análisis *in silico* como un método de cribado.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar metabolitos secundarios que presenten actividad insecticida usando el análisis *in silico* como herramienta de discriminación.
- Evaluar la acción insecticida de los metabolitos identificados y mezclas de ellos sobre *Ae. aegypti* en larvas y adultos, estimando las concentraciones letales (CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub>).
- Evaluar el efecto de los metabolitos sobre el ADN de *Ae. aegypti*.
- Determinar el efecto de los metabolitos sobre la actividad enzimática de acetilcolinesterasa.
- Determinar alteraciones sobre la bioenergética mitocondrial en larvas de *Ae. aegypti* de los metabolitos identificados con acción insecticida.
- Establecer una mezcla de metabolitos que potencialice el efecto insecticida de los metabolitos con menor CL<sub>50</sub>.

### 3. Metodología

A continuación, se describe cada uno de los protocolos implementados a lo largo de este proyecto de investigación, empezando por el cribado virtual, seguido por la cría de mosquitos, los ensayos biológicos de actividad insecticida y finalmente los diferentes métodos empleados para determinar el mecanismo de acción de los metabolitos seleccionados según la actividad sobre la bioenergética mitocondrial, la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y la degradación del ADN.

#### 3.1 Análisis *in silico* y selección de metabolitos secundarios

Los programas *OSIRIS Property Explorer* (Organic Chemistry Portal, 2016) y *Molinspiration Cheminformatics Software* (Molinspiration Cheminformatics, 2016) fueron usados como herramientas bioinformáticas para el cribado virtual de los 33 metabolitos secundarios de los aceites esenciales de las plantas: *Tagetes lucida*, *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Citrus sinensis*, *Swinglea glutinosa*, y *Cananga odora*, reportados por Vera, 2014 (Vera et al., 2014), los cuales se muestran en la Tabla 3. La estructura química de cada metabolito secundario fue analizada por los programas *OSIRIS* y *Molinspiration* los cuales emplean métodos basados en estadística bayesiana y contribuciones de fragmentos para calcular variables relacionadas con la predicción de la actividad biológica de las moléculas. El análisis de los programas asignó a cada metabolito valores correspondientes a 16



24	$\beta$ -mirceno		20.2	5.0		2.8	5.9
25	Neral	28.2	29.0				
26	Nerol		3.0				
27,28	<i>Trans</i> - $\beta$ -ocimeno, n- octanol			2.0			1.3
29	$\alpha$ -pineno	1.5					12.0
30,31	$\beta$ -pineno, piperitenona				4.8	4.4	49.6
32	Piperitona					2.6	
33	Sabineno			1.6			11.0

Tabla 4. Variables consideradas en el cribado virtual.

Propiedades físicoquímicas	Puntajes de bioactividad <sup>2</sup>	Riesgo de toxicidad <sup>1</sup>	Similitud a drogas <sup>1</sup>
Peso molecular <sup>1</sup>	Ligandos de receptores	Mutagénico	Druglikeness
Coefficiente logP <sup>1,2</sup>	acoplados a proteínas G	Tumorigénico	Drug-score
Área de superficie polar molecular <sup>2</sup>	Moduladores de canal iónico	Irritante	
	Inhibidores de quinasas	Efectos reproductivos	
	Ligandos de receptores nucleares		
	Inhibidores de proteasas		
	Inhibidores enzimáticos		

<sup>1</sup> variables evaluada con *OSIRIS*

<sup>2</sup> variables evaluadas con *Molinspiration*

**3.1.1 Propiedades físicoquímicas.** Las propiedades físicoquímicas determinadas para cada una de las moléculas analizadas fueron:

- *Peso molecular*: Es uno de los parámetros de Lipinski, el cual considera que las moléculas con pesos moleculares inferiores a 500 Da pueden atravesar membranas biológicas con mayor facilidad que moléculas con pesos superiores.

- *Coefficiente de partición octanol/agua (logP)*: Es calculado por las metodologías desarrolladas por cada uno de los programas mencionados anteriormente, como una suma de contribuciones de fragmentos y factores de corrección. Es usado en estudios de relación cuantitativa estructura-actividad, QSAR (por sus siglas en inglés, *Quantitative Structure-Activity Relationship*) y en el diseño de drogas como una medida de hidrofobicidad molecular.(Molinspiration cheminformatics, 2006)

- *Área de superficie polar molecular (PSA, Polar Surface Area)*: Es calculada basada en la metodología publicada por Ertl *et al.*(Ertl, Rohde, & Selzer, 2000) como una suma de contribuciones de fragmentos.

**3.1.2 Puntajes de bioactividad.** Además de las propiedades fisicoquímicas mencionadas anteriormente, también se estimaron los puntajes de bioactividad, los cuales pueden ser definidos como un balance complejo de varias propiedades moleculares y características estructurales, las cuales permiten determinar si una molécula en particular es similar a las drogas conocidas. Estas propiedades son principalmente hidrofobicidad, distribución electrónica, tamaño molecular flexibilidad, y por supuesto varias características que influyen el comportamiento de la molécula en un organismo vivo, incluyendo biodisponibilidad, propiedades de transporte, afinidad a proteínas, reactividad, toxicidad, estabilidad metabólica, entre otras (Molinspiration cheminformatics, 2016; OSIRIS Property explorer, 2016).

La herramienta bioinformática *Molinspiration*, implementa el uso de la estadística bayesiana para comparar las estructuras de ligandos activos representativos en dianas particulares con estructuras de moléculas inactivas, e identificar las subestructuras características típicas para las moléculas activas (Molinspiration cheminformatics, 2016).

Los puntajes de bioactividad están enfocados hacia:

- Ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCR)
- Moduladores de canales iónicos
- Inhibidores de quinasas
- Ligandos de receptores nucleares
- Inhibidores de proteasas
- Inhibidores enzimáticos.

Según las distribuciones de los puntajes de actividad para las seis clases de receptores más importantes, los valores más positivos están relacionados con una mayor probabilidad de que la molécula analizada sea activa sobre determinado *target* (Molinspiration cheminformatics, 2016).

Los puntajes de bioactividad de los metabolitos secundarios fueron comparados con el puntaje del compuesto organofosforado Temefos. Este insecticida es usado a nivel mundial en campañas de salud pública para el control de larvas de mosquitos.

**3.1.3 Riesgo de toxicidad.** La herramienta *OSIRIS* permite predecir el riesgo de toxicidad de una molécula usando un modelo computacional establecido por contribución de fragmentos. El programa fue diseñado con los fragmentos estructurales de más de 150 000 compuestos reportados en la base de datos RTECS (por sus siglas en inglés *Registry of Toxic Effects of Chemical*

*Substances*)(Canadian Centre for Occupational Health and Safety Resource, 2017) conocidos por presentar algún efecto tóxico. Además, se compararon con los fragmentos estructurales de alrededor de 3000 fármacos comerciales, los cuales están libres de cualquier toxicidad. Cualquier fragmento encontrado frecuentemente en las estructuras de compuestos nocivos pero nunca o rara vez en fármacos comerciales, fueron considerados un factor de riesgo de toxicidad (OSIRIS Property explorer, 2014).

**3.1.4 Similitud con drogas.** Este cálculo es determinado de manera similar al riesgo de toxicidad, usando una lista de fragmentos estructurales obtenida de 3300 fármacos comerciales (compuestos activos) y 15000 compuestos químicos comerciales sin actividad biológica conocida (compuestos inactivos). Los fragmentos encontrados frecuentemente en los compuestos activos y rara vez en compuestos inactivos son considerados como factores de similitud. El programa *OSIRIS* busca estos factores de similitud en las estructuras de las moléculas bajo análisis y les asigna puntajes que al final son sumados y representados en un solo valor (OSIRIS Property explorer, 2016).

**3.1.5 Análisis de componentes principales (CP).** Este análisis se realizó con el programa IBM SPSS Statistics, versión 19.0. Se suministró una matriz de datos de dimensiones 33 x 16 (Anexo 1), correspondiente a los 33 metabolitos analizados por las herramientas bioinformáticas *OSIRIS property* y *molinspiration* bajo las 16 variables mencionadas en la Tabla 4. Este análisis se desarrolló con el fin de reducir la dimensionalidad de los datos y encontrar el conjunto de variables con la información más relevante, representada estadísticamente como la componente con mayor varianza. Las variables con mayor peso en la

primera componente extraída se usaron como primer criterio de selección de los metabolitos secundarios que fueron probados en los ensayos de actividad insecticida. Por este análisis se escogieron seis metabolitos, de los cuales cinco se encontraron comercialmente (ver sección 4.1.1).

**3.1.6 Cálculo del CL<sub>50</sub> relativo.** Con el objetivo de ampliar el número de metabolitos seleccionados para las pruebas *in vivo* e *in vitro*, desarrollamos otro método de cribado. Un cálculo que hemos denominado “CL<sub>50</sub> relativo”. Este cálculo busca relacionar el CL<sub>50</sub> de cada aceite esencial con la proporción de cada metabolito en el mismo. Para este cálculo se usó la siguiente fórmula:

$$CL_{50 \text{ relativo}} = \frac{CL_{50 \text{ AE}} \times \% \text{ metabolito en AE}}{100}$$

Donde CL<sub>50 AE</sub>, es la concentración letal reportada para cada aceite esencial sobre larvas de *Ae. aegypti* y % metabolito en AE, corresponde al porcentaje del metabolito secundario en el aceite esencial reportado en Vera, 2014 (Vera et al., 2014).

Por este método se seleccionaron los cinco metabolitos que presentaron los valores más bajos de CL<sub>50</sub> relativo en dos o más aceites esenciales según Vera, 2014. De los cinco metabolitos seleccionados, dos no se encontraron comercialmente y uno fue seleccionado previamente por el análisis de CP (ver sección 4.1.2). Los metabolitos secundarios seleccionados por este segundo método de cribado fueron evaluados según su actividad larvicida.

### 3.2 Evaluación de metabolitos con actividad insecticida

**3.2.1 Cría de mosquitos.** Para los bioensayos se usó *Ae. aegypti* colonia Rockefeller, mantenida en jaulas de cría (40×40×40 cm) en insectario a  $25 \pm 5$  °C, humedad de  $70 \pm 5\%$  y fotoperiodo (12:12). A los machos de *Ae. aegypti*, se les ofreció permanentemente una solución azucarada de miel al 10%. Periódicamente se suministró alimentación sanguínea a las hembras para la obtención de huevos utilizando rata albina (*Rattus norvegicus*) de raza Winstar WI IOPS AF/Han, facilitada por el bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, cumpliendo las disposiciones de la Ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Para la deposición de los huevos se usaron recipientes con papel filtro húmedo el cual se retiraba luego de cinco días y se dejaba secar por tres días más de maduración de los embriones a temperatura ambiente; luego de este proceso, se estimuló la eclosión en agua mineral libre de cloro, adicionando alimento para peces marca TetraMin Tropical Flakes (*Tetra*, Blacksburg, VA, EE. UU.). Las larvas obtenidas de la colonia madre se mantenían en bandejas plásticas y fueron alimentadas con el mismo concentrado para peces.

**3.2.2 Actividad larvicida.** El ensayo de actividad larvicida consistió en la evaluación de los siete metabolitos seleccionados por medio del análisis *in silico*, en cinco diferentes concentraciones sobre larvas de *Ae. aegypti*. Para esto, se usaron recipientes plásticos de 7 oz, en donde se depositaron 100 mL de solución de metabolito a la concentración a evaluar, junto con diez larvas, entre el tercer y cuarto estado larval (L3 y L4). Estas soluciones fueron preparadas usando agua libre de cloro como solvente y los metabolitos fueron disueltos previamente en dimetil sulfóxido (DMSO), teniendo en cuenta que la concentración final de

DMSO en la solución siempre fuera menor al 0.5%. Se realizaron cuatro réplicas para cada ensayo en tres días independientes más un control de DMSO al 0.5%. Se registró el número de larvas muertas por vaso a 24 y 48 h, y con base en los resultados se calcularon las concentraciones letales al 50 y 95 % ( $CL_{50,95}$ ), usando un análisis estadístico Probit.

Una vez calculadas las concentraciones letales de cada compuesto sobre las larvas de *Ae. aegypti*, fueron seleccionados los compuestos con menor  $CL_{50}$  para evaluar su efecto sobre la bioenergética mitocondrial, la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y el daño en el ADN.

**3.2.3 Actividad adulticida.** El ensayo de actividad adulticida o ensayo de susceptibilidad se desarrolló de acuerdo con el protocolo de la CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). Para esto se emplearon botellas de vidrio tipo Wheaton de 250 mL. En cada botella se adicionó 1 mL del metabolito a analizar preparado en las concentraciones de 30, 300 y 1000 mg/L usando acetona como solvente. Las botellas fueron impregnadas con el metabolito, agitándolas e invirtiéndolas de tal forma que toda la superficie quedara expuesta a la solución. Una vez el líquido fue distribuido uniformemente, las botellas se dejaron secando toda la noche. En cada botella se introdujeron diez individuos (machos y hembras) y la mortalidad fue monitoreada cada 15 min por dos horas.

### 3.3 Estudio del mecanismo de acción

A continuación, se muestran los diferentes protocolos usados en el estudio del mecanismo de acción de los metabolitos seleccionados con actividad insecticida sobre *Ae. aegypti*: daño sobre el

ADN, inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y efecto sobre la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial de *Ae. aegypti*.

**3.3.1 Evaluación del daño sobre ADN de *Aedes aegypti*.** Para la determinación del daño sobre el ADN se realizaron tres ensayos en diferentes condiciones, esto con el fin de observar el daño causado sobre el ADN de forma directa e indirectamente. Los ensayos se desarrollaron de la siguiente forma: 1) las larvas fueron expuestas durante 24 y 48 h al metabolito usando la concentración igual a su CL<sub>50</sub>, posteriormente el ADN fue aislado; 2) los compuestos fueron adicionados inmediatamente después del proceso de homogeneización de las larvas en el proceso de aislamiento de ADN y 3) los compuestos fueron adicionados sobre el ADN aislado de larvas sin tratamiento.

Para el aislamiento del ADN del mosquito se emplearon larvas en tercer y cuarto estado de desarrollo. El ADN fue extraído siguiendo el protocolo del *kit* de extracción ULtraClean® Tissue & Cells de *Laboratorios MO BIOS Inc*, usando un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (*WHEATON*, Millville, NJ, EE.UU.) para lisar los tejidos. Para la electroforesis se preparó *buffer* TBE pH 8.0 y gel de agarosa 1%, al cual se le adicionó el agente colorante de ADN SYBR® Safe DNA gel stain (*Invitrogen*). Como marcador de peso molecular, se utilizó HyperLadder® 1kb (*Bioline*) de 200 a 10000 pares de bases (pb).

Las condiciones de corrida de la electroforesis fueron: 100 V durante 30 min. El gel fue observado en un transiluminador ENDURO GDS TOUCH® de 302 nm (*Labnet International, Inc.*). El diseño experimental incluyó dos réplicas de cada ensayo.

### 3.3.2 Inhibición de la acetilcolinesterasa

3.3.2.1 *Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa comercial.* Para determinar el efecto de los metabolitos sobre la actividad de la acetilcolinesterasa comercial, se empleó el método de (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961), reemplazando la acetilcolina (compuesto que no presenta propiedades espectroscópicas) por acetil-tiocolina como sustrato. La actividad de la enzima fue medida espectrofotométricamente a 405 nm, monitoreando la formación el ión ácido 2-nitro, 5-mercapto-benzóico (TNB<sup>-</sup>) generado por la reacción entre la tiocolina y el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (Figura 15).

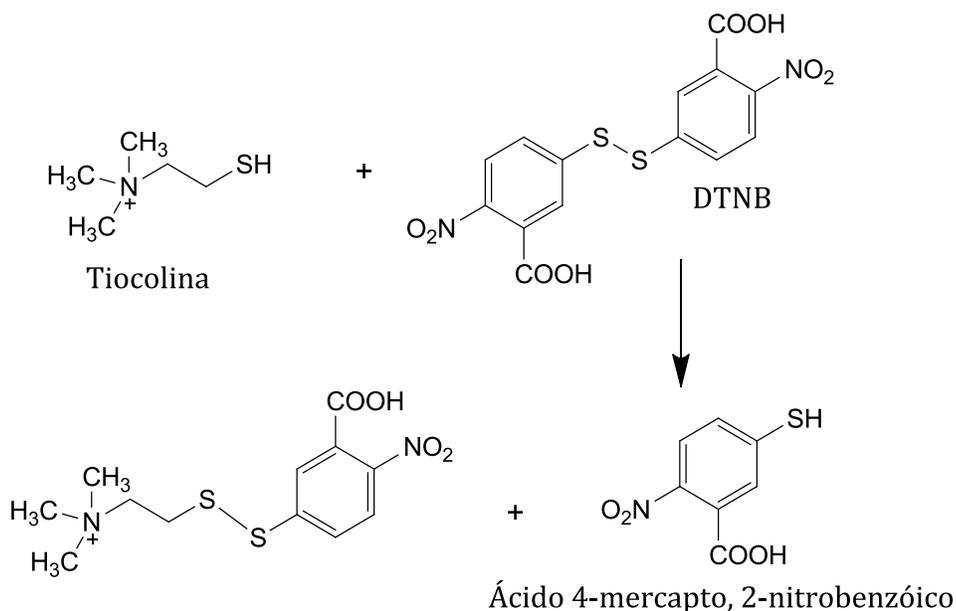


Figura 15. Reacción de Ellman, (Ellman et al., 1961).

El medio de reacción se compuso por una solución *buffer* TBE (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.3mM, NaCl 0.15 M, Tween 20 (0.05%), pH=7.8) y acetilcolinesterasa *Electrophorus electricus* (anguila eléctrica) 0.065 U/mL. La reacción fue incubada por diez minutos y posteriormente fue iniciada por la adición de 100 µL de sustrato (DTNB 0.2 mM, yoduro de acetiltiocolina 0.24 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 54.4 mM). El volumen final de cada pozo fue de 200 µL, la reacción fue monitoreada

durante diez minutos a 405 nm. La enzima y el sustrato se prepararon máximo cuatro horas antes del ensayo. Este ensayo se desarrolló en microplacas de 96 pozos, para realizar los cálculos de la actividad enzimática se tuvo en cuenta el siguiente coeficiente de extinción molar para el DTNB  $12.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 405 nm.

**3.3.2.2 Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa a partir de extracto de larvas.** Con el fin de evaluar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa presente en el *Ae. aegypti*, se usó el método descrito anteriormente con una modificación, la cual consistió en el uso de una suspensión de homogeneizado de larvas como fuente enzimática, en lugar de la enzima comercial. La suspensión se obtuvo al procesar alrededor de 700 larvas en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (*WHEATON*, Millville, NJ, EE. UU.) usando un medio que contenía sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, a un pH 7.2 y EGTA 1 mM. De la misma forma que en el ensayo anterior, el medio de reacción se compuso de *buffer* TBE, reemplazando la enzima comercial por 0.5 mg de proteína cuantificada a partir de la suspensión obtenida de las larvas procesadas. Se incubó por 10 min la reacción y posteriormente se agregó el sustrato. La cinética de reacción fue seguida por una hora a 405 nm.

### **3.3.3 Enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial**

**3.3.3.1 Aislamiento de mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti*.** Para aislar mitocondrias de larvas de mosquito se separaron y lavaron un grupo de alrededor de 1000 larvas (L3 y L4), se filtraron con gasa quirúrgica y fueron colocadas en medio de aislamiento compuesto de sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, a un pH 7.2, EGTA 1 mM y BSA 0.1 %. Posteriormente, las larvas fueron procesadas en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (*WHEATON*,

Millville, NJ, EE.UU.). La suspensión obtenida fue filtrada utilizando fibra de vidrio en una jeringa de 25 ml, seguida de una centrifugación a 300 g (gravedades) a durante cinco minutos. El sedimento fue descartado y el sobrenadante centrifugado a 10 000 g, durante diez minutos. El precipitado obtenido, se suspendió en medio de extracción y se centrifugó a 300 g durante cinco minutos. El sobrenadante obtenido fue suspendido en medio de extracción sin BSA y centrifugado a 10 000 g durante diez minutos. El precipitado resultante contenía mitocondrias intactas de larva de mosquito las cuales se suspendieron en medio de extracción sin BSA y se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Todo el proceso de extracción se realizó garantizando una temperatura de 4 °C.

**3.3.3.2 Preparación de la suspensión de mitocondrias para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales.** Las mitocondrias aisladas y almacenadas en nitrógeno fueron descongeladas y fragmentadas por choque térmico (congelamiento y descongelamiento, tres veces) y mantenidas en baño de hielo hasta la realización de las pruebas enzimáticas. Los fragmentos de membrana obtenidos fueron usados como fuente enzimática.

**3.3.3.3 Cuantificación de proteína.** Se determinó la concentración de proteínas presentes en la suspensión mitocondrial previamente fragmentada, usando el método de Bradford.(Bradford, 1976).

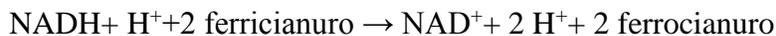
**3.3.3.4 Determinación de la actividad enzimática.** Las actividades de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria se determinaron, en un espectrofotómetro, Multiscan GO (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE.UU.) utilizando el programa SkanIt, cuarta edición, y polarográficamente en un oxígrafo (*Hansatech*, King's Lynn, Norfolk, UK) utilizando el programa Oxygraph plus 2.1.

3.3.3.4.1 *NADH oxidasa*. La actividad de la NADH oxidasa se determinó por el método de Singer (1974).(Singer, 1974) La velocidad de oxidación del NADH se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente.



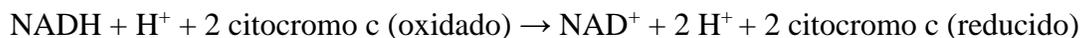
El sistema de reacción se compuso por *buffer* fosfato 80 mM (pH 7.4), EDTA 50  $\mu\text{M}$ , NADH 0.17 mM y 0.5 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28°C y la reacción inició por la adición de NADH.

3.3.3.4.2 *NADH deshidrogenasa*. La actividad de la enzima se determinó por el método espectrofotométrico de Singer (1974),(Singer, 1974) usando ferricianuro de potasio como receptor artificial de electrones en la presencia de rotenona, la reacción fue monitoreada a 420 nm.



El sistema de reacción se compuso de *buffer* fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, NADH 0.15 mM, ferricianuro de potasio 0.6 mM, rotenona 1  $\mu\text{M}$ , KCN 1 mM y 0.1 mg de proteína mitocondrial. La concentración de ferricianuro de potasio se determinó teniendo en cuenta su coeficiente de extinción redox ( $\epsilon_{\text{redox}}$ ) 1.043  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  a 420 nm.

3.3.3.4.3 *NADH citocromo c reductasa*. La actividad de esta enzima fue determinada espectrofotométricamente por el método descrito por, Somlo (1965),(Somlo, 1965) a través del monitoreo de la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm.



El sistema de reacción se compuso de *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. Todos los reactivos excepto el citocromo c, fueron incubados por 10 min a 28°C, la reacción se inició por la adición del citocromo c, siendo acompañada por lo menos durante 2 min. La concentración del citocromo c reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar redox ( $\epsilon_{\text{redox}}$ ) 19.8  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  a 550 nm.

3.3.3.4.4 *Succinato deshidrogenasa*. La actividad de la enzima succinato deshidrogenasa se determinó por el método de Singer (1974),(Singer, 1974) utilizando 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP) y fenazina metosulfato (PMS) como receptores artificiales de electrones.



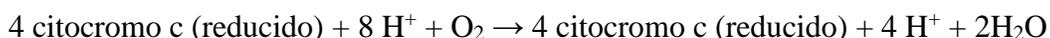
La velocidad de reducción del DCPIP fue monitoreada a 600 nm en un sistema de reacción compuesto por: *buffer* fosfato 50 mM (pH 7,4), succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM, KCN 1 mM, rotenona 1  $\mu$ M, PMS 1 mM y 0.1 mg de proteína mitocondrial. Los reactivos presentes en el sistema, excepto el PMS y el DCPIP fueron incubados por 10 min a 28°C, la reacción fue iniciada por la adición de DCPIP 60  $\mu$ M. Se tuvo en cuenta como coeficiente de extinción molar del DCPIP 16.983  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  a 600 nm.

3.3.3.4.4 *Succinato oxidasa*. La actividad de la NADH oxidasa se determinó por el método de Singer (1974).(Singer, 1974) La velocidad de oxidación del NADH se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente.



El sistema de reacción se compuso por *buffer* fosfato 80 mM (pH 7.4), succinato 10 mM y 0.5 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28 °C y la reacción se inició por la adición de succinato.

3.3.3.4.5 *Citocromo c oxidasa*. La actividad de esta enzima se determinó por el método descrito por Mason (1973),(Mason, Poyton, Wharton, & Schatz, 1973) acompañando la velocidad de oxidación del citocromo c a 550 nm, en un sistema de reacción constituido de *buffer* fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, citocromo c reducido 30 µM y 0.1 mg de proteína mitocondrial. La reacción fue iniciada por la adición de citocromo c reducido.



La concentración del citocromo c reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar redox ( $\epsilon_{\text{redox}}$ ) 19.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 550 nm.

3.3.3.4.6 *Actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas*. La actividad de la F1Fo ATPasa en mitocondrias fragmentadas fue determinada cuantificando el fosfato inorgánico resultante de la hidrólisis de ATP, según el método descrito por Pullman (1960), (Pullman, Penefsky, Datta, & Racker, 1960).



El sistema de reacción se compuso por *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), MgSO<sub>4</sub> 3 mM, fosfoenolpiruvato (PEP) 2.5 µM, 10 unidades de piruvato quinasa (1 unidad de piruvato quinasa convierte 1 µmol de PEP a piruvato por min) y 1 mg de proteína mitocondrial. Después de la adición del medio de reacción, la reacción fue incubada por 10 minutos a 28°C, pasado este tiempo, se inició la reacción con la adición de ATP 4 mM e interrumpida a los 10 min por la

adición de TCA al 5%. Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 g. El fosfato inorgánico fue cuantificado del sobrenadante siguiendo el método de Dickman, (1940), el cual consiste en determinar espectrofotométricamente la concentración de fosfato usando una curva de calibración de  $K_2HPO_4$  (Dickman & Bray, 1940).

### **3.4 Preparación y evaluación de mezclas de metabolitos secundarios**

Con base en los resultados obtenidos en la evaluación del mecanismo de acción, se prepararon 11 mezclas con los cuatro metabolitos que presentaron mayor efecto en las diferentes dianas evaluadas. Las 11 mezclas son el resultado de todas las combinaciones posibles entre los cuatro compuestos, para formar mezclas de cuatro, tres y dos metabolitos. Los compuestos fueron mezclados usando la relación 1:1 con base en las concentraciones letales 50% ( $CL_{50}$ ) usando DMSO como solvente. La evaluación de estas mezclas se realizó según su actividad larvicida, por lo que se siguió la misma metodología descrita en la sección 3.2.2.

### **3.5 Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos están representados por la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Para determinar la actividad larvicida se calcularon las concentraciones letales ( $CL_{50}$  y  $CL_{95}$ ) por medio de un análisis Probit, usando el programa Polo Plus 2.0. Para la actividad adulticida los resultados se reportaron en porcentaje de mortalidad. Los resultados de los ensayos de mecanismo de acción

son reportados en porcentaje de actividad enzimática. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA más el Test de Tukey para datos con distribución normal y el Test Kruskal-Wallis para datos con distribución no normal, usando el programa STATISTICA, versión 11.0.(Stat Soft, 2007) Este análisis de varianza se usó para determinar diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles, las cuales fueron reportadas con un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ).

### **3.6 Disposición de residuos**

Los residuos biológicos y químicos generados durante el desarrollo de este proyecto fueron manipulados de acuerdo con el Manual de Gestión Integral de Residuos-2010 del Instituto Nacional de Salud de la República de Colombia y los lineamientos del Plan de Gestión Integral de Residuos (PGIR) de la Universidad Industrial de Santander. Los metabolitos secundarios, los solventes y los colorantes empleados en este trabajo se clasificaron como residuos peligrosos. De la misma forma, se consideraron peligrosos los recipientes que hayan estado en contacto con ellos. Los residuos se dispusieron en bolsa roja y se entregaron en la ruta de recolección y almacenamiento de residuos peligrosos organizada por el PGIR en el Parque Tecnológico Guatiguará, diligenciando el formato FGA.06 para su disposición final con la empresa contratada para su neutralización e incineración.

## **4. Resultados y discusión**

#### 4.1 Análisis *in silico* y selección de metabolitos secundarios

La matriz de datos resultante del análisis por medio de las herramientas bioinformáticas *OSIRIS* y *molinspiration* se reporta en el Anexo 1. Los criterios de selección de los metabolitos secundarios para las pruebas *in vivo* e *in vitro* se tomaron con base en el análisis de componentes principales de las propiedades fisicoquímica y biológicas, así como de las menores  $CL_{50}$  relativas.

**4.1.1 Analisis de componentes principales.** El análisis CP de esta matriz extrajo la gráfica de sedimentación de las componentes, donde se aprecia la clara ruptura entre la pronunciada pendiente de las componentes más importantes y el descenso gradual de las restantes (los sedimentos) (Figura 16).

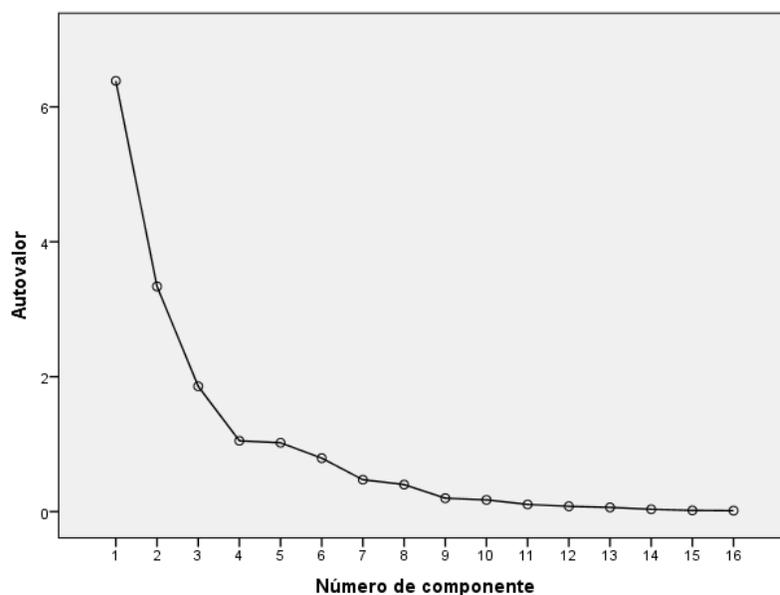


Figura 16. Gráfico de sedimentación del análisis CP, (IBM Corporation, 2010).

Además, se extrajo la varianza total explicada, en donde aparecen los valores propios o autovalores de cada componente principal (Total) y en frente se encuentra la varianza explicada para cada una de ellas (% de varianza) y la varianza explicada acumulada (% acumulado) (Tabla 5). Como se puede observar en la parte derecha de la tabla (sumas de extracción de cargas al cuadrado), se seleccionaron las primeras cinco componentes para realizar el análisis de acuerdo con el criterio de Kaiser (Kaiser, 1960). Este criterio consiste en conservar aquellos factores cuyo autovalor asociado sea mayor que 1.

Tabla 5. *Varianza total explicada, IBM SPSS Statistics, versión 19.0.*

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de extracción de cargas al cuadrado		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
1	6.384	39.903	39.903	6.384	39.903	39.903
2	3.338	20.861	60.763	3.338	20.861	60.763
3	1.858	11.612	72.375	1.858	11.612	72.375
4	1.049	6.558	78.933	1.049	6.558	78.933
5	1.020	6.375	85.308	1.020	6.375	85.308
6	0.792	4.949	90.258			
7	0.472	2.951	93.209			
8	0.401	2.504	95.712			
9	0.199	1.242	96.954			
10	0.174	1.088	98.043			
11	0.106	0.663	98.706			
12	0.079	0.491	99.197			
13	0.062	0.387	99.584			
14	0.034	0.214	99.797			
15	0.018	0.111	99.908			

16	0.015	0.092	100.000			
----	-------	-------	---------	--	--	--

Método de extracción: análisis de componentes principales.

A partir de las correlaciones de cada componente principal con cada variable podemos interpretar que, la componente 1 (CP1) tiene la mayor correlación positiva con las componentes: ligando GPCR, modulador de canal iónico, inhibidor de quinasa, ligando de receptor nuclear, inhibidor de proteinasas e inhibidor enzimático. Se puede observar que la correlación con las demás variables es casi nula y que tiene una correlación negativa con las variables: Solubilidad, *Druglikeness* y *Drug-score*. Por lo tanto, es claro que la primera componente está relacionada con la actividad biológica de los compuestos y no con las propiedades fisicoquímicas o con su toxicidad.

La segunda componente (CP2), muestra la mayor correlación positiva con las variables relacionadas con la toxicidad: Efecto mutagénico, tumorogénico y efectos en la reproducción. Además, muestra correlaciones casi nulas con el resto de las variables. La tercera componente (CP3) muestra la mayor correlación positiva con la variable solubilidad y correlaciones muy bajas o negativas con las demás variables, lo cual se interpreta como la independencia de esta variable con respecto a las demás.

Muy similar al caso anterior sucede con la cuarta componente (CP4), la cual tiene la mayor correlación positiva con la variable *Druglikeness*, cuya correlación es muy alta (cercana a 1) y muy independiente de las demás variables.

Tabla 6. *Matriz de componentes principales*<sup>a</sup>

	Componente				
	1	2	3	4	5
Peso	0,611	0,452	-0,544	0,048	0,060
LogP	0,632	-0,017	-0,463	0,010	-0,341
Solubilidad	-0,536	-0,304	0,644	-0,128	0,222
TPSA	0,133	0,387	-0,571	-0,094	0,359
Ligando GPCR	0,959	-0,169	0,099	0,056	0,041
Modulador de canal iónico	0,881	-0,231	0,368	-0,020	0,070
Inhibidor de quinasa	0,936	0,019	0,102	0,132	0,009
Ligando de receptor nuclear	0,922	-0,274	0,143	-0,019	0,050
Inhibidor de proteinasas	0,946	-0,070	0,076	-0,011	0,132
Inhibidor enzimático	0,934	-0,224	0,210	-0,032	0,101
Mutagénico	0,018	0,788	0,368	0,150	0,291
Tumorigénico	0,123	0,777	0,059	0,005	-0,164
Irritante	0,166	0,495	0,338	-0,227	-0,604
Efecto reproductivo	0,042	0,765	0,109	-0,056	0,406
Druglikeness	-0,131	0,108	0,133	0,951	-0,120
drug-score	-0,239	-0,782	-0,312	0,134	0,174

Método de extracción: análisis de componentes principales.

<sup>a</sup> 5 componentes extraídos.

Finalmente, la quinta componente (CP5), no presenta correlaciones altas y por lo tanto no se puede distinguir ningún grupo. Esto era de esperarse, ya que si se observa la gráfica de sedimentación (Figura 16) se puede apreciar como la pendiente decae abruptamente después de la cuarta componente.

Teniendo en cuenta los resultados del análisis CP, se tomaron las variables agrupadas de la primera componente como base discriminatoria para seleccionar los siete metabolitos con base en un criterio estadístico. Por lo tanto, se escogieron los metabolitos con mayores puntajes de bioactividad, asignados por el programa *Molinspiration*. La Figura 17 muestra el puntaje de bioactividad asignado por el programa para cada uno de los 33 metabolitos secundarios reportados y enumerados en el Anexo 1.

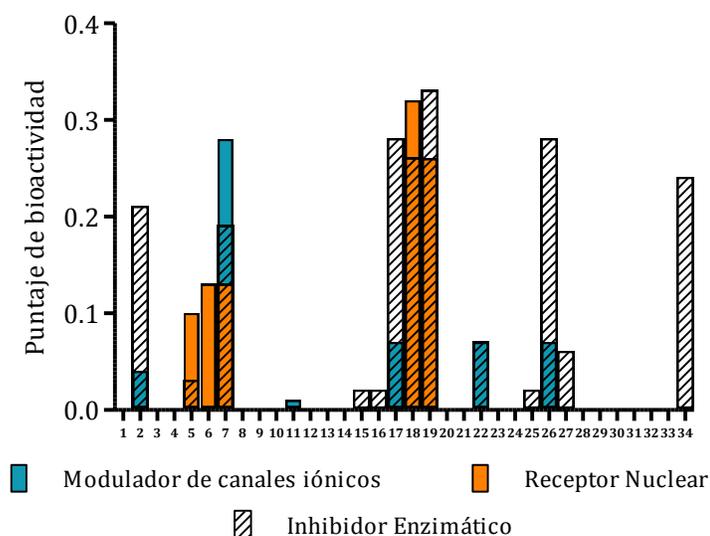


Figura 17. Puntaje de bioactividad de los metabolitos asignado por *Molinspiration*.

El número 34 corresponde al insecticida Temefos, el cual presentó un puntaje de 0.2 como inhibidor enzimático, por lo que se tomó como referencia este valor para la selección de los metabolitos secundarios. De los 33 metabolitos, 14 presentaron valores positivos<sup>1</sup> para tres diferentes dianas (Modulador de canales iónicos, receptor nuclear e inhibidor enzimático), algunos

<sup>1</sup> El programa *molinspiration* asigna los puntajes para cada compuesto. La relación de los valores se explica en esa sección 3.1.2

de ellos presentaron puntajes positivos para más de una diana. Ningún metabolito presentó puntajes positivos para ligando GPCR, inhibidor de quinasa o inhibidor de proteinasas (Figura

Según el análisis virtual, seis metabolitos presentaron valores superiores a 0.2, estos fueron los compuestos 2,7,17,18,19 y 26, los cuales corresponden a los metabolitos: acetato de geranilo,  $\beta$ -cariofileno, geraniol, germacreno D,  $\alpha$ -humuleno y nerol respectivamente. Todos los seis metabolitos presentaron puntajes positivos para más de una diana. De estos metabolitos seleccionados, uno de ellos (Germacreno D) no se encontró disponible comercialmente. Los cinco disponibles comercialmente fueron adquiridos de Sigma Aldrich, con pureza de grado analítico para las pruebas bioquímicas.

**4.1.2 Cálculo del CL<sub>50</sub> relativo.** Los valores de CL<sub>50</sub> relativo para cada uno de los metabolitos, se reportan en el Anexo 2. Con base en estos valores se escogieron cinco compuestos:  $\beta$ -bourboneno,  $\beta$ -cariofileno, 1,8-cineol, *trans*- $\beta$ -ocimeno y n-octanol los cuales están resaltados en el Anexo 2. El compuesto  $\beta$ -bourboneno no se encontró disponible comercialmente, mientras que el *trans*- $\beta$ -ocimeno se encontró sólo en mezcla con su isómero *cis*. Por otra parte, el  $\beta$ -cariofileno fue seleccionado previamente por el análisis de CP. Por lo tanto, sólo los compuestos 1,8-cineol y n-octanol fueron seleccionados por el cálculo del CL<sub>50</sub> relativo para ser evaluados.

En total se seleccionaron siete metabolitos, los cuales fueron evaluados *in vivo* para determinar su actividad larvicida. Los metabolitos seleccionados fueron: Acetato de geranilo, geraniol,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno, geraniol, nerol, n-octanol y 1,8-cineol (Figura 18). A continuación, se muestran los resultados de actividad larvicida.

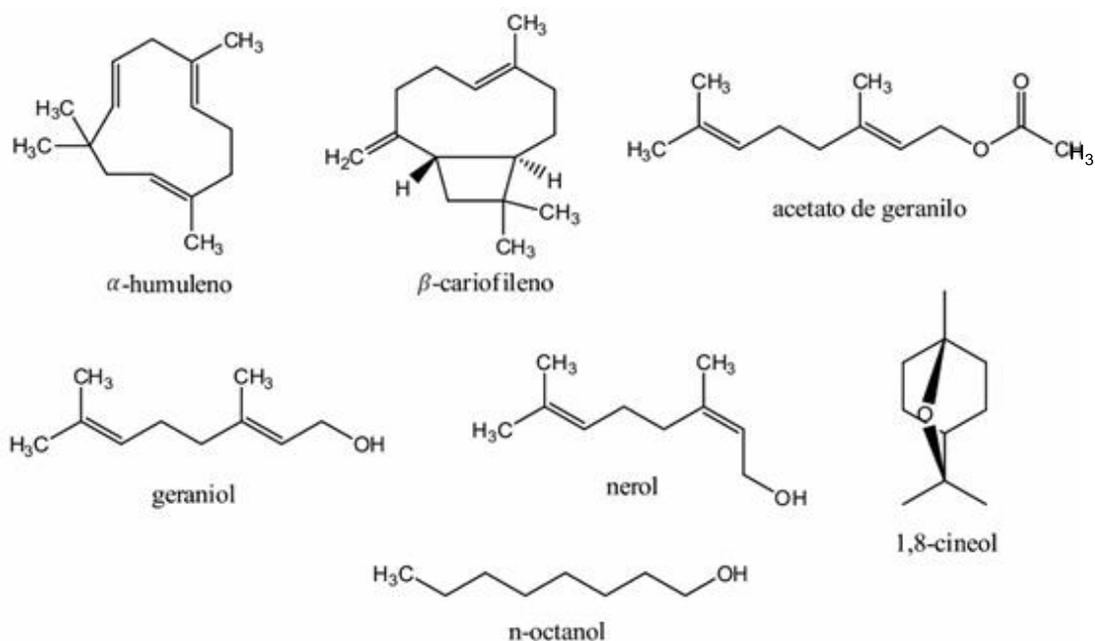


Figura 18. Estructura molecular de los metabolitos seleccionados por el análisis *in silico*.

#### 4.2 Evaluación de la actividad larvicida

Al evaluar los compuestos sobre larvas de *Ae. aegypti*, se observó que seis de los siete compuestos presentaron actividad larvicida con  $CL_{50}$  inferiores a 100 mg/L (Tabla 7). Las concentraciones  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  de cada metabolito son reportadas en la Tabla 7, con sus respectivos intervalos de confianza determinados por el análisis probit y los valores de  $\chi^2$  para 24 y 48 h. Según estos resultados, el  $\alpha$ -humuleno presentó la mayor actividad larvicida a las 24 h con  $CL_{50}$  de 41.35 mg/L, seguido del acetato de geranilo y  $\beta$ -cariofileno con  $CL_{50}$  de 44.19 y 48.45 mg/L, respectivamente. Los compuestos geraniol, n-octanol y nerol presentaron valores de  $CL_{50}$  superiores a 80 mg/L. Por otra parte, a las 48h el  $\beta$ -cariofileno presentó la menor concentración  $CL_{50}$  (29.28 mg/L), seguido por el  $\alpha$ -humuleno (30.89 mg/L).

Tabla 7. *Actividad larvicida de metabolitos secundarios contra Ae. aegypti*

Metabolito	24 h			48h		
	CL <sub>50</sub> mg/L	CL <sub>95</sub> mg/L	$\chi^2$	CL <sub>50</sub> mg/L	CL <sub>95</sub> mg/L	$\chi^2$
Acetato de geranilo	44.19 (42.59-46.06)	63.88 (59.7-70.60)	1.569	39.81 (38.45-41.18)	55.31 (52.77-58-53)	1.821
$\alpha$ -humuleno	41.35 (38.43-44.43)	69.59 (63.25-78.55)	0.098	30.89 (28.09-34.10)	73.98 (62.00-95.33)	3.615
$\beta$ -cariofileno	48.45 (44.92-52.20)	111.82 (98.95-130.62)	5.522	29.28 (26.11-32.40)	78.26 (66.99-96.75)	4.682
Geraniol	83.80 (81.32-86.27)	123.39 (116.54-133.21)	1.831	77.99 (75.17-80.53)	116.3 (110.3-125.1)	2.730
Nerol	86.93 (82.99-90.95)	144.07 (133.19-159.78)	2.134	50.00 (45.07-55.33)	134.2 (112.2-172.8)	2.500
n-octanol	98.03 (90.02-110.2)	291.47 (220.69-464.62)	3.907	98.21 (87.99-115.7)	297.0 (217.1-501.4)	0.1440
1,8-cineol	182.9 (171.9-196.2)	315.95 (278.82-380.48)	9.000x10 <sup>-3</sup>	175.1 (166.6-184.1)	309.3 (279.2-357.1)	1.512

El nerol aumentó su efecto larvicida a las 48 h, reduciendo su CL<sub>50</sub> un 43%. Los compuestos  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno también presentaron disminución en su CL<sub>50</sub> a las 48 h (25% y 40% respectivamente). El metabolito 1,8-cineol, fue el único compuesto que presentó una concentración CL<sub>50</sub> a las 24 h mayor que 100 mg/L (182.88 mg/L).

Debido a que la OMS no ha establecido un criterio estándar para determinar el potencial de la actividad larvicida, varios autores desarrollan su propio criterio, Cheng, et al. (2003), Kiran et al. (2006) y Dias, C. & Moraes, D. (2014), consideran que un compuesto tiene actividad larvicida cuando su CL<sub>50</sub> es menor que 100 mg/L. (Cheng, Chang, Chang, Tsai, & Chen, 2003; Dias & Moraes, 2014; Ravi Kiran, Bhavani, Sita Devi, Rajeswara Rao, & Janardhan Reddy, 2006) Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se implementó esta clasificación, por lo que se consideró que el metabolito 1,8-cineol no presentó actividad larvicida contra *Ae. aegypti*. Este resultado concuerda con el trabajo de Oliveira, G. y colaboradores (2013) (Oliveira et al., 2013), en donde se reporta que este compuesto no presenta actividad larvicida contra *Ae. aegypti*. Cabe

resaltar que, en este mismo trabajo se reportó que el compuesto presenta efecto repelente contra el mosquito.

Los seis compuestos que presentaron actividad larvicida ( $CL_{50} < 100$  mg/L) fueron evaluados sobre tres dianas farmacológicas, usando las concentraciones  $CL_{50}$  (Tabla 8). Los resultados del estudio del mecanismo de acción se muestran a continuación.

Tabla 8.  $CL_{50}$  de los metabolitos que mostraron actividad larvicida contra *Ae. aegypti* expresados en mg/L y molaridad.

Metabolito	$CL_{50}$ [mg/L]	$CL_{50}$ [mM]
Acetato de geranilo	44.19	0.22
$\alpha$ -humuleno	41.35	0.20
$\beta$ -cariofileno	48.45	0.24
Geraniol	83.80	0.55
Nerol	86.93	0.56
n-octanol	98.03	0.75

#### 4.3 Estudio del mecanismo de acción

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los ensayos sobre ADN aislado de larva de *Ae. aegypti*, acetilcolinesterasa y los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

**4.3.1 Efecto sobre ADN de *Ae. aegypti*.** Con el fin de estudiar el efecto nocivo que presentan los metabolitos con actividad larvicida sobre el ADN de *Ae. aegypti*, se desarrollaron tres tipos de ensayos, para determinar efectos directos e indirectos sobre el ADN. a continuación, se muestran los resultados de las electroforesis.

**4.3.1.1 Larvas tratadas durante 24 h y 48 h.** Los resultados de este ensayo muestran que no se presentó degradación o fragmentación del ADN por causa del tratamiento con los metabolitos a las 24 y 48 h (Figura 19-20). En las imágenes de electroforesis se puede observar que el ADN permaneció intacto en todos los pozos, siempre sobre la banda de 10 000 bp. Lo anterior indica que los metabolitos no están generando daño indirecto sobre el ADN de larvas de *Ae. aegypti*, lo que implica que, los mecanismos de acción relacionados con el efecto larvicida no involucran dianas importantes en los procesos de transcripción, traducción y replicación del ADN.

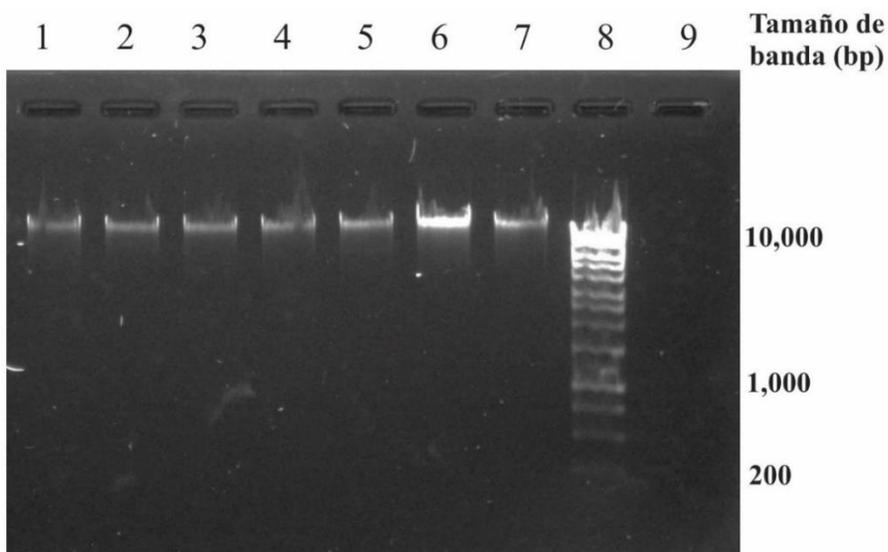


Figura 19. Electroforesis de ADN aislado de larvas de *Aedes aegypti* tratadas durante 24 h con metabolitos. 1) acetato de geranilo, 2)  $\alpha$ -humuleno, 3)  $\beta$ -cariofileno, 4) geraniol, 5) nerol, 6) n-octanol, 7) control (ADN sin tratar), 8) marcador de peso molecular y 9) *buffer* de carga.

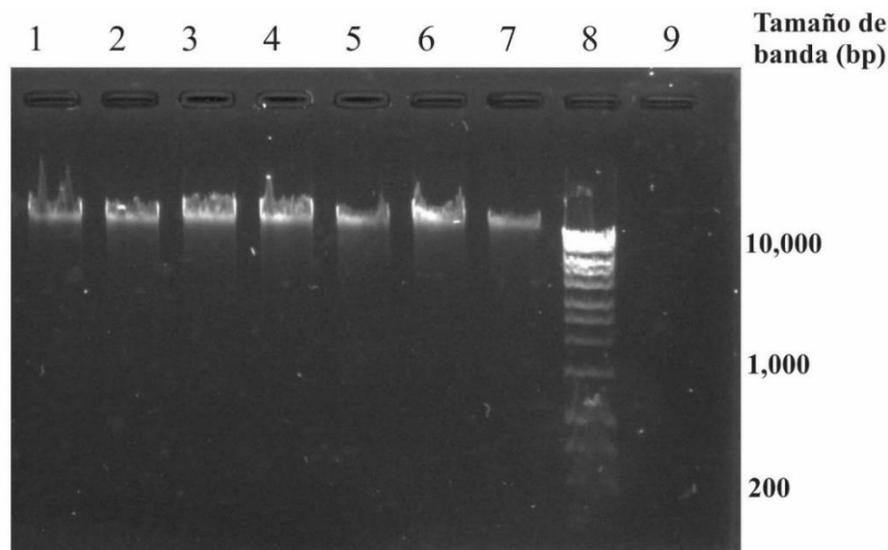


Figura 20. Electroforesis de ADN aislado de larvas de *Aedes aegypti* tratadas durante 48 h con metabolitos. 1) acetato de geranilo, 2)  $\alpha$ -humuleno, 3)  $\beta$ -cariofileno, 4) geraniol, 5) nerol, 6) n-octanol, 7) control (ADN sin tratar), 8) marcador de peso molecular y 9) *buffer* de carga.

**4.3.1.2 Tratamiento sobre el homogeneizado de larvas.** Según los resultados de electroforesis, los metabolitos secundarios con actividad larvicida no presentaron ningún efecto sobre el ADN, cuando el tratamiento se realizó durante su aislamiento, específicamente después de la etapa de homogeneización. En la imagen de electroforesis, Figura 21, se observa que el ADN permanece intacto en todos los pozos y no hay señales de degradación o fragmentación. Todos los tratamientos (pozos 11-6) se muestran iguales al control (pozo 8).

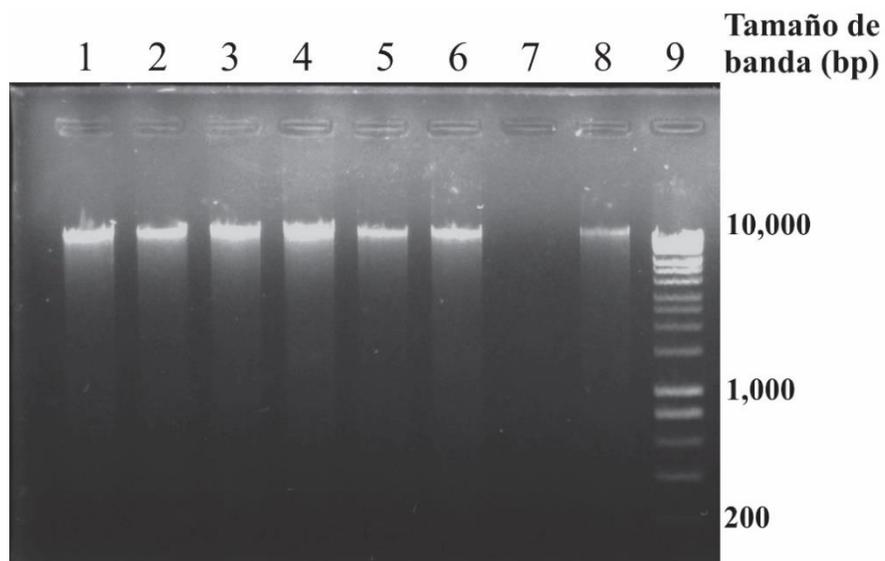


Figura 21. Electroforesis de ADN aislado de larvas de *Ae. aegypti* tratado durante el proceso de homogenización con los metabolitos. 1) acetato de geranilo, 2)  $\alpha$ -humuleno, 3)  $\beta$ -cariofileno, 4) geraniol, 5) nerol, 6) n-octanol, 7) *buffer* de carga, 8) control (ADN sin tratar) y 9) marcador de peso molecular.

#### 4.3.1.3 Efecto directo sobre el ADN aislado

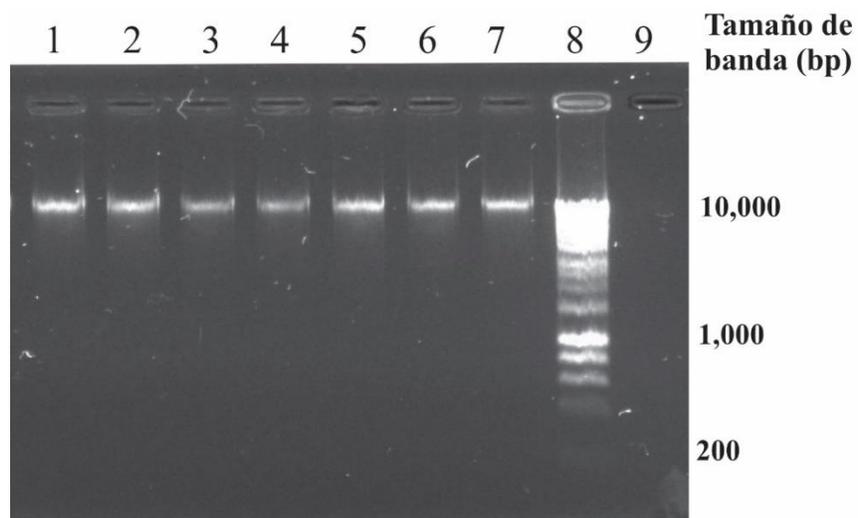


Figura 22. Electroforesis de ADN aislado de larvas de *Ae. aegypti* y tratado directamente. 1) acetato de geranilo, 2)  $\alpha$ -humuleno, 3)  $\beta$ -cariofileno, 4) geraniol, 5) nerol, 6) n-octanol, 7) control (ADN sin tratar), 8) marcador de peso molecular y 9) *buffer* de carga.

Los metabolitos evaluados no mostraron ningún efecto directo sobre el ADN aislado según el resultado del ensayo de electroforesis (Figura 22). En todos los pozos se pueden observar que el ADN está intacto, sin indicios de degradación o fragmentación.

Según los resultados presentados, los metabolitos no generaron ningún efecto visible de daño directo o indirecto sobre el ADN (Figuras 19-22). Esto indica que los metabolitos no son agentes genotóxicos y por lo tanto no presentan riesgo de dañar el ADN. Esta relación podría llevarse al ADN de animales superiores y humanos. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para evaluar completamente su toxicidad, este ensayo representaría un estudio preliminar.

#### **4.3.2 Efecto sobre acetilcolinesterasa**

**4.3.2.1 Acetilcolinesterasa comercial.** Inicialmente se evaluó el efecto de los seis metabolitos sobre la enzima acetilcolinesterasa comercial (E.C. 3.1.1.7, aislada de *Electrophorus electricus*). Los resultados muestran que todos los metabolitos secundarios disminuyeron la actividad de la enzima, lo cual se interpreta como una inhibición generada por los metabolitos sobre la misma (Figura 23). Los compuestos  $\beta$ -cariofileno, geraniol, nerol y n-octanol mostraron inhibiciones mayores al 50%, mientras que el acetato de geranilo y  $\alpha$ -humuleno inhibieron 37 y 40% la actividad enzimática respectivamente ( $p < .0001$ ,  $F = 1515.00$ ).

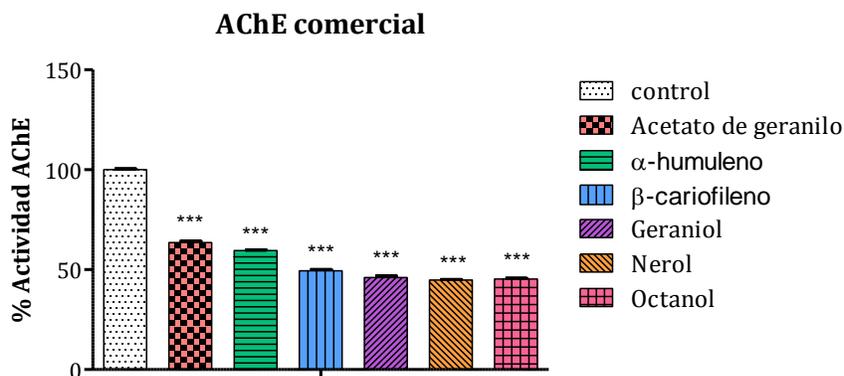


Figura 23. Efecto de metabolitos secundarios sobre la actividad de AChE comercial. El 100% del control corresponde a  $0.1319 \pm 0.001714 \mu\text{mol DTNB}/\text{min. U enzima}$ . \*\*\* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < .001$ ).

Se debe tener en cuenta que los compuestos geraniol, nerol y n-octanol presentan los  $CL_{50}$  más altos (superiores a 0.55 mM) e inhibieron el 50% de la actividad enzimática, mientras que el acetato de geranilo y el  $\alpha$ -humuleno inhibieron cerca del 40% a una concentración mucho menor (0.22 y 0.20 mM, respectivamente).

Para poder analizar estos resultados, es necesario compararlos con insecticidas comerciales inhibidores de la acetilcolinesterasa como, por ejemplo, el malatión, el cual se había mencionado anteriormente como uno de los insecticidas organofosforados más conocidos por su efecto sobre la AChE (sección 1.4.1.1). La actividad inhibitoria del malatión sobre esta enzima se ha reportado previamente:  $IC_{50} = 0.37 \pm 0.20 \text{ mM}$  (Krstic et al., 2008). Al comparar los resultados de los metabolitos con la actividad inhibitoria reportada para el malatión podemos observar que el acetato de geranilo, el  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno presentaron una actividad superior, ya que estos compuestos inhibieron la enzima alrededor del 40, 45 y 50% respectivamente a concentraciones menores que 0.24 mM.

Por otra parte, se han reportado un gran número de metabolitos secundarios de plantas que inhiben la enzima AChE, en su mayoría alcaloides tales como la galantamina y la fisostigmina (concentración inhibitoria media,  $IC_{50}=1.08$  y  $6.00 \times 10^{-4} \mu M$ , respectivamente)(P. K. Mukherjee, Kumar, Mal, & Houghton, 2007). Algunos terpenos como el carvacrol, timol,  $\alpha$ -terpineno,  $p$ -cimeno,  $\gamma$ -terpineno, (+)-limoneno y (-)-limoneno también presentan actividad inhibitoria sobre esta diana con concentraciones inhibitorias medias de 0.42 y 5.0 mM, para el carvacrol y timol respectivamente y concentraciones  $IC_{50}$  menores que 2 mM para los últimos cinco metabolitos (Jukic, Politeo, Maksimovic, Milos, & Milos, 2007; Miyazawa, Watanabe, & Kameoka, 1997). En general, los alcaloides presentan concentraciones inhibitorias medias más bajas que los terpenoides, sin embargo, el tiempo de efecto sobre la enzima es muy corto. Esto se debe a que la interacción entre la molécula y la enzima ocurre en el sitio aniónico ocasionando una inhibición reversible, por lo que compuestos como la galantamina y la fisostigmina son usados generalmente en el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer (P. K. Mukherjee et al., 2007). A diferencia de los compuestos alcalinos, los terpenoides interactúan usualmente con el sitio hidrofóbico, así como muchos insecticidas organofosforados y carbamatos (Ryan & Byrne, 1988).

**4.3.2.2 Acetilcolinesterasa de homogeneizado de larvas de *Ae. aegypti*.** Al igual que en el ensayo con la enzima comercial, en este ensayo el acetato de geraniol mostró una inhibición del 33% en la actividad enzimática (Figura 24). El geraniol y el nerol exhibieron una menor inhibición (26 y 19%, respectivamente), mientras que en el ensayo con la enzima comercial lograron inhibir el 50% de la actividad enzimática. Los metabolitos  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno y  $n$ -octanol no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0.0001$   $F=19.87$ ).

En este ensayo se evaluó la inhibición de la enzima en presencia de todas las proteínas, enzimas y demás moléculas y macromoléculas presentes en un homogeneizado de larvas. Este ensayo se desarrolló con dos objetivos: 1- para observar el efecto sobre la enzima propiamente del *Ae. aegypti* ya que la enzima comercial es aislada de un organismo muy diferente (anguila eléctrica) y aunque son proteínas homólogas, estas difieren aproximadamente en un 60% en su estructura primaria,(UniProt Consortium, 2017) y 2- para poder observar el efecto indirecto sobre la actividad de la enzima, es decir, el efecto sobre la enzima cuando la biodisponibilidad del metabolito es menor, ya que este podría interactuar con diferentes dianas dentro de una gran cantidad de biomoléculas presentes en el homogeneizado.

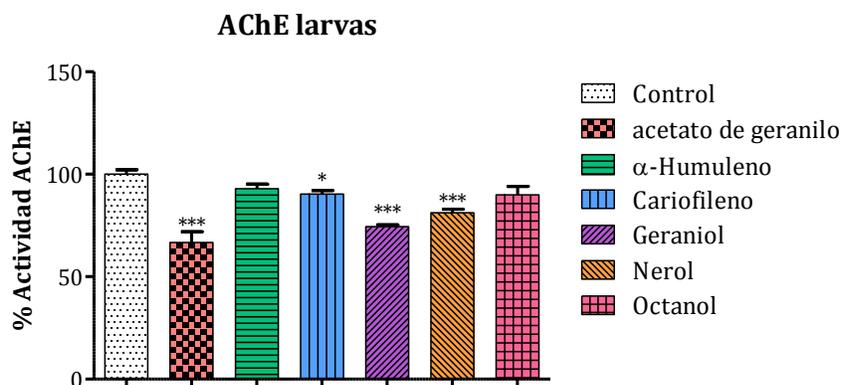


Figura 24. Efecto de metabolitos secundarios sobre la actividad de AChE de homogeneizado de larvas. El 100% del control corresponde a  $2.035 \pm 0.7765$  nmol DTNB/min. mg de proteína total. \*\*\* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < .001$ ).

De esta forma, se puede observar que el acetato de geraniol presentó una inhibición similar a la que mostró sobre la AChE comercial, a pesar de que su biodisponibilidad es menor en este ensayo (Chan, Lowes, & Hirst, 2004). Esto podría deberse a que este compuesto tiene mayor afinidad con la enzima de *Ae. aegypti* que con la de *E. electricus* y aunque la biodisponibilidad

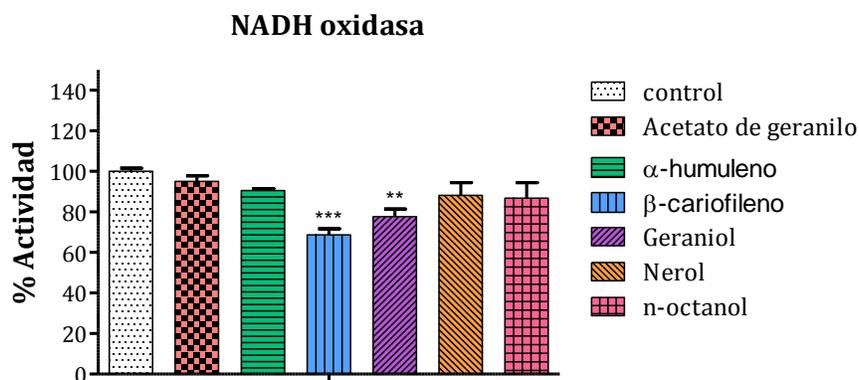
es menor, sigue mostrando un efecto inhibitorio marcado. Además, el  $\beta$ -cariofileno, geraniol y el nerol mostraron también inhibición (10, 26 y 19%, respectivamente), pero en este caso, se redujo considerablemente la actividad en comparación con la enzima aislada, lo cual puede ser consecuencia de la baja biodisponibilidad. Por otra parte, los compuestos  $\alpha$ -humuleno y n-octanol no mostraron ninguna inhibición. No podemos asegurar que estos compuestos no inhiben la enzima proveniente del mosquito, porque no se está realizando el ensayo sobre la enzima aislada y purificada (Aszalos, 1978), sin embargo, es posible que los metabolitos tengan menos afinidad con la enzima AChE de *Ae. aegypti* que con la de *E. electricus*. Otra posible explicación, es que estos tres metabolitos presenten mayor afinidad por otra diana presente en el homogeneizado, en este caso su biodisponibilidad se reduciría hasta tal punto que no pudiera causar un efecto observable sobre la enzima AChE.

Por otra parte, es importante mencionar que los tres metabolitos que causaron mayor inhibición en este ensayo: acetato de geranilo, geraniol y nerol, son estructuralmente muy similares. El nerol y el geraniol son isómeros *cis-trans*, y el geraniol sólo difiere del acetato de geranilo en el grupo hidroxilo que se ubica en el lugar del acetato. Es probable que el acetato de geranilo al tener un carbonilo en su estructura pueda interactuar con el grupo hidroxil de la serina presente en la triada catalítica, mientras la cadena carbonada interactúa con el sitio hidrofóbico adyacente, muy parecido al mecanismo de los organofosforados y carbamatos (Ryan & Byrne, 1988). Sin embargo, se necesitaría de un análisis por *docking* para corroborar la forma en que estos compuestos interactúan con la enzima.

**4.3.3 Efecto sobre las enzimas de la cadena respiratoria.** En primer lugar, se evaluaron los metabolitos secundarios sobre el complejo I (NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa), en el

ensayo de la NADH oxidasa se evalúa el paso de los electrones provenientes del NADH a través del complejo I pasando por los complejos III y IV hasta llegar finalmente al oxígeno molecular presente en el medio. En el ensayo donde se evaluó la actividad del complejo I individualmente (NADH deshidrogenasa), los electrones provenientes del NADH pasan a través del complejo I vía FMN hacia los centros Fe-S y de ahí hacia el receptor electrónico ferricianuro debido a que la región N2 se bloquea con rotenona e impiden que los electrones lleguen a la ubiquinona (Esposti, 1998). En este ensayo se monitorea la reducción del ferricianuro a ferrocianuro (Singer & Ramsay, 1994).

Los resultados del efecto sobre la actividad de estas dos enzimas se muestran que dos de los seis compuestos disminuyeron la actividad enzimática de NADH oxidasa ( $\beta$ -cariofileno y geraniol) (Figuras 25 y 26), lo que indica que están generando un bloqueo del paso de electrones o inhibición sobre alguno de los complejos I, III o IV. El  $\beta$ -cariofileno inhibió en mayor porcentaje la actividad enzimática (31%), mientras que el geraniol inhibió el 20% ( $p < .0001$ ,  $F = 9.91$ ).



**Figura 25.** Actividad de la NADH oxidasa. El 100% del control corresponde a  $68.89 \pm 10.98$  nmol  $O_2$ /min.mg proteína. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con respecto al control. \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ .

Por otro lado, todos los compuestos excepto el n-octanol inhibieron la enzima NADH deshidrogenasa (17-27%), donde el  $\beta$ -cariofileno y el geraniol presentaron un efecto más pronunciado (27%), lo que concuerda con los resultados de NADH oxidasa donde sólo estos dos compuestos mostraron reducción de la actividad en 31 y 20%, respectivamente (Figura 26). Los compuestos acetato de geraniol,  $\alpha$ -humuleno y nerol también causaron una disminución de la actividad de la NADH deshidrogenasa, pero con un efecto menos pronunciado (17, 16 y 16%, respectivamente) ( $p < .0001$ ,  $F = 12.17$ ).

El complejo I ha sido diana de numerosos compuestos insecticidas de origen sintético y natural. Algunos autores los clasifican en tres grupos según el sitio de unión en la enzima, tipo A (antagonistas de la quinona), tipo B (antagonistas de la semiquinona) y tipo C (antagonistas del quinol) (Degli Esposti, 1998). Sin embargo, debido a que las estructuras de los compuestos inhibidores de este complejo son tan variadas, es muy difícil clasificar un nuevo inhibidor en estas categorías. Por otra parte, hay otros autores que clasifican estos compuestos en dos grupos, uno representado por la rotenona y otro por la piericidina A (Lümmen, 1998). De la misma forma, los compuestos que pertenecen a estas dos categorías difieren mucho en su estructura. Por esto, no es posible relacionar las estructuras de los compuestos  $\beta$ -cariofileno y geraniol con la actividad que mostraron sobre el complejo I.

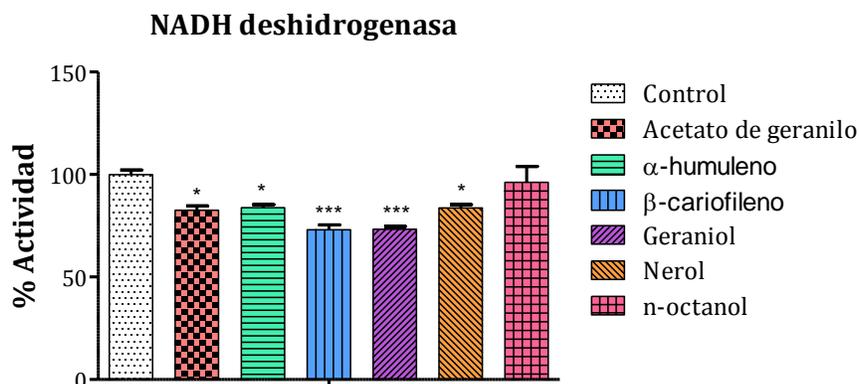


Figura 26. Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de NADH deshidrogenasa. El 100% del control corresponde a  $1.661 \pm 0.1558 \mu\text{mol}$  ferricianuro de potasio/min.mg proteína. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con respecto al control. \*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ .

Por otra parte, el efecto de los metabolitos sobre las enzimas succinato oxidasa y succinato deshidrogenasa (complejo II), se muestran en las Figuras 27 y 28, respectivamente. Al igual que en la NADH oxidasa, en succinato oxidasa se evaluó el paso de electrones provenientes del succinato que pasan a través del complejo II hacia el complejo III y IV, y finalmente hacia el oxígeno. Mientras que la actividad de succinato deshidrogenasa muestra el paso de electrones desde el succinato hacia el complejo II vía FAD pasando por varios centros Fe-S hacia el receptor de electrones DCPIP.(Singer, 1974) La actividad de succinato oxidasa disminuyó significativamente en los tratamientos con acetato de geranilo, α-humuleno, β-cariofileno y geraniol en 27, 32, 48 y 41%, respectivamente (Figura 27). Además, el nerol también logró disminuir un 16% la actividad ( $p < 0.0001$ ,  $F = 35.93$ ). Hay que destacar que los compuestos β-cariofileno y geraniol también disminuyeron la actividad de NADH oxidasa, sin embargo, el efecto sobre succinato oxidasa fue más pronunciado.

El efecto de los compuestos sobre la actividad de succinato deshidrogenasa se muestra en la Figura 28. Todos los metabolitos inhibieron la enzima excepto el acetato de geranilo. Esto indica que este metabolito debe estar causando inhibición en el complejo III o IV y por esto la actividad en succinato oxidasa se ve disminuida sin presentar efecto directo sobre el complejo II. Los demás metabolitos inhibieron marcadamente la enzima con porcentajes de inhibición entre 30 y 40%, siendo el nerol el compuesto que presentó mayor inhibición sobre la enzima (41%) ( $p < .0001$ ,  $F=23.11$ ). Estos resultados concuerdan con lo observado en succinato oxidasa, ya que todos los metabolitos con excepción del n-octanol, inhibieron la enzima y el efecto fue más pronunciado que en el caso de la NADH oxidasa.

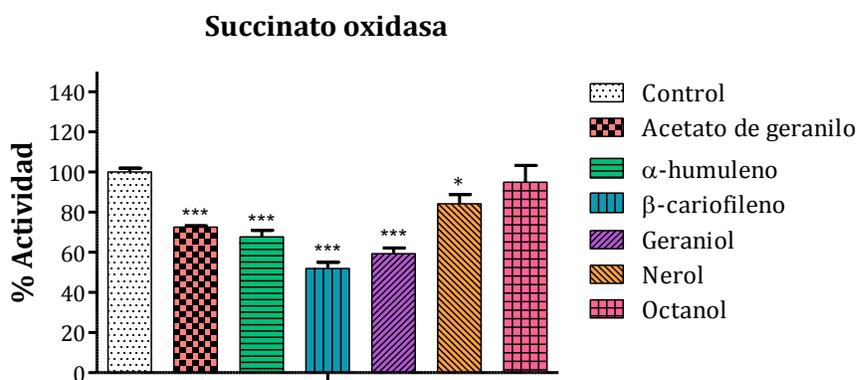


Figura 27. Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de succinato oxidasa. El 100% del control corresponde a  $65.17 \pm 14.47$  nmol  $O_2$ /min.mg proteína. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con respecto al control. \*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ .

La disminución de la actividad de succinato deshidrogenasa generada por n-octanol debería provocar una disminución de la actividad de succinato oxidasa, sin embargo, no se observa ninguna alteración sobre esta enzima. Lo anterior podría estar relacionado con un aumento de la

actividad de la enzima succinato-citocromo c reductasa o del complejo IV, lo que compensaría la inhibición causada sobre el complejo II.

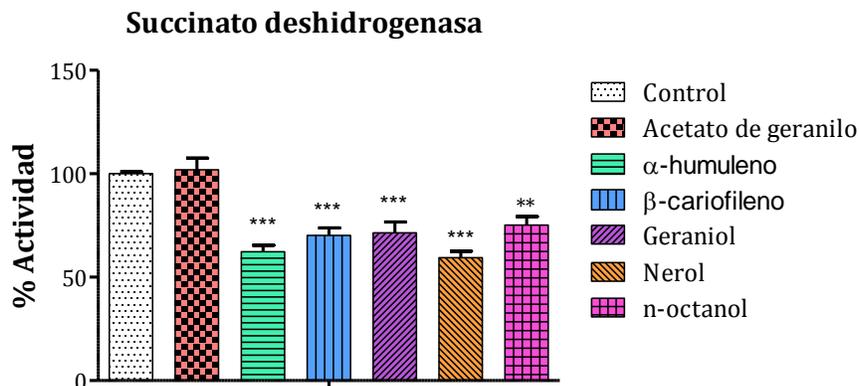


Figura 28. Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de succinato deshidrogenasa. El 100% del control corresponde a  $4.064 \pm 0.01133$  pmol DCPIP/min.mg proteína. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con respecto al control. \*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ .

Según estos resultados, el complejo II mostró ser muy sensible a la mayoría de los compuestos evaluados. A diferencia de los inhibidores del complejo I, no hay muchos inhibidores del complejo II reportados. Algunos compuestos estructuralmente parecidos a la ubiquinona como atpeninas o la harzianopiridona han mostrado alta afinidad por esta enzima (Miyadera et al., 2003). Por otra parte, otros inhibidores como el TTFA o la carboxina no presentan similitudes estructurales con la ubiquinona y tampoco entre sí (F. Sun et al., 2005).

Para evaluar el complejo III se realizó el ensayo de NADH-citocromo c reductasa, en donde se observó el paso de los electrones provenientes del NADH a través del complejo I hasta el citocromo c, pasando por el complejo III. En este caso se monitorea la reducción del citocromo c, bloqueando el complejo IV con cianuro (Singer, 1974). Debido a que los metabolitos inhibieron

marcadamente el complejo II, no se evaluó el paso del complejo II al III. Los resultados muestran que la enzima NADH citocromo c reductasa fue inhibida por los compuestos  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno, geraniol y levemente por el n-octanol en 35%, 36%, 27% y 16%, respectivamente ( $p < .0001$ ,  $F = 11.45$ ) (Figura 29).

De los seis metabolitos,  $\beta$ -cariofileno y geraniol presentaron el porcentaje de inhibición más alto sobre el complejo I. Esto concuerda con la marcada inhibición que se observó sobre el complejo III por parte de estos dos metabolitos. Hay que resaltar que el geraniol inhibió las enzimas NADH deshidrogenasa y NADH-citocromo c reductasa en la misma proporción (27%) y que  $\beta$ -cariofileno inhibió 11% más el complejo III que el complejo I. Es claro que el efecto del geraniol sobre el complejo III se debe a la inhibición de la NADH deshidrogenasa, igualmente podemos plantear esta hipótesis para  $\beta$ -cariofileno ya que los porcentajes de inhibición fueron similares.

Por otra parte, el  $\alpha$ -humuleno presentó una leve inhibición del complejo I (17%) y una inhibición pronunciada del complejo III (35%), presentando diferencias estadísticamente significativas entre estos dos porcentajes ( $p = 0.03$ ). Esto sugiere que este compuesto presenta inhibición sobre el complejo III y ésta es independiente de su efecto sobre el complejo I. Sin embargo, la actividad de NADH oxidasa no se vio alterada por este compuesto, lo que indicaría que se está compensando la inhibición del complejo III, probablemente en el complejo IV.

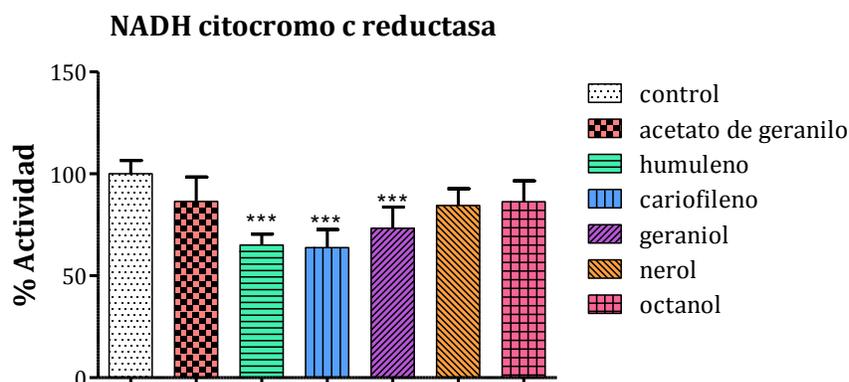


Figura 29. Efecto de los metabolitos secundarios sobre NADH citocromo c reductasa. El 100% del control corresponde a  $0.06532 \pm 0.02004$   $\mu\text{mol}$  citocromo c reducido/min.mg proteína. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con respecto al control. \*\*\*,  $p < .001$ .

A pesar de que los compuestos acetato de geranilo y nerol presentaron inhibición sobre el complejo I, al comparar estos porcentajes de inhibición con los del complejo III no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.99$  y  $p = 1.00$ ). Lo anterior indica que el efecto de estos metabolitos sobre el complejo I no fue lo suficientemente pronunciado como para observar un cambio visible en la actividad del complejo III. El n-octanol al igual que en el complejo I, no presentó efecto inhibitorio sobre el complejo III.

Los dos compuestos que presentaron mayor actividad sobre el complejo III,  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno, son isómeros estructurales. Mientras que el  $\beta$ -cariofileno presenta dos anillos, uno de nueve miembros y un ciclobutano, el  $\alpha$ -humuleno se caracterizan por tener un monociclo de 11 carbonos. Es posible que estas estructuras cíclicas estén relacionadas con la actividad, lo cual tendría cierta relación con la antimicina A, la cual contiene un anillo de nueve miembros en su estructura y actúa sobre el sitio  $Q_N$  del complejo III. Sin embargo, se necesitan ensayos más específicos para determinar el sitio de unión de estas moléculas (Gao et al., 2003).

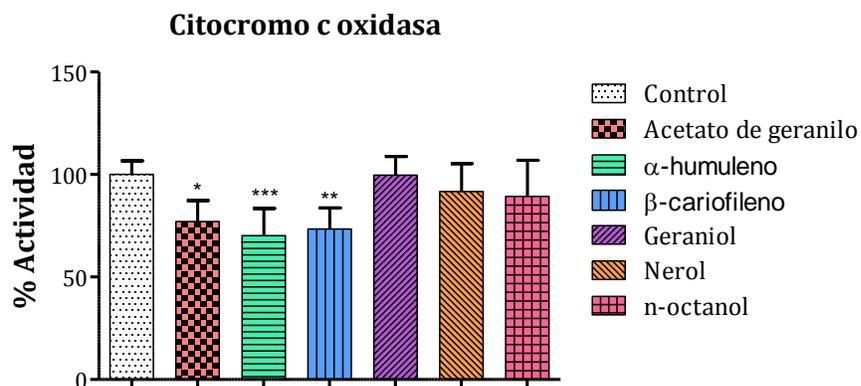


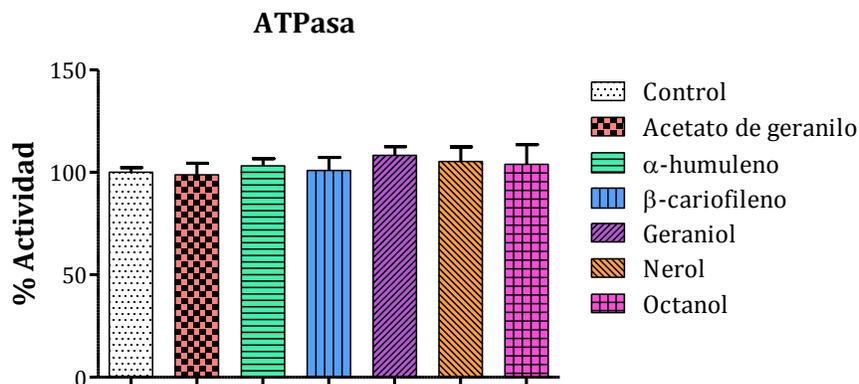
Figura 30. Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de citocromo c oxidasa. El 100% del control corresponde a  $7.455 \pm 2.561$  nmol citocromo c reducido/min.mg proteína. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con respecto al control. \*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ ; \*\*\*,  $p < .001$ .

El complejo IV fue evaluado monitoreando la oxidación del citocromo c. Los compuestos  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno inhibieron de forma muy marcada la enzima (30 y 27%, respectivamente). El acetato de geranilo también causó una inhibición significativa (23%) lo cual concuerda con el resultado sobre succinato oxidasa ya que esta fue inhibida un 27% y el compuesto no presentó efecto inhibitorio sobre los complejos II y III. El  $\alpha$ -humuleno presentó actividad inhibitoria pronunciada sobre los complejos II, III y IV, lo que concuerda con lo observado sobre succinato oxidasa, en donde el compuesto inhibió marcadamente la enzima (32%) ( $p < .0001$ ,  $F = 6.75$ ) (Figura 30).

De nuevo los isómeros  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno muestran la mayor inhibición sobre la misma enzima, posiblemente exista una relación entre las estructuras cíclicas de estos metabolitos con la actividad mostrada sobre el complejo IV.

Para finalizar las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, a continuación, se muestra el efecto de los metabolitos secundarios sobre el complejo V o ATPasa (Figura 31). Como se puede observar, ningún compuesto presentó efecto inhibitorio sobre el complejo ( $p=0.29$ ,  $F=1.33$ ).

El efecto de los seis metabolitos sobre las diferentes dianas evaluadas se resume en la Tabla 9. Los metabolitos mostraron efecto inhibitorio sobre varias de las dianas evaluadas. El acetato de geranilo, presentó una marcada actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa tanto comercial como la evaluada en el homogeneizado de larvas, donde inhibió en mayor proporción que los demás metabolitos. Además, su  $CL_{50}$  es la más baja.



**Figura 31.** Efecto de los metabolitos secundarios sobre la actividad de ATPasa. El 100% del control corresponde a  $0.9471 \pm 0.1609$  mmol fosfato/mg proteína.

El  $\alpha$ -humuleno presentó actividad inhibitoria sobre los complejos II, III y IV,  $\beta$ -cariofileno presentó una pronunciada inhibición sobre los complejos I, II y IV y geraniol presentó inhibición sobre los complejos I y II. Por otra parte, los metabolitos nerol y n-octanol presentaron inhibición significativa sólo sobre el complejo II, mientras que las actividades de las oxidasas no se vieron mayormente afectadas.

Mientras que los isómeros *cis-trans* (nerol y geraniol) mostraron diferencias entre sus actividades sobre las enzimas deshidrogenasas de los complejos I y II (*trans-* presentó mayor efecto sobre el complejo I y el *cis-* sobre el complejo II), los isómeros estructurales  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno mostraron un efecto inhibitorio similar en los complejo III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial. Estos resultados sugieren que los complejos I y II de larvas de *Ae. aegypti* son más específicos y pueden diferenciar isómeros geométricos.

Tabla 9. Porcentajes de inhibición de los metabolitos sobre las diferentes dianas evaluadas.

Metabolito	CL <sub>50</sub> [mM]	% de inhibición $\pm$ SD								
		AChE comercial	AChE larvas	NADH oxidasa	NADH deshidro- genasa	Succinato oxidasa	Succinato deshidro- genasa	NADH Cyt <i>c</i> red	Cyt <i>c</i> oxidasa	ATPasa
Acetato de geraniol	0.22	37 $\pm$ 1.7	38 $\pm$ 7.9	-	17 $\pm$ 5.2	27 $\pm$ 1.2	-	-	23 $\pm$ 10	-
$\alpha$ -humuleno	0.20	40 $\pm$ 0.83	-	-	16 $\pm$ 3.9	32 $\pm$ 8.6	38 $\pm$ 7.7	35 $\pm$ 5.5	30 $\pm$ 13	-
$\beta$ -cariofileno	0.24	51 $\pm$ 1.4	10 $\pm$ 5.2	31 $\pm$ 6.8	27 $\pm$ 5.8	48 $\pm$ 7.7	30 $\pm$ 8.1	36 $\pm$ 8.8	27 $\pm$ 10	-
Geraniol	0.55	54 $\pm$ 1.8	26 $\pm$ 2.6	20 $\pm$ 8.7	27 $\pm$ 3.3	41 $\pm$ 6.4	29 $\pm$ 11	27 $\pm$ 10	-	-
Nerol	0.56	55 $\pm$ 0.53	19 $\pm$ 5.1	-	16 $\pm$ 3.8	26 $\pm$ 10	41 $\pm$ 7.1	-	-	-
n-octanol	0.75	55 $\pm$ 0.72	-	-	-	-	25 $\pm$ 12	-	-	-

Considerando los resultados anteriores, los metabolitos: acetato de geraniol,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno y geraniol fueron seleccionados para las pruebas de actividad adulticida y para la preparación y evaluación de diferentes mezclas sobre larvas.

#### 4.4 Actividad adulticida

Con base en los resultados del estudio del mecanismo de acción, fueron seleccionados los cuatro metabolitos mencionados anteriormente para evaluarlos según su actividad adulticida. Esta prueba se realizó con el fin de observar la relación entre la actividad sobre las dianas evaluadas y el efecto sobre los mosquitos adultos. Los resultados de la actividad adulticida sobre *Ae. aegypti* se muestran en porcentajes de mortalidad a las 2 y 24 h de exposición (Tabla 10). Los datos no mostraron una distribución normal. No existen diferencias significativas entre los tratamientos y el control, tampoco entre las concentraciones de cada metabolito a 2 h y 24 h (Kruskal-Wallis test, N=16; 2 h,  $p=.52$ ,  $F=14.11$ ; 24 h,  $p=.08$ ,  $F=23.19$ ).

Los metabolitos secundarios no presentaron efecto adulticida sobre *Ae. aegypti*, ya que los porcentajes de mortalidad no superaron el 1.25% (acetato de geranilo, 30 ppm) a las 2 h de exposición y el 8.75% (geraniol, 300 ppm) a las 24 h de exposición.

Probablemente la alta presión de vapor de estos metabolitos estuvo relacionada con la ausencia de efecto adulticida, ya que de acuerdo con el protocolo que se desarrolló, el efecto generado sobre los mosquitos se debe al compuesto remanente en las botellas luego de secarlas a temperatura ambiente por 24 h. Por lo tanto, no se evaluó el efecto de aplicación directa sobre los mosquitos, sino el efecto causado por los residuos de los metabolitos en las botellas.

Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de los metabolitos secundarios sobre adultos de *Ae. aegypti*.

Metabolito	ppm	Mortalidad %±DE	
		2h	24h

Acetato de geranilo	0	0	1.69±2.36
	30	1.25±1.77	3.75±1.77
	300	0	2.5
	1000	0	0
$\alpha$ -humuleno	0	0	1.67±2.36
	30	0	3.75±1.77
	300	0	3.75±1.77
	1000	0	1.25±1.77
$\beta$ -cariofileno	0	0	0
	30	0	1.25±1.77
	300	0	0
	1000	0	1.25±1.77
Geraniol	0	0	3.33±0
	30	0	5±3.56
	300	0	8.75±5.30
	1000	0	1.25±1.77

#### 4.5 Preparación y evaluación de las mezclas de metabolitos secundarios

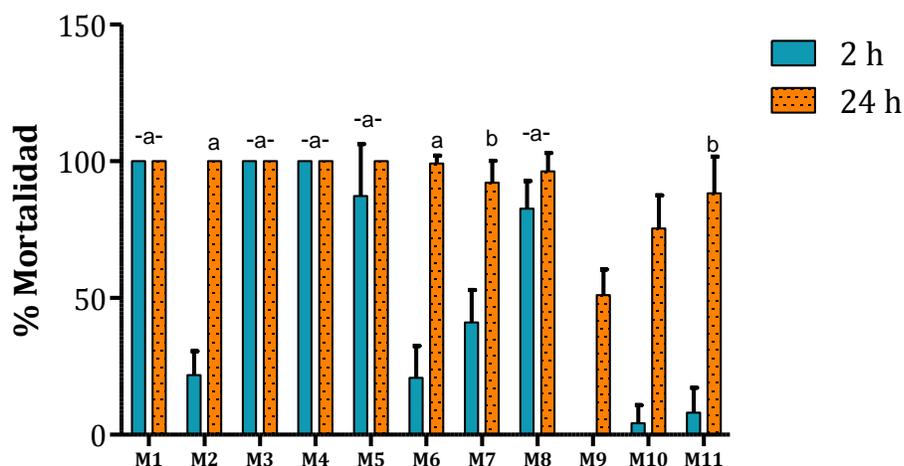
Según el estudio del mecanismo de acción, los metabolitos: acetato de geranilo,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno y geraniol fueron seleccionados para realizar 11 mezclas a evaluar sobre larvas de *Ae. aegypti* (Tabla 11). Las 11 mezclas corresponden a todas las combinaciones posibles entre los cuatro metabolitos.

Tabla 11. *Composición de las mezclas de metabolitos*

Metabolito	CL <sub>50</sub> [mM]	Mezclas										
		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>
Acetato de geranilo	0.22	x	x	x	x		x	x	x			
α-humuleno	0.20	x	x	x		x	x			x	x	
β-cariofileno	0.24	x	x		x	x		x		x		x
Geraniol	0.55	x		x	x	x			x		x	x

La actividad larvicida de las mezclas evaluadas (usando la CL<sub>50</sub>), se muestran en porcentajes de mortalidad a 2 y 24 h de tratamiento (Figura 32). Los datos no mostraron distribución normal, se presentaron diferencias significativas respecto al control (Kruskal-Wallis test, N=12; 2 h, p<.0001, F=127.60; 24 h, p<.0001, F= 113.30).

. Las mezclas M<sub>1-8</sub> presentaron mortalidad del 100% a las 24 h, sin embargo, las mezclas M<sub>9-11</sub> presentaron porcentajes de mortalidad de 51, 75 y 88%. Estas últimas tres mezclas tienen en común que son mezclas de dos metabolitos y ninguna contenían acetato de geranilo. Podemos ver que las mezclas de dos metabolitos que contenían acetato de geranilo (M<sub>6-8</sub>) presentaron mortalidad del 100% a las 24 h. Esto sugiere que el acetato de geranilo presenta un efecto sinérgico con los demás metabolitos, aumentado su efecto larvicida cuando se encuentra en mezclas. Si comparamos lo reportado por Vera (2014)(Vera et al., 2014) y lo encontrado en esta investigación, podemos observar también el efecto sinérgico del acetato de geranilo. Ya que el aceite esencial de *C. flexuosus* (cuyo compuesto mayoritario es el acetato de geranilo), presentó una CL<sub>50</sub> de 17 mg/L, mientras que la CL<sub>50</sub> del compuesto aislado fue mucho mayor (44.2 mg/L).



**Figura 32.** Porcentaje de mortalidad de mezclas de metabolitos sobre larvas de *Ae. aegypti* (%mortalidad  $\pm$  SD). Las mezclas de metabolitos se disolvieron en DMSO al 0.5%. El control corresponde al 0% de mortalidad, en donde las larvas fueron tratadas con DMSO al 0.5%. Las diferencias significativas se muestran respecto al control: a,  $p < .001$ ; b,  $p < .01$ .

Al observar los resultados a las 2 h, se puede apreciar que las mezclas M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub> presentaron mortalidades del 100%, y las mezclas M<sub>5</sub> y M<sub>8</sub> presentaron porcentajes de 87 y 82% respectivamente. Las demás mezclas no superaron el 20% de mortalidad a este tiempo. Era de esperarse que la mezcla M<sub>1</sub>, presentara el 100% de mortalidad, ya que M<sub>1</sub> contiene los cuatro metabolitos. Por otra parte, las mezclas M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub> tienen en común los metabolitos acetato de geranilo y geraniol al igual que la mezcla M<sub>8</sub>. Esto sugiere que la mezcla de estos últimos dos compuestos potencializa el efecto mucho más que cualquiera de las otras mezclas de dos metabolitos y que por lo tanto existe un efecto de sinergismo superior al observado en las demás mezclas evaluadas. La efectividad de estas tres mezclas, probablemente se debe a las diferentes dianas que se ven involucradas en su mecanismo de acción, en donde el acetato de geranilo ataca principalmente la acetilcolinesterasa y el geraniol inhibe el complejo I y II de la cadena

respiratoria. Esto concuerda con el hecho de que los insecticidas más comunes inhiben la acetilcolinesterasa (organofosforados y carbamatos) o el complejo I de la cadena respiratoria (rotenona y piericidina A) (Fukuto, 1990; Lümmer, 1998).

También es importante destacar que el  $\alpha$ -humuleno muestra un efecto antagonista en las mezclas M<sub>9</sub> y M<sub>10</sub>, donde a las 24 h los porcentajes de mortalidad fueron 51 y 75%, respectivamente. Teniendo en cuenta que estas dos mezclas (formadas por  $\alpha$ -humuleno- $\beta$ -cariofileno y  $\alpha$ -humuleno-geraniol, respectivamente), contienen las concentraciones CL<sub>50</sub> de cada compuesto, se esperaría que, por efecto aditivo, los porcentajes de mortalidad fueran cercanos al 100% a las 24 h. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre las dos mezclas y el control, lo que indica que efectivamente se está generando una relación de antagonismo entre los metabolitos. Por otra parte, la mezcla M<sub>11</sub>, conformada por  $\beta$ -cariofileno-geraniol, muestran un porcentaje de mortalidad de 88% a las 24h, presentando diferencias significativas respecto al control. Considerando que, el  $\alpha$ -humuleno inhibió significativamente el complejo III, a diferencia de los compuestos  $\beta$ -cariofileno y geraniol que afectan principalmente el complejo I, es posible sugerir que los metabolitos cuyas dianas de acción involucran el complejo I tienen mayor efecto sinérgico que los metabolitos que afectan el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial.

Por otra parte, el efecto antagónico que se observa en la mezcla M<sub>9</sub> puede deberse a que los compuestos  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno presentan mecanismos de acción casi idénticos sobre los complejos de la cadena respiratoria, ya que los dos inhiben los complejos III y IV en la misma proporción. Esto concuerda con el efecto observado en M<sub>2</sub> y M<sub>5</sub> (las cuales contienen  $\alpha$ -humuleno- $\beta$ -cariofileno) a las 2h, ya que a diferencia de M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub>, estas mezclas no alcanzaron

el 100% de mortalidad, siendo el efecto antagónico más marcado en M<sub>2</sub> (22%). Este efecto antagónico puede estar relacionado con la competición entre estas dos moléculas generando una disminución de su actividad larvicida. (Chou & Talalay, 1984) Es posible que las mezclas M<sub>10-11</sub> presenten disminución en su actividad por esta misma razón, ya que el geraniol también comparte dianas con los otros dos metabolitos.

Diferentes autores han reportado el efecto sinérgico en mezclas de diferentes insecticidas comerciales contra mosquitos, moscas y cucarachas (Jones & Yardley, 1994; Reid et al., 2013; Y. P. Sun & Johnson, 1960). Además, se ha demostrado que al usar insecticidas con diferentes mecanismos de acción el efecto de resistencia en el vector disminuye (Brindley & Selim, 1984). A pesar de que existen varios trabajos relacionados con el efecto sinérgico en mezclas de aceites esenciales y de metabolitos secundarios, pocos de estos estudios están enfocados en los mecanismos de acción de cada uno de sus componentes (Bessette, 2006; Bessette & Beigler, 2005; Jones & Yardley, 1994; Tripathi, Upadhyay, Bhuiyan, & Bhattacharya, 2009).

## 5. Conclusiones

- Por medio de las herramientas bioinformáticas fue posible seleccionar siete metabolitos acetato de geranilo,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno, geraniol, 1,8-cineol, nerol y n-octanol. Los siete metabolitos presentaron actividad larvicida contra *Ae. aegypti*.
- Según las concentraciones CL<sub>50</sub> a las 24 h y 48 h, los metabolitos con mayor actividad larvicida fueron  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno (44 y 29 mg/L, respectivamente). Teniendo en cuenta las CL<sub>95</sub>, el acetato de geranilo presentó la mayor actividad larvicida a 24 y 48 h (64 y 55 mg/L,

respectivamente). Por otra parte, el 1,8-cineol presentó un  $CL_{50}$  superior a 100 mg/L, por lo que no se consideró como una actividad larvicida significativa.

- Los compuestos seleccionados no presentaron efecto genotóxico sobre ADN aislado de larvas de *Ae. aegypti*.
- El acetato de geranilo presentó principalmente actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa tanto comercial como en homogeneizado de larvas de *Ae. aegypti*, además inhibió el complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial.
- El  $\alpha$ -humuleno presentó inhibición sobre los complejos II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, siendo más pronunciada su actividad sobre la enzima succinato deshidrogenasa (complejo II).
- El  $\beta$ -cariofileno presentó inhibición sobre los complejos I, II y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, mostrando mayor inhibición sobre la enzima succinato oxidasa (transporte de electrones desde el complejo II al complejo IV).
- El geraniol presentó inhibición sobre AChE, así como inhibición de los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial.
- Los compuestos nerol y n-octanol mostraron sólo actividad inhibitoria sobre el complejo II.
- El nerol mostró inhibición marcada sólo sobre la enzima succinato deshidrogenasa, mientras que el n-octanol no presentó inhibición sobresaliente en ninguna de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.

- Los compuestos acetato de geranilo,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno y geraniol fueron seleccionados para la preparación de las mezclas que fueron evaluadas según su actividad larvica sobre *Ae. aegypti*.
- Las mezclas que presentaron mayor porcentaje de mortalidad a las 2 h fueron las mezclas M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub>, mientras que a las 24 h las mezclas M<sub>1-8</sub> presentaron porcentajes de mortalidad cercanos a 100%. Por otra parte, las mezclas M<sub>9-11</sub> mostraron los porcentajes de mortalidad más bajos.
- El acetato de geranilo y el geraniol mostraron efecto sinérgico, ya que en las mezclas M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub> (mezclas de tres metabolitos) el porcentaje de mortalidad fue del 100% a las 2h, y en M<sub>8</sub> (mezcla de dos metabolitos) el porcentaje fue de 83%.
- El  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno mostraron un efecto antagonista sobre las mezclas evaluadas, evidenciado en las mezclas M<sub>2</sub>, M<sub>5</sub> y M<sub>9</sub>.

## 6. Recomendaciones

Sin duda una de las limitantes de este trabajo fue la disponibilidad comercial de algunos metabolitos que fueron seleccionados en el cribado virtual como es el caso del germacreno-D. Por lo cual, una de las recomendaciones para futuras investigaciones sería aislar estos compuestos y probar su actividad biológica en ensayos *in vivo* e *in vitro* como se realizó en este trabajo.

Además, teniendo en cuenta los resultados encontrados en este trabajo, vale la pena realizar más estudios similares a este con el fin de ampliar el número de plantas y por lo tanto el número

de metabolitos secundarios a evaluar. Más adelante se podrían probar diferentes mezclas con los metabolitos más activos en búsqueda de un efecto insecticida potencializado y sin efectos tóxicos adversos.

Otro aspecto importante está relacionado con la profundización en la investigación de la toxicidad de los metabolitos que fueron probados en este estudio, ya que si bien en esta investigación se observó su efecto sobre el ADN de *Ae. aegypti*, se requieren de estudios más específicos para corroborar sus efectos genotóxicos. Se podrían desarrollar ensayos tipo cometa sobre células humanas, o pruebas *in vivo* de mutagenicidad o carcinogénesis en ratones para confirmar que estos compuestos son inofensivos para el ser humano.

Teniendo en cuenta lo observado en el ensayo de actividad adulticida por causa de la volatilidad de los compuestos, sería interesante que en un estudio futuro se pruebe su efecto por contacto empleando diferentes ensayos biológicos como por ejemplo la prueba de susceptibilidad de la OMS, en donde se usan papeles impregnados por el insecticida. (Organización Mundial de la Salud, 2015)

Por último, se recomienda ampliar el número de dianas para determinar el mecanismo de acción de estos compuestos, ya que los compuestos pueden actuar por rutas diferentes a las evaluadas en este trabajo, como por ejemplo sobre los receptores octopaminérgicos o podrían estar involucrados en el crecimiento.

### Referencias

- Abdelgaleil, S. A. M., Mohamed, M. I. E., Badawy, M. E. I., El-arami, & A., S. A. (2009). Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *Journal of Chemical Ecology*, *35*, 518–525. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9635-3>
- Abrahams, J., Leslie, A., Lutter, R., & Walker, J. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, *370*(6491), 621–628. <https://doi.org/10.1038/370621a0>
- Akamatsu, M. (2011). Importance of physicochemical properties for the design of new pesticides. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 2909–2917. <https://doi.org/10.1021/jf102525e>
- Araujo, E., Silveira, E., Lima, M. A., Neto, M., ANdrade, I., & Lima, M. (2003). Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 3760–3762. <https://doi.org/10.1021/jf021074s>
- Arnason, J. T., Philogène, B. J. R., Morand, P., Imrie, K., Iyengar, S., Duval, F., ... Downe, A. E. R. (1989). Naturally Occurring and Synthetic Thiophenes as Photoactivated Insecticides. In *Insecticides of plant origin* (ACS, pp. 164–172). Washington, D.C.: ACS Symposium Series. <https://doi.org/10.1021/bk-1989-0387.ch012>
- Aspilcueta-gho, D., Villafane, C. B., Calderón Sánchez, M. M., & Calderón Yberico, J. G. (2017). Zika virus infection in Peru: from threat to a health problem. *Revista Peruana de*

*Genecología Y Obstetricia*, 63(1), 57–64.

Aszalos, A. A. (1978). Isolation of enzymes. In F. F. Foldes (Ed.), *Enzymes in Anesthesiology* (pp. 21–29). New York: Springer-Verlag New York Inc. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-6248-0>

Avenot, H. F., & Michailides, T. J. (2010). Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 29(7), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.019>

Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M. O., & Enríquez, J. A. (2012). NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metabolism*, 16(3), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.015>

Baser, K. H. ., Kürkçüoğlu, M., & Demirci, B. (2005). Ninde oil (*Aeollanthus myrianthus* Taylor) revisited: Analysis of a historical oil. *Journal of Essential Oil Research*, 17(2), 137–138. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698856>

Baydar, H., Baydar, N. G., & Tucker, R. L. (2005). The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.). *Industrial Crops and Products*, 21, 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.04.004>

Benelli, G. (2015). Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitology Research*, 114(8), 2801–2805. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4586-9>

- Bennett, R. N., & Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, *127*(4), 617–633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Bessette, S. M. (2006). Synergistic and residual pesticidal compositions containing plant essential oils with enzyme inhibitors.
- Bessette, S. M., & Beigler, M. A. (2005). Synergistic and residual pesticidal compositions containing plant essential oils. United States. [https://doi.org/10.1016/j.\(73\)](https://doi.org/10.1016/j.(73))
- Bilal, H., Sahar, S., & Din, S. (2017). Bio-pesticides: New tool for the control of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Culicidae : Diptera) in Pakistan. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, *11*(2), 278–285. Retrieved from <http://jad.tums.ac.ir>
- Bisset, J. A., Rodríguez, M. M., French, L., David, W., Gutiérrez, G., Hurtado, D., & Fuentes, I. (2014). Insecticide resistance and metabolic mechanisms involved in larval and adult stages of *Aedes aegypti* insecticide-resistant reference strains from Cuba. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *30*(4), 298–304. <https://doi.org/dx.doi.org/10.2987/14-6431.1>
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, *543*, 251–272. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)
- Bonner, M. R., & Alavanja, M. C. R. (2017). Pesticides, human health, and food security. *Food and Energy Security*, *6*(3), 89–93. <https://doi.org/10.1002/fes3.112>
- Boros, I. M. (2012). Histone modification in *Drosophila*. *Briefings in Functional Genomics*, *2*(4), 319–331. <https://doi.org/10.1093/bfpg/els029>

- Bosire, C. M., Deyou, T., Kabaru, J. M., Kimata, D. M., & Yenesew, A. (2014). Larvicidal activities of the stem bark extract and rotenoids of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis* on *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *17*(3), 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.05.003>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brindley, W. A., & Selim, A. A. (1984). Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. *Environmental Entomology*, *13*, 348–353. <https://doi.org/doi.org/10.1093/ee/13.2.348>
- Brunori, M., Antontni, G., Malatesta, F., Sarti, P., & Wilson, M. T. (1987). cytochrome c oxidase. *European Journal of Biochemistry*, *169*, 1–8. <https://doi.org/doi/pdf/10.1111/j.1432-1033.1987.tb13572.x>
- Canadian Centre for Occupational Health and Safety Resource. (2017). RTECS. Retrieved November 10, 2017, from <http://ccinfoweb.ccohs.ca/rtecs/search.html>
- Carreño, A. L., Vargas, L. Y., Duque, J. E., & Kouznetsov, V. V. (2014). Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsensohnine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *78*(2014), 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.067>
- Casida, J. E. (1980). Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, *34*(February), 189–202. <https://doi.org/10.1289/ehp.8034189>

- Cavalcanti, M. M., Da Silva, A., Da Silva, R., Leal, D., & Barbosa, E. (2014). Resistance of *Aedes aegypti* to temephos and adaptive disadvantages. *Saúde Pública*, *48*(5), 775–782. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048004649>
- Cecchini, G., & Schro, I. (2002). Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1553*(1553), 140–157. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00238-9](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00238-9)
- Chadee, D., Ward, R., & Novak, R. (1998). Natural habits of *Aedes aegypti* in the caribbean. A review. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *14*(1), 5–11. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9599318>
- Chan, L. M. S., Lowes, S., & Hirst, B. H. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: Efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *21*(1), 25–51. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.07.003>
- Chen, W., & Viljoen, A. M. (2010). Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*, *76*(4), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>
- Cheng, S. S., Chang, H. T., Chang, S. T., Tsai, K. H., & Chen, W. J. (2003). Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, *89*(1), 99–102. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00008-7)
- Chou, T. C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, *22*, 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)

- Coats, J. (1994). Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annual Review of Entomology*, 39, 489–515. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.002421>
- Collins, a R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
- Conti, B., Canale, A., Bertoli, A., Gozzini, F., & Pistelli, L. (2010). Essential oil composition and larvicidal activity of six mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 107, 1455–1461. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2018-4>
- Coria, C., Almiron, W., Valladares, G., Carpinella, C., Ludueña, F., Defago, M., & Palacios, S. (2008). Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology*, 99(8), 3066–3070. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.012>
- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L. M., Guimarães, K. P., ... Beltrão-braga, P. C. B. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 0, 1–15. <https://doi.org/10.1038/nature18296>
- Davidson, G., & Zahar, A. R. (1973). The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. *Bulletin World Health Organization*, 49, 475–483.
- Davis, K., & Hatefi, Y. (1971). Succinate dehydrogenase. I. purification, molecular properties, and

substructure. *Biochemistry*, 10(13), 2509–2516. <https://doi.org/10.1021/bi00789a014>.

De Roos, a J., Zahm, S. H., Cantor, K. P., Weisenburger, D. D., Holmes, F. F., Burmeister, L. F., & Blair, A. (2003). Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occupational and Environmental Medicine*, 60(9), e11–e11. <https://doi.org/10.1136/oem.60.9.e11>

Degli Esposti, M. (1998). Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1364(2), 222–235. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00029-2)

Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52, 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>

Dias, C. N., Alves, L. P. L., Rodrigues, K. A. D. F., Brito, M. C. A., Rosa, C. D. S., Amaral, F. M. M. Do, ... Moraes, D. F. C. (2015). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian legal amazon plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/490765>

Dias, C. N., & Moraes, D. F. C. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitology Research*, 113(2), 565–592. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3687-6>

Dick, O. B., San Martín, J. L., Montoya, R. H., Del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2012). Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 584–593. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11->

0770

- Dickman, S., & Bray, R. (1940). Colorimetric determination of phosphate. *Industrial Ad Enginnering Chemistry*, 12(11), 665–668. <https://doi.org/10.1021/ac50151a013>
- Dmitriev, O. Y., Jones, P. C., & Fillingame, R. H. (1999). Structure of the subunit c oligomer in the F1Fo ATP synthase: model derived from solution structure of the monomer and cross-linking in the native enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 7785–7790. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22139&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Dubey, V. S., & Luthra, R. (2001). Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during inflorescence development. *Phytochemistry* 57, 57, 675–680. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00122-4](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00122-4)
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., & Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1–3), 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>.Acetylcholinesterase
- Efremov, R. G., Baradaran, R., & Sazanov, L. A. (2016). The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature*, 537(7622), 644–648. <https://doi.org/10.1038/nature19774>
- Elliott, M., & Janes, N. F. (1978). Synthetic pyrethroids - A new class of insecticide. *Chemical Society Reviews*, 7(4), 473. <https://doi.org/10.1039/cs9780700473>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*,

7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Ernster, L., & Schatz, G. (1981). Mitochondria: A historical review. *The Journal of Cell Biology*, 91(3 Pt 2), 227s–255s. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2112799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Ertl, P., Rohde, B., & Selzer, P. (2000). Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(20), 3714–3717. <https://doi.org/10.1021/jm000942e>

Esposti, M. D. (1998). Inhibitors of NADH – ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1364, 222–235. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00029-2](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00029-2)

Fauci, A. S., & Morens, D. M. (2016). Zika virus in the Americas-Yet another arbovirus threat. *The New England Journal of Medicine*, 374(7), 601–604. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1002530>

Faucon, F., Dusfour, I., Gaude, T., Navratil, V., Boyer, F., Chandre, F., ... David, J. (2015). Unravelling genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. *Genome Research*, 25(1), 1–13. <https://doi.org/10.1101/gr.189225.115>.Freely

Freitas, F. P., Freitas, S. P., Lemos, G. C. S., Vieira, I. J. C., Gravina, G. a, & Lemos, F. J. a. (2010). Comparative larvicidal activity of essential oils from three medicinal plants against *Aedes aegypti* L. *Chemistry & Biodiversity*, 7(11), 2801–2807. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900260>

Friedrich, T., van Heek, P., Leif, H., Ohnishi, T., Forche, E., Kunze, B., ... Reichenbach, H.

(1994). Two binding sites of inhibitors in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I).

Relationship of one site with the ubiquinone-binding site of bacterial glucose:ubiquinone oxidoreductase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 219(1–2), 691–698.

<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19985.x>

Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides.

*Environmental Health Perspectives*, 87, 245–254. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1567830&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Gao, X., Wen, X., Esser, L., Quinn, B., Yu, L., Yu, C.-A., & Xia, D. (2003). Structural basis for

the quinone reduction in the bc1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Qi site.

*Biochemistry*, 42(30), 9067–9080. <https://doi.org/10.1021/bi0341814>

García, J., & Morales, E. (2008). Regulation of the F1F0-ATP synthase rotary nanomotor in its

monomeric-bacterial and dimeric-mitochondrial forms. *Journal of Biological Physics*,

34(1–2), 197–212. <https://doi.org/10.1007/s10867-008-9114-z>

Georghiou, G. P., Wirth, M., Tran, H., Saume, F., & Knudsen, A. B. (1987). Potential for

organophosphate resistance in *Aedes aegypti* in the Caribbean area and neighbouring countries. *J. Med. Entomol.*, 24(290–294), 290–294.

<https://doi.org/doi.org/10.1093/jmedent/24.3.290>

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

Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control.

*PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9), e2438.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002438>

Guizzetti, M., Pathak, S., Giordano, G., & Costa, L. G. (2005). Effect of organophosphorus insecticides and their metabolites on astroglial cell proliferation. *Toxicology*, 215(3), 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.07.004>

Guy, R. C. (2005). Toxicity testing, mutagenicity. In P. Wexler, B. Anderson, A. de Peyster, S. Gad, P. J. Hakkinen, M. Kamrin, ... L. Shugart (Eds.), *Enciclopedia of Toxicology* (Eds). Elsevier Inc. Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/encyclopedia-of-toxicology/anderson/978-0-08-054800-5>

Haller, H. L., Laforge, F. B., & Sullivan, W. N. (1942). Effect of sesamin and related compounds on the insecticidal action of pyrethrum on houseflies. *Journal of Economic Entomology*, 35(2), 247–248. <https://doi.org/doi.org/10.1093/jee/35.2.247>

Hassinen, I. E. (2014). Mitochondria and energy metabolism: networks, mechanisms, and Control. In *Natural Biomarkers for Cellular Metabolism* (pp. 1–33). CRC Press. Retrieved from <https://www.taylorfrancis.com/books/e/9781466509993>

Houghton, P. J., & Howes, M. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, 23, 181–199. <https://doi.org/10.1039/b508966m>

Hreljac, I., Zajc, I., Lah, T., & Filipi, M. (2010). Effects of model organophosphorous pesticides on DNA damage and proliferation of HepG2 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(3), 229–235. <https://doi.org/10.1002/em>

IBM Corporation. (2010). IBM SPSS Statistics for Windows. Armonk, New York: IBM

Corporation. Retrieved from <http://www-01.ibm.com/support/docview.wss?uid=swg21476197>

Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). (2016). *Mode of Action Classification Scheme*.

Ishaaya, I., Nauen, R., & Horowitz, A. R. (2007a). *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-46907-0>

Ishaaya, I., Nauen, R., & Horowitz, A. R. (2007b). Mitochondrial Electron Transport Complexes as Biochemical Target Sites for Insecticides and Acaricides. In *Insecticides Design Using Advanced Technologies* (pp. 197–212). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-46907-0>

Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, *51*, 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>

Jones, K. A., & Yardley, P. (1994). Environmentally safe pesticide compositions. *United States Patent*. United States Patent. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/US5342630>

Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., & Milos, M. (2007). In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, *21*, 259–261. <https://doi.org/10.1002/ptr>

Justin, J., Georg, N., Esen, M., Gottfried, P., & Peter, M. (2016). Dengue and chikungunya seroprevalence in Gabonese infants prior to major outbreaks in 2007 and 2010 : A sero-

epidemiological study. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 14(1), 26–31.

<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.01.005>

Kaiser, H. F. (1960). The application of electronic computers to factor analysis. *Educational and Psychological Measurement*, XX(1), 141–151.

<https://doi.org/doi.org/10.1177/001316446002000116>

Kaur, R., Kaur, S., & Lata, M. (2011). Evaluation of DNA damage in agricultural workers exposed to pesticides using single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Indian Journal of Human Genetics*, 17(3), 179–187. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.92100>

Khambay, B. P. S., & Jewess, P. (2000). The potential of natural naphthoquinones as the basis for a new class of pest control agents - An overview of research at IACR-Rothamsted. *Crop Protection*, 19(8–10), 597–601. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00078-8)

Kittayapong, P., & McCall, P. J. (2006). Control of dengue vectors: Tools and strategies. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, 0(October 2006), 1–5.

Retrieved from [http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg\\_dengue\\_2.htm](http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_dengue_2.htm)

Krauss, S. (2001). Mitochondria: Structure and role in respiration. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6. Retrieved from [www.els.net](http://www.els.net)

Krstic, D. Z., Colovic, M., Bavcon Kralj, M., Franko, M., Krinulovic, K., Trebse, P., & Vasic, V. (2008). Inhibition of AChE by malathion and some structurally similar compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(4), 562–573.

<https://doi.org/10.1080/14756360701632031>

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2012). Insecticidal evaluation of essential oils of

- Citrus sinensis L. (Myrtales: Myrtaceae) against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Parasitology Research*, 110(5), 1929–1936. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2719-3>
- Lambert, A. J., & Brand, M. D. (2004). Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39414–39420. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406576200>
- Larocca, R. A., Abbink, P., Peron, J. P. S., Zanotto, P. M. D. A., Iampietro, M. J., Badamchizadeh, A., ... Barouch, D. H. (2016). Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature Publishing Group*, 536(7617), 474–478. <https://doi.org/10.1038/nature18952>
- Lee, B. H., Annis, P. C., Tumaalii, F., & Choi, W. S. (2004). Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research*, 40(5), 553–564. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2003.09.001>
- Lindsay, S. W., Lindsay, S. W., Wilson, A., Golding, N., Scott, W., & Takken, W. (2017). Improving the built environment in urban areas to control *Aedes aegypti*-borne diseases. *Bulletin World Health Organization*, 95(8), 607–608. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.189688>
- Liu, N. (2015). Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms, and research directions. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 537–559. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828>
- Liu, Q. R., Chu, S. S., Jiang, G. H., District, H., District, H., & District, H. (2010). Insecticidal activity and chemical composition of the essential oils of *Artemisia lavandulaefolia* and

*Artemisia sieversiana* from China. *Chemico-Biological Interactions*, 7, 2040–2045.

<https://doi.org/10.1002/cbdv.200900410>

Liu, X. H., Wang, Q., Sun, Z. H., Wedge, D. E., Becnel, J. J., Estep, A. S., ... Weng, J. Q.

(2017). Synthesis and insecticidal activity of novel pyrimidine derivatives containing urea pharmacophore against *Aedes aegypti*. *Pest Management Science*, 73(5), 953–959.

<https://doi.org/10.1002/ps.4370>

Lo Presti, A., Lai, A., Cella, E., Zehender, G., & Ciccozzi, M. (2014). Chikungunya virus,

epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical*

*Medicine*, 7(12), 925–932. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60164-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60164-4)

López, M. D., & Pascual-Villalobos, M. J. (2010). Mode of inhibition of acetylcholinesterase by

monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products* 31, 31,

284–288. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.005>

Lümmen, P. (1998). Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochimica et*

*Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1364(2), 287–296. <https://doi.org/10.1016/S0005->

2728(98)00034-6

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>

Matasyoh, J. C., Wathuta, E. M., Kariuki, S. T., & Chepkorir, R. (2011). Chemical composition

and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles*

*gambiae*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14(1), 26–28.

<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.11.005>

- Mattar, S., Miranda, J., Pinzon, H., Tique, V., Bolaños, A., Aponte, J., ... Aleman, A. (2015). Outbreak of chikungunya virus in the north caribbean area of colombia: Clinical presentation and phylogenetic analysis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(10), 1126–1132. <https://doi.org/10.3855/jidc.6670>
- Miyadera, H., Shiomi, K., Ui, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., ... Omura, S. (2003). Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2), 473–477. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237315100>
- Miyazawa, M., Watanabe, H., & Kameoka, H. (1997). Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a p-menthane skeleton. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 45, 677–679. <https://doi.org/10.1021/jf960398b>
- Molinspiration cheminformatics. (2006). logP - octanol-water partition coefficient calculation. Retrieved May 14, 2016, from <http://www.molinspiration.com/services/logp.html>
- Molinspiration cheminformatics. (2016). Druglikeness and bioactivity score. Retrieved from <http://www.molinspiration.com/docu/miscreen/druglikeness.html>
- Molinspiration Cheminformatics. (2016). Molinspiration. Retrieved January 20, 2016, from <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>
- Mukherjee, K., Twyman, R. M., & Vilcinskas, A. (2015). Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 118(1–2), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.009>
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., & Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors

- from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.02.002>
- Mulkidjanian, A. Y. (2010). Activated Q-cycle as a common mechanism for cytochrome bc1 and cytochrome b6f complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(12), 1858–1868. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.07.008>
- Nesci, S., Trombetti, F., Ventrella, V., & Pagliarani, A. (2017). Post-translational modifications of the mitochondrial F1FO-ATPase. *BBA - General Subjects*, 1861(11), 2902–2912. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.007>
- Newcombe, D. S. (1992). Immune surveillance, organophosphorus exposure, and lymphomagenesis. *The Lancet*, 339(8792), 539–541. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)90349-8](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)90349-8)
- Obeng-Ofori, D., Reichmuth, D., Bekele, J., & Hassanali, A. (1997). Biological activity of 1,8 cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. *Journal of Applied Entomology*, 121, 237–243. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1997.tb01399.x>
- Ocampo, C. B., Salazar-Terreros, M. J., Mina, N. J., McAllister, J., & Brogdon, W. (2011). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica*, 118(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.007>
- Oliveira, G. L., Cardoso, S. K., Lara Júnior, C. R., Vieira, T. M., Guimarães, E. F., Figueiredo, L. S., ... Kaplan, M. A. C. (2013). Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 85(4), 1227–1234. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201391011>

Organic Chemistry Portal. (2016). OSIRIS Property Explorer. Retrieved January 26, 2016, from

<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>

Organización Mundial de la Salud. (2015). *Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo*. Retrieved from

<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241511575/es/>

OSIRIS Property explorer. (2014). Toxicity Risk Assesment. Retrieved May 25, 2016, from

<http://www.organic-chemistry.org/prog.peo/tox.html>

OSIRIS Property explorer. (2016). Fragment based druglikeness. Retrieved November 14, 2016,

from <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/druglikeness.html>

Pan American Health Organization. (1997). *Report on Aedes aegypti control*. Washington, D.C.

Retrieved from <http://www1.paho.org/english/gov/cd/doc162.pdf>

Panamerican Health Organization. (2017). *Zika epidemiological update*. Retrieved from

[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=41705&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=41705&lang=en)

Park, I.-K., Lee, S.-G., Shin, S.-C., Park, J.-D., & Ahn, Y.-J. (2002). Larvicidal activity of

isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1866–1870. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902925>

Passarella, S., Atlante, A., Valenti, D., & de Bari, L. (2003). The role of mitochondrial transport

in energy metabolism. *Mitochondrion*, 2(5), 319–343. [https://doi.org/10.1016/S1567-](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(03)00008-4)

[7249\(03\)00008-4](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(03)00008-4)

- Pathak, C. S., & Tiwari, S. K. (2012). Insecticidal action of neem seed (*Azadirachta indica* A. Juss) acetone extract against the life-cycle stages of rice-moth, *Corcyra cephalonica* Staint. (Lepidoptera: Pyralidae). *World Journal of Agricultural Sciences*, 8(5), 529–536.  
<https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2012.8.5.1235>
- Prieto Garcia, F., Cortés Ascencio, S. Y., Oyarzun, J. C. G., Hernandez, A. C., & Alavarado, P. V. (2012). Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*, 1(11), 2315–5698.  
Retrieved from <http://www.interestjournals.org/JREST>
- 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>
- Rajeswara Rao, B. R., Bhattacharya, A. K., Mallavarapu, G. R., & Ramesh, S. (2004). Yellowing and crinkling disease and its impact on the yield and composition of the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.). *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 344–350.  
<https://doi.org/10.1002/ffj.1313>
- Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29(9), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>
- Ravi Kiran, S., Bhavani, K., Sita Devi, P., Rajeswara Rao, B. R., & Janardhan Reddy, K. (2006). Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresource Technology*, 97(18), 2481–2484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.003>
- Reid, B., Baker, R. B., Bao, N. N., Koufas, D. A., Kent, G. J., & Baur, P. (2013). Synergistic

- pesticide compositions. United States. Retrieved from  
<https://patents.google.com/patent/US20130217574/en23>
- Rice, P. J., & Coats, J. R. (1994). Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern com rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 85(5), 1172–1179. <https://doi.org/doi.org/10.1093/jee/87.5.1172>
- Rich, P. R. (2017). Mitochondrial cytochrome *c* oxidase: catalysis, coupling and controversies. *Biochemical Society Transactions*, 45(3), 813–829. <https://doi.org/10.1042/BST20160139>
- Roark, R. C. (1947). Some promising insecticidal plants. *Economic Botany*, 1(4), 437–445. <https://doi.org/10.1007/BF02858908>
- Rodríguez-Morales, A. J. (2015). Zika: The new arbovirus threat for Latin America. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(6), 684–685. <https://doi.org/10.3855/jidc.7230>
- Roy, C. J., Adams, A. P., Wang, E., Plante, K., Gorchakov, R., Seymour, R. L., ... Weaver, S. C. (2014). Chikungunya vaccine candidate is highly attenuated and protects nonhuman primates against telemetrically monitored disease following a single dose. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(12), 1891–1899. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu014>
- Ryan, M. F., & Byrne, O. (1988). Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*, 14(10), 1965–1975. <https://doi.org/10.1007/BF01013489>
- Samarasekera, K., & Radhika, K. S. (2006). Insecticidal activity of essential oils of Ceylon cinnamomum and Cymbopogon species against *Musca domestica*. *Journal of Essential Oil Research*, 18(3), 352–354. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699110>

Schoff, H. F. (1967). Insecticides for use against *Aedes aegypti*. *Bulletin World Health*

*Organization*, 36, 618–622. Retrieved from

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2476413/>

Seiferle, E. J., & Frear, D. E. H. (1948). Insecticides derived from plants. *Industrial and*

*Engineering Chemistry*, 40(4), 683–691. <https://doi.org/10.1021/ie50460a022>

Sfara, A. V, Zerba, E. N., & Alzogaray, R. A. (2009). Fumigant insecticidal activity and

repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of

*Rhodnius prolixus*. *Journal of Medical Entomology*, 46(3), 511–515.

<https://doi.org/dx.doi.org/10.1603/033.046.0315>

Silman, I., & Sussman, J. L. (2008). Acetylcholinesterase: How is structure related to function?

*Chemico-Biological Interactions*, 175(1–3), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.035>

Simon, D. Z., & Beliveau, J. (1986). Extraction by hydrodiffusion of the essential oil of

*MonardufistuZosu* grown in the province of Quebec : assay of geraniol in the hydrodiffused  
oil. *Pharmaceutical Biology*, 24(3), 120–122.

<https://doi.org/doi.org/10.3109/13880208609060888>

Simpson, S. J., Sword, G. A., & Lo, N. (2011). Polyphenism in insects. *Current Biology*, 21,

R738–R749. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.006>

Sims, N. R., & Muyderman, H. (2010). Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in

stroke. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(1), 80–91.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.003>

Singer, T. P. (1974). Determination of the activity of succinate, NADH, choline and a-

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/10.1002/9780470110423.ch3>

Singer, T. P., & Ramsay, R. R. (1994). The reaction sites of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1187(2), 198–202. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(94\)90110-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90110-4)

Somlo, M. (1965). Induction des lactico-cytochrome c reductases de la levure aerobie par les actates. *Biochimica et 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)

Soni, N., & Prakash, S. (2012). Larvicidal effect of *Verticillium lecanii* metabolites on *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(3), 220–224. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60050-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60050-4)

Srinivasan, D. G., & Brisson, J. A. (2012). Aphids : A model for polyphenism and epigenetics. *Genetics Research Internationa*, 2012, 12. <https://doi.org/10.1155/2012/431531>

Stat Soft. (2007). STATISTICA. Tulsa, OK USA: Stat Soft, inc. Retrieved from [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)

Sumathi, P., & Gaspar, D. T. A. (2016). Application of botanical insecticides (*Terminalia arjuna* and *Withania somnifera* leaf extract) for the control of dengue vector *Aedes aegypti* (Listion). *Elixir Applied Zoology*, 92, 39201–39203. Retrieved from [www.researchgate.net/publication/299513417](http://www.researchgate.net/publication/299513417)

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., ... Rao, Z. (2005). Crystal structure of

mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7), 1043–1057.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>

Sun, Y. P., & Johnson, E. R. (1960). Synergistic and antagonistic actions of insecticide-synergist combinations and their mode of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8(4), 261–266. <https://doi.org/10.1021/jf60110a003>

Tennyson, S., Ravindran, K. J., & Arivoli, S. (2012). Bioefficacy of botanical insecticides against the dengue and chikungunya vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1842–S1844.

[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60505-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60505-X)

Tripathi, A. K., Upadhyay, S., Bhuiyan, M., & Bhattacharya, P. R. (2009). A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1(5), 52–63. Retrieved from [www.academicjournals.org/jpp](http://www.academicjournals.org/jpp)

Tsao, R., Lee, S., Rice, P. J., Jensen, C., & Coats, J. R. (1995). Monoterpenoids and their synthetic derivatives as leads for new insect-control agents. In *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals IV* (Vol. 584, pp. 312–324). ACS Symposium Series.

<https://doi.org/10.1021/bk-1995-0584.ch028>

Ündeğer, Ü., & Başaran, N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: Induction of DNA damage. *Archives of Toxicology*, 79(3), 169–176.

<https://doi.org/10.1007/s00204-004-0616-6>

UniProt Consortium. (2017). Align. Retrieved February 13, 2017, from

<http://www.uniprot.org/align/A2017021383C3DD8CE55183C76102DC5D3A26728BBF60>

BFV

Vera, S. S., Zambrano, D. F., Méndez-Sánchez, S. C., Rodríguez-Sanabria, F., Stashenko, E. E., & Duque Luna, J. E. (2014). Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, *113*(7), 2647–2654.

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

Villarini, M., Moretti, M., Pasquini, R., Scassellati-Sforzolini, G., Fatigoni, C., Marcarelli, M., ... Rodríguez, A. V. (1998). In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage (“comet” assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology*, *130*(2–3), 129–139.

[https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(98\)00097-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(98)00097-3)

Wang, C. F., Yang, K., Zhang, H. M., Cao, J., Fang, R., Liu, Z. L., ... Zhou, L. (2011). Components and insecticidal activity against the maize weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits and leaves. *Molecules*, *16*, 3077–3088.

<https://doi.org/10.3390/molecules16043077>

Weaver, S., & Lecuit, M. (2015). Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *The New England Journal of Medicine*, *372*(13), 1231–1239.

<https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035>

World Health Organization. (1992). *Vector resistance to pesticides: fifteenth report of the WHO expert committee on vector biology and control*. Retrieved from

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1574907>

World Health Organization. (2009). Epidemiology, burden of disease and transmission. In

*Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control* (2009th ed., pp. 3–17).

Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143159/>

World Health Organization. (2012). *Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020*. Retrieved from [www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/](http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/)

World Health Organization. (2016a). Dengue vaccine: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*, 30(30), 349–364. <https://doi.org/10.1371/jour>

World Health Organization. (2016b). *Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas, by country. Epidemiological Week / EW 47 (Updated December 12, 2016) (Vol. EW 47)*. Retrieved from [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/)

Yoshida, M., Muneyuki, E., & Hisabori, T. (2001). ATP synthase - A marvellous rotary engine of the cell. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(9), 669–677. <https://doi.org/10.1038/35089509>

Youle, R. J., & Van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *SCIENCE*, 337, 1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219>

Zanluca, C., De Melo, V. C. A., Mosimann, A. L. P., Dos Santos, G. I. V., dos Santos, C. N. D., & Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569–572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>

Zayed, A., Awash, A. a, Esmail, M. a, Al-Mohamadi, H. a, Al-Salwai, M., Al-Jasari, A., ... Mnzava, A. (2012). Detection of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* during 2011 outbreak in Al Hodayda, Yemen. *Acta Tropica*, 123(1), 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.03.004>

Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2006). Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757(5–6), 509–517.

<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.029>

Zoubiri, S., & Baaliouamer, A. (2011). Potentiality of plants as source of insecticide principles. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(6), 925–938.

<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.11.015>

## Apéndices

Apéndice A. Matriz de valores obtenidos por las herramientas *Molinspiration* y *Osiris*.

N°	metabolito	Propiedades fisicoquímicas			Actividad Biológica <sup>2</sup>						Riesgos de Toxicidad <sup>3</sup>				Similitud con drogas	
		peso molecular	LogP	PSA	Ligando GPCR	Modulador de canal iónico	Inhibidor de quinasa	Receptor nuclear	Inhibidor de proteasa	Inhibidor enzimático	Mutagénico	Tumorigénico	Irritante	Efectos reproductivos	<i>Druglikeness</i> <sup>4</sup>	<i>Drug-score</i> <sup>5</sup>
1	Acetato de benzoilo	150.18	1,98	26.30	-0.47	-0.5	-1.55	-1.31	-0.95	-0.25	3	3	3	1	-3.39	0.31
2	Acetato de geranilo	196.29	3.91	26.30	-0.31	0.04	-0.64	-1.21	-1.55	0.21	3	3	3	2	-4.47	0.35
3	Benzoato de bencilo	212.25	3.70	26.30	-0.34	-1.72	-1.26	-0.33	-1.42	-0.38	1	1	3	1	-2.14	0.46
4	Benzoato de metilo	136.15	2.11	26.30	-0.91	-0.01	-2.46	-1.21	-0.48	-0.73	1	1	1	1	-4.77	0.27
5	Biciclosesquifelandreno	204.36	5.52	0	-0.88	-0.1	-1.11	0.10	-1.38	0.03	1	1	1	1	-2.81	0.42
6	β-Bourboneno	204.36	5.54	0	-0.06	0.11	-1.31	0.13	-0.79	-0.19	1	1	1	1	-2.76	0.45
7	β-cariofileno	204.36	5.17	0	-0.09	0.28	-1.26	0.13	-0.95	0.19	1	1	1	1	-2.91	0.27
8	Carvacrol	150.22	3.24	20.23	-0.21	-0.53	-1.5	-1.17	-1.55	-0.57	1	1	1	1	-4.72	0.24

<sup>2</sup> Los valores más positivos indican mayor interacción con la diana biológica (valores positivos resaltados en amarillo).

<sup>3</sup> Los resultados del riesgo de toxicidad se expresan así: 1-libre de toxicidad, 2-medianamente tóxico y 3-tóxico.

<sup>4</sup> Los valores más positivos indican mayor similitud estructural con compuestos biológicamente activos conocidos comercialmente.

<sup>5</sup> Los puntajes más cercanos a 1 indican un comportamiento general (absorción intestinal y riesgo de toxicidad) similar al de los compuestos activos conocidos.

ACTIVIDAD INSECTICIDA DE METABOLITOS SECUNDARIOS

138

9	Carvona	150.22	2.51	17.07	-0.5	-0.4	-1.58	-0.92	-1.42	-0.15	1	1	2	1	-2.9	0.47
10	p-cimeno	134.22	3.90	0	-0.33	-0.37	-0.81	-1.51	-0.48	0.28	1	2	3	1	-3.21	0.11
11	1,8-cineol	154.25	2.72	9.23	-0.56	0.01	-0.78	-1.6	-1.38	-0.43	1	1	1	1	-3.02	0.27
12	Citronelal	154.25	3.60	17.07	-0.86	-0.69	-2.01	-1.29	-0.95	-0.86	1	1	3	1	-1.93	0.06
13	Citronelol	156.27	3.15	20.23	-0.6	-0.08	-1.62	-1.4	-1.55	-0.52	1	1	3	3	-17.98	0.1
14	p-cresil metil eter	122.17	2.44	9.23	-0.86	-0.43	-0.78	-2	-1.42	-0.07	1	1	3	1	-0.17	0.27
15	E-geranial	152.24	3.65	17.07	-1.06	-0.51	-0.87	-1.06	-0.48	0.02	1	3	2	3	-3.17	0.41
16	Z-geranial	152.24	3.65	17.07	-0.47	-0.11	-1.55	-2.07	-1.38	0.02	1	3	3	3	-3.71	0.31
17	Geraniol	154.25	3.20	20.23	-0.81	0.07	-1.17	-1.32	-0.57	0.28	1	1	3	1	-2.82	0.39
18	Germacreno D	204.36	5.43	0	-0.98	-1.13	-0.92	0.32	-0.15	0.26	1	1	1	1	-3.02	0.47
19	$\alpha$ -Humuleno	190.33	4.76	0	-0.79	0.04	-1.51	0.26	0.28	0.33	1	1	1	1	-1.47	0.53
20	Isopulegol	154.25	2.65	20.23	-0.9	-0.54	-1.6	-1.31	-0.43	-0.32	1	1	1	1	-4.24	0.25
21	Limoneno	136.0	3.36	0	-1.18	-0.23	-1.29	-1.21	-0.86	-0.96	1	1	2	1	-2.02	0.5
22	Linalool	154.25	3.23	20.23	-0.47	0.07	-1.4	-0.33	-0.52	0.07	1	1	3	1	-7.43	0
23	Metil chavicol	148	2.82	9.23	-1	-0.14	-2	-1.21	-0.07	-0.38	3	3	3	1	-7.8	0.3
24	$\beta$ -mirceno	136	3.99	0	-1.09	-0.18	-1.06	-0.46	-0.78	-0.73	1	3	3	3	-7.41	0.28

ACTIVIDAD INSECTICIDA DE METABOLITOS SECUNDARIOS

139

25	Neral (citral: geranial y neral)	152.24	3.65	17.07	-0.71	-0.34	-2.07	-0.32	-0.18	0.02	1	1	3	1	-2.78	0.17
26	Nerol	154.25	3.2	20.23	-0.99	0.07	-2.11	-0.96	-0.15	0.28	1	1	3	1	-3.57	0.17
27	Trans- $\beta$ -ocimene	136.24	3.97	0	-0.17	-0.37	-1.37	-0.49	-0.46	0.06	1	1	3	1	-7.31	0.17
28	n-octanol	130.23	3.14	20.23	-0.73	-0.38	-1.4	-1.37	-0.23	-0.38	3	1	3	1	-3.75	0.11
29	$\alpha$ -Pino	136.24	3.54	0	-1.87	-0.73	-0.58	-1.4	-0.27	-0.73	1	1	1	1	-7.56	0.47
30	$\beta$ -Pino	136.24	3.33	0	-0.5	-0.56	-1.4	-0.58	-0.57	-0.56	1	1	1	1	-21.34	0.14
31	Piperitenone	150.22	2.56	17.07	-1.23	-0.24	-1.24	-1.4	-0.15	-0.24	1	1	1	1	-7.53	0.29
32	Piperitone	152.24	3.20	17.07	-0.98	-0.61	-1.04	-1.24	0.28	-0.61	1	1	1	1	-3.02	0.06
33	Sabinene	136.24	3.1	0	-0.81	-0.1	-1.17	-1.04	-0.43	-0.1	1	1	1	1	-1.47	0.29

Apéndice B. CL<sub>50</sub> relativo calculado para los metabolitos.

	<i>C. odorata</i>	<i>C. flexuosus</i>	<i>C. citratus</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>E. citriodora</i>	<i>L. alba</i>	<i>L. origanoides</i>	<i>S. glutinosa</i>	<i>T. lucida</i>			
	CL <sub>50</sub> =52.9	CL <sub>50</sub> =17.1	CL <sub>50</sub> =	CL <sub>50</sub> =20.6	CL <sub>50</sub> =71.2	CL <sub>50</sub> =42.2 ppm	CL <sub>50</sub> =53.3	CL <sub>50</sub> =65.7	CL <sub>50</sub> =66.2			
	ppm	ppm	123.3 ppm	ppm	ppm		ppm	ppm	ppm			
<b>Metabolito</b>	%	CL <sub>50</sub> relat.	%	CL <sub>50</sub> relat.	%	CL <sub>50</sub> relat.	%	CL <sub>50</sub> relat.	%	CL <sub>50</sub> relat.		
Acetato de benzoilo	18.2	9.6278										
Acetato de geranilo			10	1.71								
Benzoato de bencilo	12.3	6.5067										
Benzoato de metilo	10	5.29										
Bicyclosiquiphellandrene							9	3.798				
β-Bourbonene	3.8	2.0102	2	0.342			1.3	0.5486	2.5	1.3325	1.5	0.9855
β-caryophyllene	3.8	2.0102	2	0.342			1.3	0.5486	2.5	1.3325		
Carvacrol								0	32,3	17.2159		
Carvona							38.3	16.1626				
p-cimeno									12	6.396		
1,8-cineol							3.4	2.4208			3	1.971
Citronelal							49.3	35.102				
Citronelol							13	9.256				
p-cresil metil eter	8.4	4.4436										
E-geranial			37.5	6.4125	26	32.058						
Z-geranial			37.5	6.4125	26	32.058						
Geraniol			9	1.539	2.9	3.5757						

Germacreno D	7.8	4.1262										8.1	5.3217		
$\alpha$ -Humuleno							12.9	9.1848			1.4	0.7462			
Isopulegol							12.9	9.1848			1.4	0.7462			
Limoneno					71.3	14.688			31.8	13.4196		4.4	2.8908		
Linalool	14.1	7.4589		1.8	2.2194	5.4	1.1124	2.9	2.0648					0.3	0.1986
Metil chavicol														92.1	60.97
$\beta$ -mirreno				20.2	24.907	5	1.03				2.8	1.4924		5.9	3.9058
Neral (citrinal: geranial y neral)			28.2	4.8222	29	35.757								5.9	3.9058
Nerol				3	3.699										
Trans- $\beta$ -ocimene						2	0.412							1.3	0.8606
n-octanol						2	0.412							1.3	0.8606
$\alpha$ -Pino	1.5	0.7935										12	7.884		
$\beta$ -Pino							2.9	2.0648	4.4	1.8568		49.6	32.5872		
Piperitenone							2.9	2.0648	4.4	1.8568		49.6	32.5872		
Piperitone									2.6	1.0972					
Sabinene						1.6	0.3296					11	7.227		

En la tabla se reporta el porcentaje (%) de cada metabolito en el aceite esencial y al frente el CL<sub>50</sub> relativo calculado (CL<sub>50</sub> relat.)