

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL *Cymbopogon flexuosus* SOBRE  
LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL**

**DIANA CAROLINA MONTAGUT GUEVARA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUIMICA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL *Cymbopogon flexuosus* SOBRE  
LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL**

**DIANA CAROLINA MONTAGUT GUEVARA**

**Trabajo de grado para optar al título de Química**

**Directora:**

**Dra. STELIA CAROLINA MENDEZ SANCHEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUIMICA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

## DEDICATORIA

*Primero que todo agradezco a Dios, por su protección y por todas las bendiciones que me ha enviado, también por haberme permitido llegar hasta este punto y gozar de buena salud tanto a mi como a mi familia, por ayudarme a cumplir mis objetivos y metas, con su infinita bondad y amor.*

*A mi madre Claudia Magally Guevara Bohórquez, por haberme apoyado en todo momento. Por su amor fiel e incondicional. Gracias por toda una vida de sacrificios para brindarme todo lo que me ha dado. Por que sin importar que pase, donde tú estés siempre será mi hogar.*

*A mi hermana Ana María Montagut Guevara por ser siempre mi ejemplo a seguir y mi compañera de aventuras, gracias por vivir siempre las experiencias y luego compartirlas conmigo, para no cometer los mismos errores, gracias por enseñarme a ser independiente y a la vez fuerte.*

*A mi novio Andrés Felipe León Rojas, quien me apoyo y me acompaño en todos los momentos difíciles de mi vida personal y académica. No importa lo que pase le agradezco a Dios haber podido conocerte, y no cambiaría nada pues contigo aprendí lo valioso que puede ser alguien ajeno a mi familia.*

*A mi nonita María Teresa Bohórquez de Guevara, que me enseñó a sumar, restar, multiplicar y dividir durante mi época escolar. Gracias por enseñarme lo frágiles y fuertes que podemos llegar a ser y por cuidarme y consentirme siempre que podía.*

*A mi nonito Luis María Guevara Duarte por ser un hombre fuerte y luchador, que siempre estuvo pendiente de nosotras, por sus concejos, el cariño con el que siempre supe que contaba y cuento actualmente.*

*A mi amigos Luis Carlos, Brayann, Isidro y Gonzalo por su apoyo y su compañía durante nuestra formación profesional, por todas esas risas y peleas que hemos compartido juntos. Y que espero que siempre, sigamos siendo amigos (¡los adoro!).*

**Diana Carolina Montagut Guevara**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a la Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y por su apoyo incondicional en el transcurso de este.

Gracias al grupo de investigación de bioquímica y microbiología en el cual desarrolle este proyecto y a todos mis compañeros quienes siempre estuvieron atentos a enseñarme y corregirme de ser necesario.

Gracias a la Universidad Industrial de Santander, en la cual desarrolle mi meta de llegar a ser profesional, orgullosa de adquirir los conocimientos en el transcurso de esta carrera universitaria.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION .....	17
1. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS .....	18
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
2. MARCO TEÓRICO .....	19
2.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN LA MITOCONDRIA.....	19
2.1.1. Efecto de compuestos orgánicos sobre la bioenergética mitocondrial. ....	19
2.2. ACEITE ESENCIAL DE <i>CYMBOPOGON FLEXUOSUS</i> .....	22
2.3. MITOCONDRIA .....	23
2.4. FARMACOLOGÍA .....	25
2.5. FARMACOLOGÍA MITOCONDRIAL .....	26
2.6. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (FO).....	27
2.6.1. Sistemas de lanzaderas .....	29
2.6.2. Complejo I (NADH deshidrogenasa) .....	30
2.6.3. Complejo II (Succinato deshidrogenasa).....	31
2.6.4. Complejo III (Complejo citocromo bc1) .....	32
2.6.5. Complejo IV (Citocromo C oxidasa).....	33
2.6.6. ATP sintasa.....	33
2.7. INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA.....	34
2.8. DESCOPLADORES DE LA CADENA RESPIRATORIA.....	35
2.9. APOPTOSIS .....	36
2.10. ESPECIES REACTIVAS .....	40
2.11. ELECTRODO DE OXÍGENO .....	43
3. MATERIALES Y METODOS .....	44
3.1. REACTIVOS.....	44
3.2. ANIMALES.....	44
3.3. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATA .....	44
3.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES EN LA SUSPENSIÓN.....	45
3.5. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO.....	45

3.6. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE MITOCONDRIAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS MITOCONDRIALES.....	46
3.6.1. NADH oxidasa .....	46
3.6.2. NADH deshidrogenasa .....	47
3.6.3. NADH citocromo C reductasa.....	47
3.6.4. Succinato oxidasa .....	47
3.6.5. Succinato deshidrogenasa.....	47
3.6.6. Succinato citocromo C reductasa.....	48
3.6.7. Citocromo C oxidasa .....	48
3.6.8. Actividad ATPasa en mitocondrias intactas .....	48
3.6.9. Actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas.....	49
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	50
4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	50
4.2. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Cymbopogon flexuosus</i> EN LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.....	50
4.3. EFECTO DEL <i>C. flexuosus</i> SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS DE LA CADENA RESPIRATORIA.....	54
4.3.1. NADH oxidasa .....	54
4.3.2. NADH deshidrogenasa .....	55
4.3.3. NADH Citocromo C Reductasa.....	56
4.3.4. Succinato oxidasa .....	57
4.3.5. Succinato deshidrogenasa.....	58
4.3.6. Succinato citocromo c reductasa .....	59
4.3.7. Citocromo C Oxidasa .....	60
4.3.8. Actividad ATPasa con mitocondria íntegra.....	61
4.3.9. Actividad ATPasa con mitocondria fragmentada.....	62
5. DISCUSION .....	64
6. CONCLUSIONES.....	68
7. DIVULGACIONES.....	69
8. RECOMENDACIONES.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	71
BIBLIOGRAFIA .....	81
ANEXOS .....	93

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura general de la succimida 1, la maleimida 2 y la glutarimida 3. ....	19
<b>Figura 2.</b> Estructura química de algunos de los compuestos evaluados por Prado y colaboradores. La maleimida 4 y las glutarimidias 5 y 6. ....	20
<b>Figura 3.</b> Estructura química de los derivados del cloruro de (E)-3-fenil-5-(fenilamino)-2-estiril-1,3,4-tiadiazol-3-io 7-10. ....	21
<b>Figura 4.</b> Estructura química de los metabolitos secundarios del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> . ....	22
<b>Figura 5.</b> Estructura de la mitocondria. ....	24
<b>Figura 6.</b> La cadena transportadora de electrones (complejo I, II, III, IV) emplea la energía liberada por la oxidación del NADH para sintetizar ATP (la moneda energética de la célula), mediante la fosforilación oxidativa. La hipótesis quimiosmótica de Mitchell establece que los complejos de la cadena transportadora de electrones (excepto el complejo II) acoplan el transporte de electrones al bombeo de protones y que el gradiente de protones es empleado para la síntesis de ATP por medio del complejo V (ATPasa). ....	28
<b>Figura 7.</b> Lanzadera malato-aspartato. ....	30
<b>Figura 8.</b> El complejo II se compone de cuatro subunidades sdhA (subunidad de flavoproteína que contiene FAD unido covalentemente al sitio activo, shdB (subunidad proteica de hierro-azufre, que contiene una cadena de tres grupos de sulfuro de hierro [2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S], sdhC y sdhD (transmembrana de la subunidades citocromo b que contiene fracciones hemo). ....	32
<b>Figura 9.</b> Estructura ATPasa. ....	34
<b>Figura 10.</b> Algunos desacopladores de la fosforilación oxidativa. 2,4-dinitrofenol 11 (DNP). Carbonilcianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona 12 (FCCP). Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona 13 (CCCP). ....	36
<b>Figura 11.</b> Los cambios morfológicos que sufre la célula durante la apoptosis. En donde, inicialmente se condensa la cromatina a lo largo de la periferia nuclear, luego el núcleo y el citoplasma se fragmenta, formando cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados por células circundantes. ....	38
<b>Figura 12.</b> Mecanismos que llevan a la apoptosis. En donde se muestran activadores internos de la apoptosis como oncogenes, supresores de tumores como p53 y antimetabolitos privadores de nutrientes, al igual que el daño celular, la familia Bcl-2 compuesta por miembros antiapoptóticos y proapoptóticos que determinan la vida o la muerte de una célula y por último el citocromo c el cual es el más poderoso conductor de la apoptosis. ....	40
<b>Figura 13.</b> Representación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el mitocondria en donde se afirma que la mayor parte del $O_2^-$ generado por las mitocondrias de mamíferos (a partir de ensayos in vitro) es producido por el Complejo I; la contribución de los otros complejos y sitios parece ser relativamente baja. Así la producción $O_2^-$ se obtiene principalmente en la matriz al lado de la membrana mitocondrial interna. ....	41
<b>Figura 14.</b> Electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo de Pt, inmersos en una solución de KCl y en contacto con la cámara de muestra a través de una membrana permeable al O. El $O_2$ se reduce a $H_2O$ en el electrodo de Pt, y genera de ese modo un voltaje con respecto al electrodo de Ag/Cl que es proporcional a la concentración de $O_2$ presente en la cámara. <sup>67</sup> ....	43
<b>Figura 15.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre la velocidad del consumo de oxígeno en presencia de ADP (0.6 mM) con glutamato(5 mM) - malato(2,5 mM) y succinato (3 mM), 100% de actividad corresponde a $44,32 \pm 18,18$ ( Glutamato-Malato), y $52,40 \pm 16,21$ (succinato) nmol de $O_2$ consumido por $min^{-1} \cdot mg^{-1}$ de proteína respectivamente *significativamente ( $p \leq 0.05$ ). ....	51
<b>Figura 16.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP con Glutamato (5 mM)-Malato (2,5 mM) respectivamente y succinato (3 mM), 100% de	

actividad corresponde a $5,13 \pm 2,24$ (Glutamato-Malato), y $13,28 \pm 4,42$ (Succinato) nmol de $O_2$ consumido por $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína respectivamente * significativamente ( $p \leq 0,05$ ).....	52
<b>Figura 17.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre el coeficiente de control respiratorio (CCR) con Glutamato (5mM)-Malato (2,5 mM) y succinato (3mM)- Rotenona (10 $\mu\text{M}$ ), 100% de actividad corresponde a $2,39 \pm 1,46$ y $4,89 \pm 2,66$ respectivamente. Cada valor representa el valor promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimento independientes por triplicado cada uno,* significativamente ( $p \leq 0,05$ ). .....	53
<b>Figura 18.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre la enzima NADH oxidasa. Cada valor representa el promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de $27,49 \pm 18,96$ nmol de NADH oxidado $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. * Significativamente diferente del control (100%), $p \leq 0,05$ . .....	55
<b>Figura 19.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre la enzima NADH Deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de $1,361 \pm 0,028$ nmol de ferrocianuro reducido por $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. * Significativamente diferente del control (100%), $p \leq 0,05$ . .....	56
<b>Figura 20.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre la enzima NADH citocromo c reductasa. Cada valor representa el promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de $40,91 \pm 15,06$ $\mu\text{mol}$ de citocromo c reducido por $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. * Significativamente diferente del control (100%), $p \leq 0,05$ . .....	57
<b>Figura 21.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre la enzima NADH oxidasa. Cada valor representa el promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de $15,83 \pm 5,60$ nmol de succinato oxidado $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. * Significativamente diferente del control (100%), $p \leq 0,05$ . .....	58
<b>Figura 22.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre la enzima Succinato deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de $44,71 \pm 5,93$ $\mu\text{mol}$ de DCPIP reducido por $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. * Significativamente diferente del control (100%), $p \leq 0,05$ . .....	59
<b>Figura 23.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre la enzima Succinato deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de $41,45 \pm 4,32$ $\mu\text{mol}$ de citocromo c reducido por $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. * Significativamente diferente del control (100%), $p \leq 0,05$ . .....	60
<b>Figura 24.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre Citocromo c oxidasa. Cada valor representa el promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de $41,45 \pm 4,32$ $\mu\text{mol}$ de citocromo c reducido por $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína mitocondrial. * Significativamente diferente del control (100%), $p \leq 0,05$ . .....	61
<b>Figura 25.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre la actividad ATPasa en mitocondrias íntegras. Cada valor representa el promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes.* Significativamente diferente del control ( $p \leq 0,05$ ) (a) Utilizando una concentración de 0 ppm del aceite (control) 100% de actividad corresponde a $0,64 \pm 0,15$ mmol Pi liberado $\text{mg}^{-1}$ de proteína (b) Muestra tratada con FCCP (1 $\mu\text{M}$ ): $1,14 \pm 0,37$ mmol Pi liberado $\text{mg}^{-1}$ de proteína (c) Ensayo realizado con <i>C. flexuosus</i> 10 ppm: $0,26 \pm 0,11$ mmol Pi liberado $\text{mg}^{-1}$ de proteína. ....	62
<b>Figura 26.</b> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> sobre la actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas. Cada valor representa el promedio $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes.* Significativamente diferente del control ( $p \leq 0,05$ ), actividad ATPasa mitocondria fragmentada 100% de actividad corresponde a $0,277 \pm 0,130$ $\mu\text{mol}$ de Pi hidrolizado. ....	63
<b>Figura 27.</b> Estructura química del trans- $\beta$ -cariolifelo y el nerolidol. ....	67

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Inhibidores más comunes de la cadena respiratoria. ....	35
<b>Tabla 2.</b> Lista de algunos de los agentes inhibidores e inductores de la apoptosis.....	37
<b>Tabla 3.</b> Efecto del <i>C. flexuosus</i> sobre la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria. ....	65
<b>Tabla 4.</b> Efecto del <i>C. flexuosus</i> sobre la actividad de la enzima ATPasa .....	66

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Divulgación de resultados .....	96
---	----

## RESUMEN

### ESTUDIO DEL EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL *Cymbopogon flexuosus* SOBRE LA BIONERGÉTICA MITOCONDRIAL\*

Diana Montagut, y Stelia Méndez\*\*

**Palabras clave:** Aceite esencial, mitocondria, transporte de electrones, apoptosis.

El objetivo principal de este trabajo fue investigar la relación entre el efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* en cuatro concentraciones diferentes (10 ppm, 25 ppm, 50 ppm y 100 ppm) frente a la mitocondria. Al evaluar el efecto del sustrato glutamato-malato, la tasa de respiración del estado 3 se vio fuertemente disminuida a partir de la concentración de 25 ppm (con diferencias estadísticamente significativas  $p \leq 0.05$ ). Mientras que con succinato solo se observaron diferencias estadísticamente significativas a partir de la concentración de 50 ppm. La respiración del estado 4 fue estimulada únicamente con succinato a partir de la concentración de 50 ppm, mientras que con glutamato-malato el aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* no mostró ningún efecto en las cuatro concentraciones evaluadas. El coeficiente de control respiratorio (CCR) mostró inhibición desde la concentración de 50 ppm con glutamato-malato y una fuerte inhibición con succinato a partir de la concentración de 10 ppm, por lo cual se analizaron segmentos de la cadena respiratoria (en mitocondrias fragmentadas) a 10 ppm del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*. Los resultados indican que los complejos mitocondriales de succinato deshidrogenasas (complejo II) y citocromo c oxidasa (complejo IV) son inhibidos por el aceite. En conclusión, el aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* inhibe el transporte de electrones de la cadena respiratoria (en los complejos II y IV), alterando así el potencial de membrana además de inducir el escape de un mayor número de electrones lo que facilita la generación de especies reactivas de oxígeno, lo cual podría inducir la muerte celular.

---

\* Trabajo de Investigación

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Química, directora. Stelia Carolina Méndez Sánchez, Dra. Doctorado en Ciencias Bioquímicas

## ABSTRACT

### STUDY OF THE EFFECT OF ESSENTIAL OIL ON *Cymbopogon flexuosus* MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS\*

Diana Montagut, and Stelia Méndez\*\*

**Keywords:** Essential oil, mitochondria, electron transport, apoptosis.

The main objective of this work was to investigate the relationship between the effect of the essential oil of *Cymbopogon flexuosus* in four different concentrations (10 ppm, 25 ppm, 50 ppm and 100 ppm) versus mitochondria. In evaluating the effect of glutamate-malate substrate respiration rate from state 3 was greatly diminished from the concentration of 25 ppm (with statistically significant differences  $p \leq 0.05$ ). Succinates while only statistically significant from 50 ppm concentration differences were observed. State 4 respiration was stimulated only succinate from the concentration of 50 ppm, while glutamate-malate essential oil of *Cymbopogon flexuosus* showed no effect on the four concentrations evaluated. Respiratory control ratio (CCR) showed inhibition from the concentration of 50 ppm with glutamate-malate and succinate strong inhibition from the concentration of 10 ppm, whereby the respiratory chain segments were analyzed (in mitochondria fragmented) 10 ppm of essential oil of *Cymbopogon flexuosus*. The results indicate that mitochondrial succinate dehydrogenase complex (complex II) and cytochrome c oxidase (complex IV) are inhibited by the oil. In conclusion, the essential oil of *Cymbopogon flexuosus* inhibits electron transport in the respiratory chain (in complex II and IV), thereby altering the membrane potential leak besides inducing a greater number of electrons which facilitates the generation of reactive oxygen species, which could induce cell death.

---

\* Research Work

\*\* Faculty of Science, School of Chemistry, Director. Stelia Carolina Méndez Sánchez, Dra. Doctoral degree in Biochemical Sciences.

## ABREVIATURAS

(OH)	Hidroxil
2,4-DNC	2,4-dinitrocresol
2,4-DNP	2,4-dinitrofenol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difisfato
AEs	Aceite esenciales
ATC	Ácidos tricarbóxicos
ATP	Adenosín trifosfato
BAL	Anti-lewisita Britanica
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Catalasa
CCCP	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
CCR	Coficiente de control respiratorio
CN	Cianuro
DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol
DNP	2,4-dinitrofenol
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
EGTA	Ácido etilenglicol bis (2-aminoetiléter) tetraacético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAD <sup>+</sup>	Flavida adenina dinucleótido (forma oxidada)
FADH <sub>2</sub>	Flavida adenina dinucleótido (forma reducida)
FCCP	Carbonilcianuro p-trifluorometoxi fenilhidrazona
FMN	Flavín mononucleótido
FO	Fosforilación oxidativa
GSH	Glutación
GSSG	Disulfuro de glutación
GST	Glutación S-tranferasa
KCl	Cloruro de Potasio
LOO <sup>·</sup>	Lipídico peroxil
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
N <sup>3-</sup>	Azida
NaCN	Cianuro de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)

NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADH-Q	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidoreductasa
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
Pi	Fosfato inorgánico
PMS	Metosulfato de fenazina
Prxs	Fosfato inorgánico
RO	Alcoxil
ROO	Peroxil
Sdh	Subunidad proteica ion-sulfuro
TCA	Ácido tricloroacético
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

## INTRODUCCION

Gran parte del conocimiento actual e histórico acerca de las propiedades medicinales de las plantas, se basa en la comprensión empírica del uso de diferentes aceites como remedios caseros. Sin embargo, el interés científico acerca de su posible uso como fármaco ha aumentado enormemente en los últimos años, se ha demostrado que aceites esenciales (AEs) de diversos géneros poseen propiedades antifúngicas,<sup>1</sup> antimicrobianas<sup>2</sup> e incluso anticancerígenas.<sup>3</sup>

En el caso del aceite esencial extraído de *Cymbopogon flexuosus* (nombre común hierba de limón)<sup>4</sup>, se ha estudiado su citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano de colon (502713), neuroblastoma (IMR-32), hepatoma (HEP-G-2) y de cérvix (SiHa) encontrando IC<sub>50</sub> que variaban desde 4,2 a 79 µg/mL<sup>3</sup> y en células de leucemia humana HL-60 (IC<sub>50</sub>~30 µg/mL).<sup>5</sup>

A pesar de que el *Cymbopogon flexuosus* presenta diversas actividades biológicas, aún no se ha elucidado su mecanismo de acción. En este trabajo, se evaluó el efecto del *C. flexuosus* sobre la bioenergética mitocondrial, esta organela posee el papel crítico de controlar la supervivencia celular (al inducir necrosis o apoptosis) y la producción de ATP, a través de procesos estrictamente regulados como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC) o ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.<sup>6</sup> El aceite esencial inhibió el consumo de oxígeno en presencia de glutamato-malato y succinato, a partir de la concentración de 10 µg/mL y presentó inhibición de los complejos II (succinato ubiquinona oxidoreductasa) y IV (complejo citocromo c oxidasa) de la cadena respiratoria, induciendo posibles alteraciones del potencial de membrana. Estos resultados pueden ser en parte responsables de los efectos citotóxicos del aceite esencial.<sup>3</sup> Se ha demostrado que inhibiciones en los complejos de la cadena respiratoria está relacionada con efectos citotóxicos de agentes xenobióticos,<sup>7</sup> lo que sugiere que los efectos del *C. flexuosus* sobre la cadena respiratoria puede contribuir a su citotoxicidad en células cancerígenas como las nombradas anteriormente.

## **1. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS**

### **1.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la bioenergética de mitocondrias aisladas de hígado de rata.

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar los efectos del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre los siguientes parámetros mitocondriales, utilizando glutamato y succinato como sustratos oxidables:

- Consumo de oxígeno en la presencia de ADP (estado 3);
- Consumo de oxígeno después del consumo de ADP (estado 4);
- Coeficiente de control respiratorio (CCR);
- Actividad de las enzimas de la cadena respiratoria (NADH oxidasa, NADH citocromo c reductasa, NADH deshidrogenasa, succinato citocromo c reductasa, succinato deshidrogenasa, citocromo c oxidasa y ATPasa).

## 2. MARCO TEÓRICO

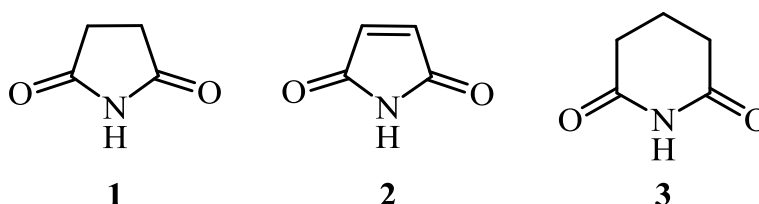
### 2.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN LA MITOCONDRIA.

Actualmente no se conoce información acerca del mecanismo de acción de aceites esenciales (AEs) sobre la bioenergética mitocondrial, sin embargo, a diferencia de los AEs existen varias investigaciones que relacionan compuestos orgánicos con su actividad farmacología, a través de su efecto sobre la mitocondria, algunos de ellos se muestran a continuación:

#### 2.1.1. Efecto de compuestos orgánicos sobre la bioenergética mitocondrial.

Prado y colaboradores<sup>8</sup> evaluaron el efecto de derivados de imidas cíclicas (succinimidas, maleimidas y glutarimidas, derivados mesoiónicos y enantiómeros, entre otros) sobre los parámetros respiratorios mitocondriales, la viabilidad celular y la actividad antibacteriana (**Figura 1**).

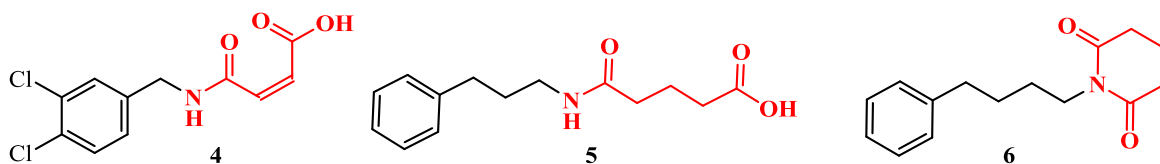
**Figura 1.** Estructura general de la succinimida **1**, la maleimida **2** y la glutarimida **3**.



Los resultados indicaron que la maleimida **4** y las glutarimidas **5** y **6** (**Figura 2**) causaron un aumento en el consumo de oxígeno en presencia (estado 3) o ausencia de ADP (estado 4), mientras que los compuestos restantes disminuyeron esos parámetros en diferentes grados. Todos los compuestos evaluados inhibieron el coeficiente de control respiratorio (CCR).

**Figura 2.** Estructura química de algunos de los compuestos evaluados por Prado y colaboradores.<sup>8</sup>

La maleimida **4** y las glutarimididas **5** y **6**.



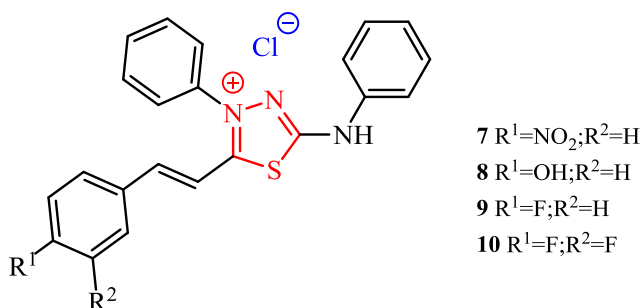
Los autores proponen que la influencia que ejercen los sustituyentes, inhiben de forma considerable el consumo de oxígeno (*e.g.*, las imidas cíclicas sustituidas por cloro). Así, características como el tamaño y grupos sustituyentes, se consideran como factores importantes para la diversidad de efectos biológicos provocados por las imidas.<sup>8</sup>

Pires y colaboradores<sup>9</sup> investigaron la relación entre los efectos de cuatro derivados mesoiónicos del 1,3,4-tiadiazolio **7-10** y su estructura química (**Figura 3**) sobre la bioenergética mitocondrial a través de ensayos *in vitro*, encontrando que el estado 3 fue fuertemente inhibido por los derivados **9** y **10** ( $130 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína) con glutamato-malato (a diferencia de la leve inhibición frente al sustrato succinato), mientras el estado 4, CCR y la relación ADP/O fue fuertemente estimulada por los cuatro derivados ( $6.5 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína).

A partir de sus estudios en mitocondrias fragmentadas, demostraron que los derivados mesoiónicos inhibían los complejos I y IV, mientras que en mitocondrias intactas los compuestos aumentaban la actividad de ATPasa por  $\sim 120\%$ ,  $\sim 207\%$  y  $\sim 261\%$  para **8**, **9** y **10** ( $32.5 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína), respectivamente. Finalmente, los autores concluyen que la intensidad de los efectos de estos compuestos depende de sus sustituyentes. Así la presencia de sustituyentes como el flúor en el anillo cinamoilo, causó una intensificación de

sus funciones y mostraron que la hidrofobicidad es más importante que el efecto electrónico (correlacionado con su actividad antimelanoma).<sup>9</sup>

**Figura 3.** Estructura química de los derivados del cloruro de (*E*)-3-fenil-5-(fenilamino)-2-estiril-1,3,4-tiadiazol-3-ilo **7-10**.<sup>10</sup>

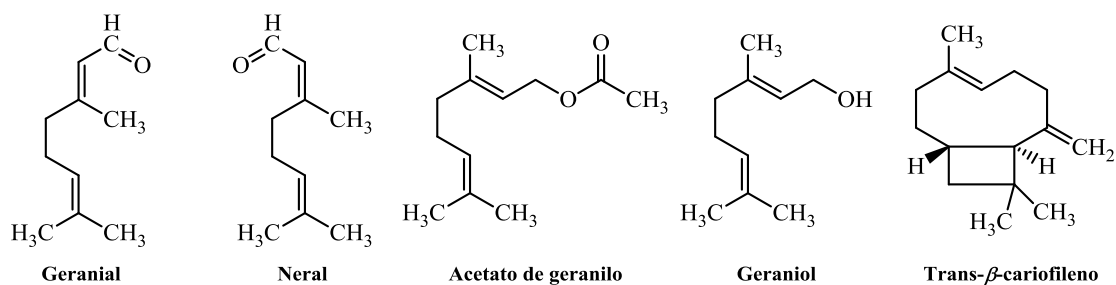


Abraham y colaboradores,<sup>10</sup> evaluaron los efectos de cuatro monoterpenos (alcanfor, eucaliptol, limoneno y  $\alpha$ -pineno) en el metabolismo oxidativo de mitocondrias aisladas de la raíz del maíz. Ellos demostraron que en concentraciones entre 0,05-1,0 mM, el  $\alpha$ -pineno estimuló la respiración (en una mezcla de sustratos compuestos de NADH, L-malato, succinato, y L-glutamato, y en ausencia de ADP exógeno), mientras que a concentraciones superiores a 1,0 mM, inhibió la respiración tanto en ausencia como en presencia de ADP. Así mismo, el limoneno a concentraciones tan bajas como 0,1 mM estimuló la respiración en ausencia de ADP (estado 4), por el contrario, en presencia de ADP inhibió la respiración. El alcanfor estimuló el estado 4, pero no afectó la respiración en presencia de ADP. Los autores concluyeron que los monoterpenos más lipófilos ( $\alpha$ -pineno y limoneno) presentaron menor actividad que los monoterpenos oxigenados solubles en agua (alcanfor y eucaliptol), en la inhibición de la germinación de las semillas y/o el crecimiento de las raíces primarias, pese a que los primeros presentaron una mayor actividad en el metabolismo oxidativo de la mitocondria.<sup>10</sup>

## 2.2. ACEITE ESENCIAL DE *CYBOPOGON FLEXUOSUS*

Existen alrededor de 120 especies de plantas que pertenecen al género *Cymbopogon*, entre las que se distinguen por su importancia farmacológica al *C. nardus*, *C. winterrianus*, *C. flexuosus*, *C. Martini* y *C. citratus*.<sup>11</sup> Las cuales están constituidas principalmente por una variada combinación de compuestos terpénicos en sus AEs.

El AE del género *Cymbopogon* es rico en fuentes de monoterpenoides, en donde, el *C. flexuosus* contiene aproximadamente un 60% de sesquiterpenos.<sup>12</sup> Los componentes mayoritarios del aceite (**Figura 4**) varían porcentualmente entre los compuestos citral (geranial 37.5% y neral 28.22%), acetato de geranilo (10%), geraniol (9%) y trans- $\beta$ -cariofileno (2%)<sup>13,14,15</sup> (los rangos porcentuales son aproximados dependiendo del polimorfismo químico del aceite), los porcentajes mostrados corresponden a los determinados por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales-CENIVAM.



**Figura 4.** Estructura química de los metabolitos secundarios del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*.

De las aplicaciones biológicas que pueden ejercer los compuestos mayoritarios del *C. flexuosus* se destacan la inhibición del crecimiento de bacterias<sup>16</sup> y hongos, a una concentración de 0.50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ <sup>17</sup> (dosis dependiente de la bacteria u hongo evaluado) al igual que el geraniol y el acetato de geranilo el cual presenta un efecto antimicrobiano<sup>2</sup> y

fungicida a una concentración mínima entre 0.16 -0.64  $\mu\text{L}/\text{Ml}$ .<sup>18</sup> Además los componentes citral, geraniol y acetato de geraniol también han demostrado un efecto anticancerígeno en varias líneas de cáncer.<sup>19,20</sup>

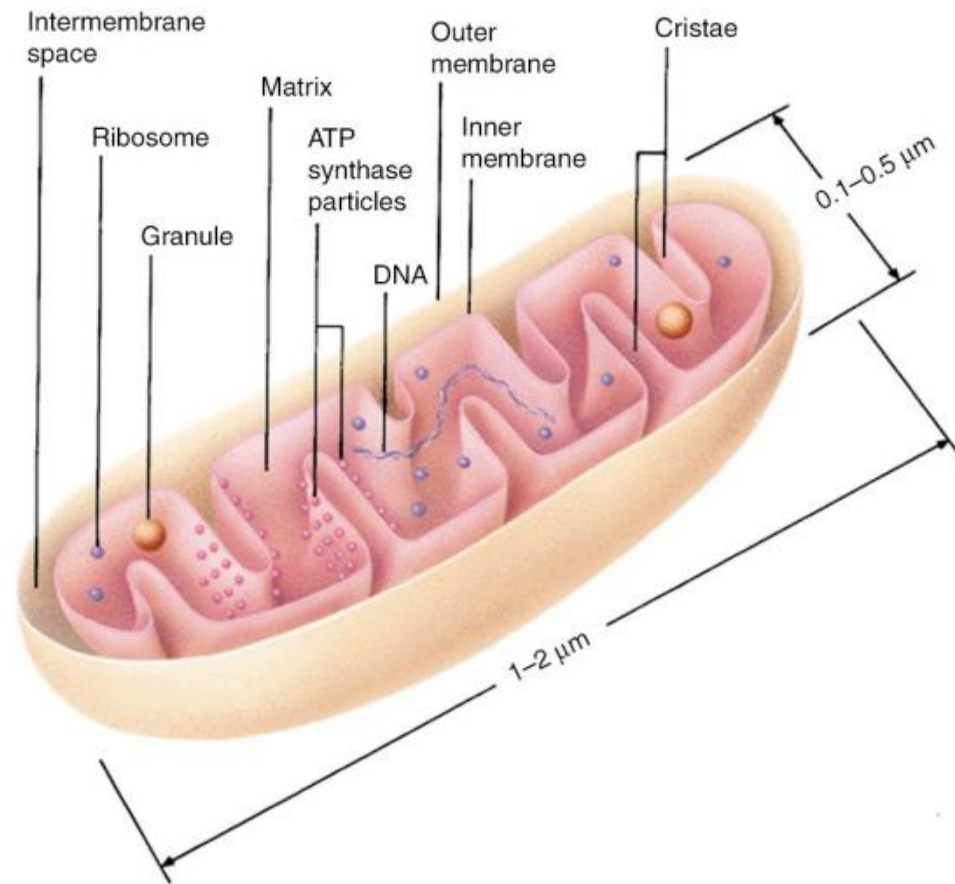
Mientras el trans- $\beta$ -cariofileno ha demostrado poseer un efecto anti-leishmaniótico (enfermedad tropical),<sup>21</sup> anti-inflamatorio<sup>22</sup> y al igual que los componentes del *C. flexuosus* anteriormente mencionados, también posee propiedades antimicrobianas, antifúngicas y anticancerígenas.<sup>23,24</sup> Sin embargo, los AEs son considerados más potentes que sus constituyentes, debido a su sinergia.<sup>25</sup> Además, al ser de naturaleza lipofílica, los AEs pueden cruzar la membrana plasmática y ejercer su efecto al interactuar con proteínas intracelulares y/o sitios intraorganelo,<sup>25</sup> lo que lo convierte en un posible fármaco con efecto selectivo.

### 2.3. MITOCONDRIA

Los organelos son subunidades especializadas, las cuales están separadas del citoplasma a través de las membranas lipídicas. En donde la mitocondria es uno de los organelos más estudiados,<sup>26</sup> y dinámicos, el cual tiene un rol crucial en la conversión de energía celular y en la regulación de la apoptosis.<sup>27</sup>

La mitocondria está conformada por dos membranas, una interna y otra externa (**Figura 5**), la membrana interna es permeable a pequeños metabolitos y encierra la matriz mitocondrial,<sup>28</sup> en donde la mayoría de las reacciones bioquímicas tienen lugar, mientras que la membrana externa permite el intercambio de sustancias con el medio citoplasmático.<sup>29,30</sup>

**Figura 5.** Estructura de la mitocondria.<sup>30</sup>



La mitocondria ocupa una posición única en el metabolismo por funciones como la señalización intracelular, la regulación de la muerte celular, la modulación de flujos de calcio en toda la célula,<sup>31,32</sup> la fosforilación oxidativa, el ciclo de los ácidos tricarbónicos, oxidación de los ácidos grasos y metabolismo de aminoácidos.<sup>33</sup> Una posible desorganización en alguno de estos procesos pone a la red metabólica en peligro, ya que induce procesos como el estrés oxidativo o nitrosativo que pueden alterar componentes claves del proceso metabólico<sup>31</sup> y por consiguiente generar el deterioro de las funciones mitocondriales, las cuales están vinculadas con impedimentos físicos y cognitivos. De esta forma una función mitocondrial adecuada se ha convertido para algunos científicos como una prometedora estrategia terapéutica.<sup>31,34</sup>

Con base en lo anterior, la mitocondria se ha convertido en un modelo para evaluar fármacos, en donde la entrega específica de los medicamentos a las mitocondrias puede proporcionar la base para tratar una variedad de enfermedades en las que estas funciones están des-reguladas.<sup>35</sup>

## **2.4. FARMACOLOGÍA**

En general, un fármaco puede definirse como cualquier sustancia que genera un cambio en una función biológica a través de acciones químicas.<sup>36</sup> En un sentido más restringido, es toda sustancia química utilizada en el tratamiento, la curación, prevención, el diagnóstico de una enfermedad, o para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado.<sup>37</sup> La farmacología es una disciplina amplia que describe en general el uso de productos químicos para tratar y curar enfermedades. Esta se divide en sub-disciplinas como la farmacocinética (evalúa la disposición de drogas en el cuerpo), farmacia (estudio de la formulación química de los fármacos para optimizar la absorción y distribución en el cuerpo), farmacognosia (estudio de los productos naturales de plantas y su uso en el tratamiento de enfermedades) y farmacodinámica (estudio de la interacción molécula-objetivo biológico).<sup>38,39</sup>

Actualmente se conocen principalmente tres clases diferentes de compuestos con aplicación en la medicina, las moléculas de síntesis combinatoria (diseño de fármacos asistido por computadora), los productos naturales, y los fármacos.<sup>40</sup> En donde, las moléculas de síntesis combinatoria se ha convertido en la principal fuente de nuevas sustancias químicas, sin embargo, este rápido incremento no se asemeja al número de drogas que se han comercializado.<sup>41</sup>

De los productos naturales como fármacos, se conocen cuatro funciones principales:

- Las plantas medicinales proporcionan fármacos sumamente útiles en la medicina, entre los que se incluyen diversos alcaloides.
- Las fuentes naturales proporcionan compuestos que pueden modificarse en su estructura química obteniendo así compuestos más eficientes y menos tóxicos.
- Sirven como prototipos o modelos para la síntesis de nuevos fármacos con propiedades farmacológicas similares a las productos originales.<sup>39</sup>
- Algunos de ellos, tiene poca o ninguna actividad terapéutica, pero al modificar su estructura por métodos biológicos o químicos, se producen drogas más potentes.<sup>39</sup>

## **2.5. FARMACOLOGÍA MITOCONDRIAL**

La disfunción mitocondrial es inherente a una variedad de trastornos que se originan a partir de mutaciones del ADN mitocondrial, que involucran vías de señalización mitocondrial, moduladas desde su dinámica hasta su culminación en la muerte celular. Debido a esto no es sorprendente que el desarrollo de terapias dirigidas hacia la mitocondria se haya convertido en uno de los focos principales de la investigación científica.<sup>42</sup>

La farmacología mitocondrial es una de las pocas terapias que puede tratar pacientes con una amplia gama de trastornos mitocondriales,<sup>33</sup> como alteraciones en el metabolismo glucolítico, lipídico y desordenes en el gasto energético.<sup>43</sup> Que pueden ocasionar enfermedades como la diabetes tipo 2 (acumulación de lípidos en el músculo esquelético, tejido adiposo y el hígado debido a la disfunción mitocondrial), enfermedades neurodegenerativas (como por ejemplo, párkinson, alzhéimer, huntington y esclerosis lateral amiotrófica) e isquemia/reperfusión-IR (subyace a la lesión hepática que acontece en situaciones clínicas), entre otras.<sup>44,45</sup>

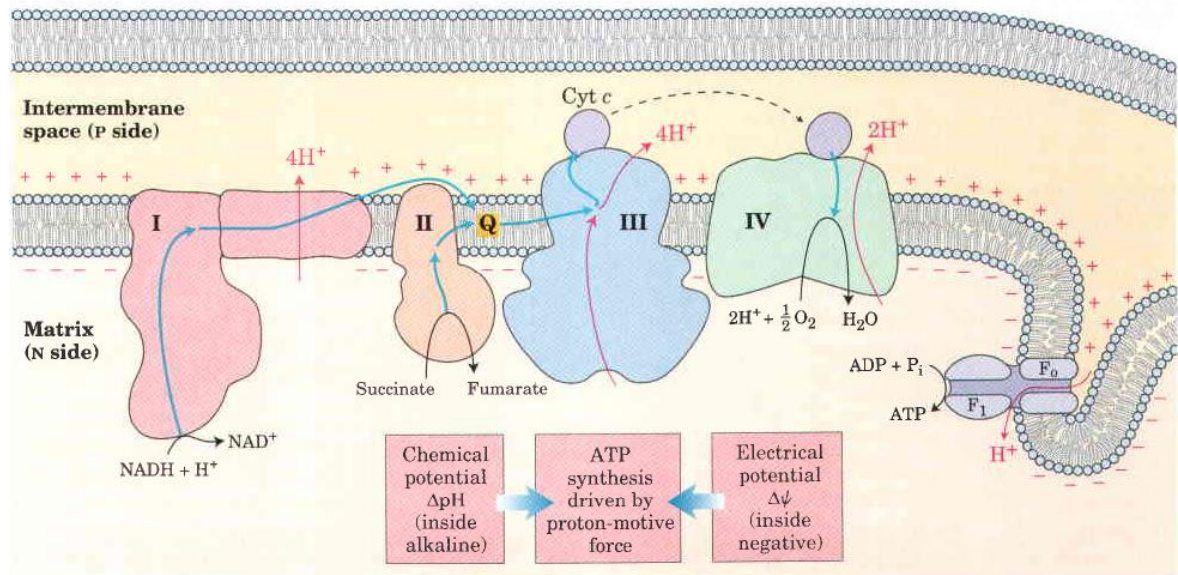
En esta área de la farmacología se espera dirigir los fármacos hacia la mitocondria, de tal forma que al orientar moléculas biológicamente activas se pueda manipular las funciones mitocondriales de la célula y permitir ya sea la protección selectiva o la erradicación de células en pro- a un beneficio terapéutico.<sup>35</sup> Actualmente, existen tres estrategias para evaluar un fármaco en la mitocondria: acumular de forma selectiva el fármaco dentro de la mitocondria, utilizar moléculas que se unan al objetivo dentro de la mitocondria (evaluar la especificidad) y modular los procesos fuera de la mitocondria, es decir alterar la función mitocondrial.<sup>46</sup>

## **2.6. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (FO)**

Existen tres tipos de fosforilación (síntesis de ATP a partir de ADP y  $P_i$ ), la fosforilación ligada al sustrato (sin intervención de la cadena respiratoria), la fosforilación oxidativa y la fosforilación fotosintética (la cual ocurre en los vegetales).<sup>47</sup> Se llama fosforilación oxidativa al proceso de acople entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP en la cadena respiratoria, a partir de ADP y  $P_i$ .<sup>48</sup>

El mecanismo de FO inicia con el flujo de electrones desde el NADH o  $FADH_2$  al  $O_2$  a través de cuatro complejos proteicos situados en la membrana mitocondrial interna, simultáneamente se conduce al bombeo de protones fuera de la matriz mitocondrial (**Figura 6**).

**Figura 6.** La cadena transportadora de electrones (complejo I, II, III, IV) emplea la energía liberada por la oxidación del NADH para sintetizar ATP (la moneda energética de la célula), mediante la fosforilación oxidativa. La hipótesis quimiosmótica de Mitchell establece que los complejos de la cadena transportadora de electrones (excepto el complejo II) acoplan el transporte de electrones al bombeo de protones y que el gradiente de protones es empleado para la síntesis de ATP por medio del complejo V (ATPasa).<sup>49</sup>



La distribución irregular de protones entre el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial genera un gradiente de pH y un potencial eléctrico transmembrana que crea una fuerza protón-motriz.<sup>50</sup> La conversión de la fuerza electrón-motriz en protón-motriz se lleva a cabo por medio de la cadena respiratoria, que como anteriormente se mencionó consiste en tres bombas de protones impulsadas por electrones conocidas como NADH-Q oxidoreductasa (complejo I), Q-citocromo c oxidoreductasa (complejo III) y citocromo c oxidasa (complejo IV). Estos complejos contienen múltiples centros de óxido-reducción, incluyendo quinonas, flavinas, complejos hierro-azufre, hemo e iones de cobre.<sup>51</sup>

En términos generales la fosforilación oxidativa es la culminación de una serie de transformaciones energéticas que se conocen como respiración celular. La fase final de la

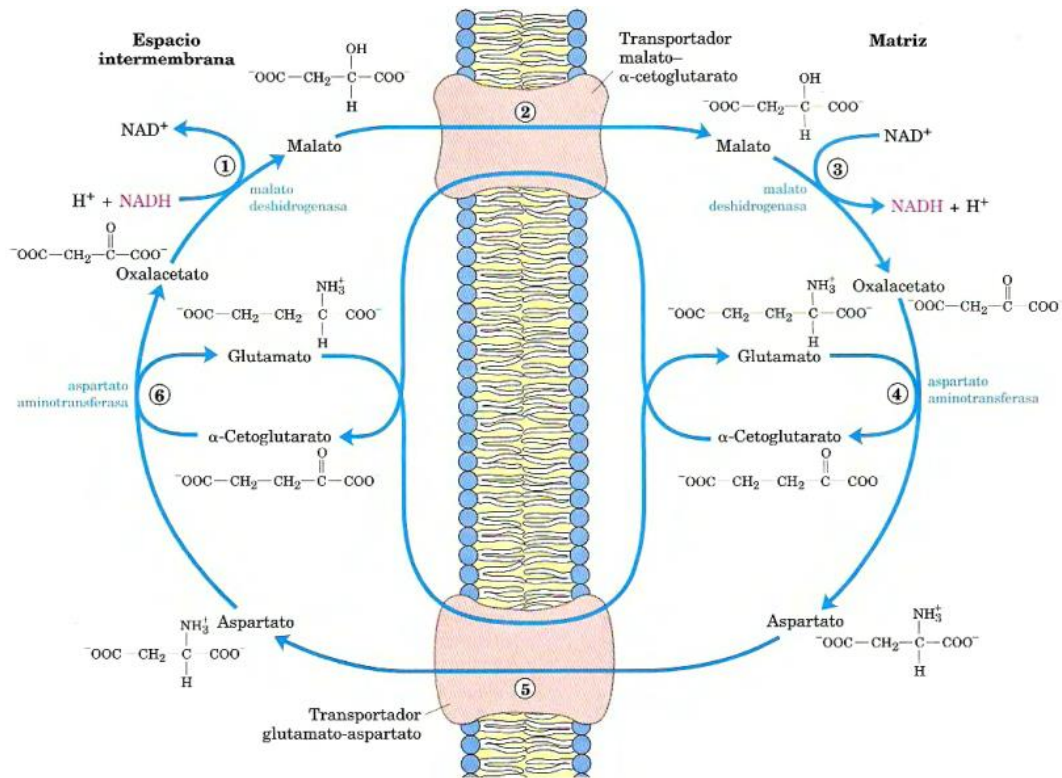
fosforilación oxidativa se lleva a cabo a través de la ATP sintasa (también conocida como complejo V), un ensamblaje que sintetiza ATP y que está propulsado por la circulación de protones a la matriz mitocondrial.<sup>51</sup> Con el propósito de resaltar algunas de las funciones y los mecanismos de cada uno de los complejos de la cadena respiratoria de la mitocondria, se muestran a continuación, un breve resumen de los cuatro complejos junto con la enzima ATP sintasa.

### **2.6.1. Sistemas de lanzaderas**

El NADH producido durante la glucólisis debe entrar primero en la matriz mitocondrial para luego ser oxidado por el complejo I de la cadena respiratoria de la mitocondria. Sin embargo, la membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH y no existe una proteína transportadora en la membrana que facilite el paso del NADH a través de ella. Por lo tanto, en lugar de transportar el NADH, se transporta sus dos electrones (de alta energía) dentro de la mitocondria a través de los sistemas de lanzadera representan el mecanismo por el cual se trasladan equivalentes de reducción al citosol.<sup>52,53</sup>

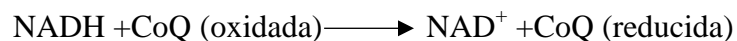
La lanzadera de malato-aspartato (**Figura 7**) funciona en el hígado y en las mitocondrias, esta lanzadera es de tipo bidireccional, en donde los equivalentes de reducción del NADH citosólico se transfieren al oxalacetato para producir malato. El malato es transportado a la mitocondria y hay es reoxidado a oxalacetato, el cual se convierte en aspartato el cual es transportado fuera de la mitocondria, lugar en cual se produce la transaminación inversa obteniendo así oxalacetato.<sup>54,55</sup>

Figura 7. Lanzadera malato-aspartato.<sup>62</sup>



### 2.6.2. Complejo I (NADH deshidrogenasa)

El Complejo I es el controlador del acceso a la cadena respiratoria, debido a que es el encargado de catalizar el primer paso de la oxidación del NADH. De esta forma asciende el NAD<sup>+</sup>/NADH y al mismo tiempo se translocan protones a través de la membrana mitocondrial interna, lo que conduce finalmente a la producción de energía.<sup>56</sup> En otras palabras el NADH ubiquinona oxidoreductasa (NADH deshidrogenasa) es el primero de los tres translocadores de protones de la cadena respiratoria, el cual transfiere dos electrones desde el NADH a la ubiquinona con la translocación simultanea de cuatro protones través de la membrana. En donde una molécula de FMN (flavín mononucleótido) y varios cluster hierro-azufre participan en las reacciones como grupos redox.



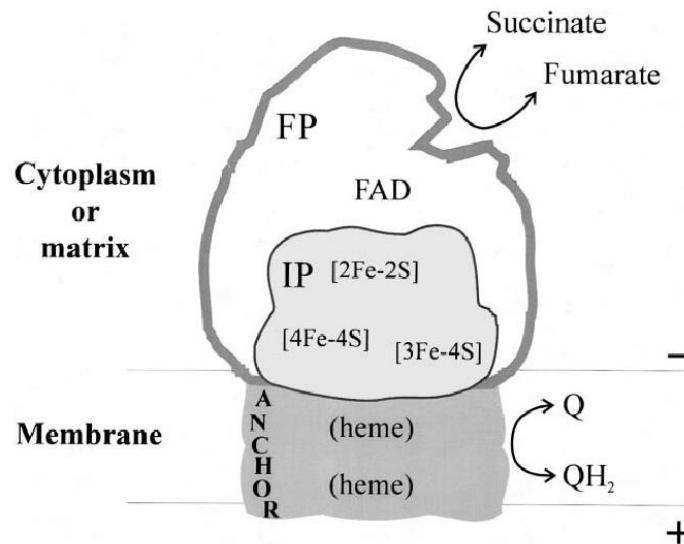
$$\Delta E = 0.360 \text{ V} \quad \Delta G^{\circ'} = -69.5 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Algunas de estas reacciones pueden ser inhibidas por compuestos naturales, como la rotenona y el antibiótico piercidin A.<sup>57</sup> Otra de las principales características del complejo I es que es uno de los principales sitios en que se produce la fuga prematura de electrones al oxígeno, siendo así uno de los principales sitios de producción de superóxido.<sup>58</sup>

### **2.6.3. Complejo II (Succinato deshidrogenasa)**

La succinato ubiquinona oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa o complejo II (**Figura 8**) es la única enzima del ciclo de Krebs que actúa en todos los organismos aeróbicos como las enzimas unidas a la membrana de la cadena respiratoria. Esta enzima cataliza la oxidación de succinato a fumarato y es capaz de transferir electrones directamente a la ubiquinona para producir ubiquinol.<sup>57</sup> Está compuesta por dos subunidades hidrofílicas, una flavoproteína (SdhA) y una subunidad proteica ión-sulfuro (SdhB) y dos subunidades hidrofóbicas ancladas a la membrana, SdhC y SdhD, que contienen un hemo B y proporcionan el sitio de unión de la ubiquinona.<sup>59</sup>

**Figura 8.** El complejo II se compone de cuatro subunidades sdhA (subunidad de flavoproteína que contiene FAD unido covalentemente al sitio activo, shdB (subunidad proteica de hierro-azufre, que contiene una cadena de tres grupos de sulfuro de hierro [2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S], sdhC y sdhD (transmembrana de la subunidades citocromo b que contiene fracciones hemo).<sup>60,61</sup>

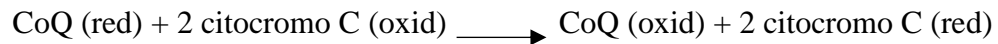


De la oxidación del FADH<sub>2</sub> se obtienen dos electrones que son transportados hasta el complejo III, a diferencia del complejo I en el complejo II no se da la liberación de protones al espacio intermembranal.<sup>48</sup> En la ruta directa de la transferencia electrónica, el hemo b no se encuentra, por lo cual se cree que podría reducir la frecuencia en la que se “pierden” los electrones fuera del sistema, desplazándose del succinato al oxígeno molecular para producir SOR, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>.<sup>62</sup>

#### 2.6.4. Complejo III (Complejo citocromo bc1)

En la cadena respiratoria la enzima es conocida como ubiquinol citocromo c oxidoreductasa, la cual transfiere electrones desde el ubiquinol al citocromo c. La translocación de protones a través de la membrana citoplasmática en bacterias y a través del interior de la membrana de la mitocondria esta acoplada a la transferencia de electrones.<sup>57</sup> En los mamíferos este complejo enzimático consta de 11 subunidades de las que tres tienen

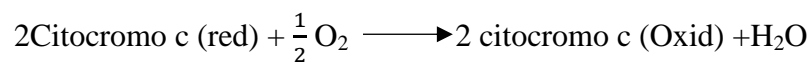
grupos prostéticos que actúan como centros redox. Estas son el citocromo b y el citocromo c1, cada uno de los cuales contiene un grupo hemo y la proteína ferrosulfurada de rieske, que contiene un agrupamiento  $2Fe2S$ .<sup>63</sup>



$$\Delta E = 0.190 \text{ V} \quad \Delta G^{\circ'} = -36.7 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

### 2.6.5. Complejo IV (Citocromo C oxidasa)

El citocromo c oxidasa es la enzima terminal de la cadena respiratoria de la mitocondria y es la encargada de la oxidación de citocromo c, la reducción de oxígeno, el consumo de protones y el bombeo de cuatro protones a través de la membrana mitocondrial y por último, también es el encargado de la formación de agua.<sup>64</sup>



$$\Delta E = 0.580 \text{ V} \quad \Delta G^{\circ'} = -112 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

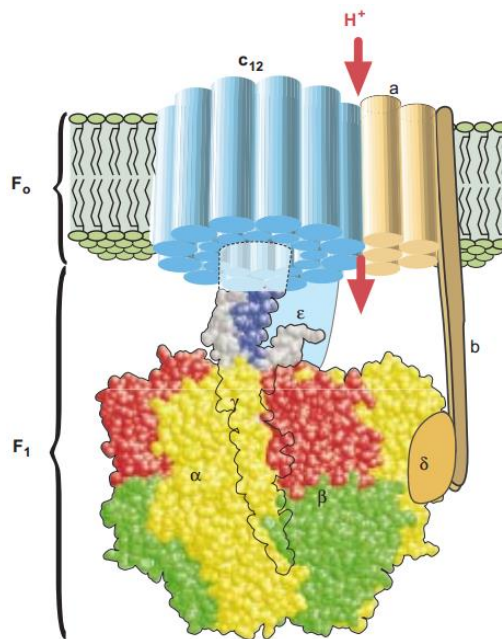
Este complejo enzimático posee múltiples subunidades, específicamente 13 subunidades en mamíferos, cuya masa oscila alrededor de los 200000 Da. Otra de sus características únicas radica en poseer como componentes redox dos citocromos a y a<sub>3</sub>, y dos centros de cobre conocidos como Cu<sub>A</sub> y Cu<sub>b</sub>.<sup>63</sup>

### 2.6.6. ATP sintasa

El complejo ATP-sintetiza (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPasa) en las mitocondrias, de cloroplastos y bacterias tiene un número común de características, las cuales son el resultado de su ADN y su

secuenciación de proteínas.<sup>65</sup> La ATP sintasa consta de dos segmentos conocidos como  $F_0$  y  $F_1$ , en donde  $F_1$  participa en la síntesis de ATP y sobresale en forma de esfera hacia el interior del espacio de la matriz, y una parte  $F_0$  que está integrada en la membrana mitocondrial interna. La parte  $F_1$  de la ATP sintasa de los mamíferos posee cinco subunidades diferentes  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ , mientras  $F_0$  consta de once subunidades diferentes, de las cuales las subunidades  $a_1c_{10}$  forman un canal de protones central  $b_2\text{OSCP}_1$  (siglas de oligomycin sensitivity conferring protein) enlaza las partes  $F_1$  y  $F_0$  (**Figura 9**)<sup>66</sup>

**Figura 9.** Estructura ATPasa.<sup>116</sup>



## 2.7. INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA

Los compuestos que inhiben el transporte de electrones, se juzgan por su efecto sobre la desaparición del  $O_2$  en un sistema experimental, en donde las sondas experimentales fueron invaluableles en el rastreo de la ruta de los electrones a través de la cadena de transporte de electrones.<sup>67</sup> Algunos de los inhibidores más conocidos de la cadena respiratoria se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Inhibidores más comunes de la cadena respiratoria.<sup>68</sup>

Inhibidores de la cadena de transporte de electrones			
Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV
Alquilguanidas	Carboxina		
Rotenona		BAL(Anti-lewisita Britanica)	Monóxido de carbono
Barbitúricos (Aminobarbital)		Naftoquinona	Cianuro (CN <sup>-</sup> )
Clorpromazina		Antimicina	Azida (N <sup>3-</sup> )
Piericidina			Sulfuro de hidrógeno(H <sub>2</sub> S)
Inhibidores de la fosforilación oxidativa		Desacoplantes	
Atractilósido (Inhibe la translocasa)		2,4-dinitrofenol (2,4-DNP)	
Oligomicina (Inhibe el flujo de protones hacia F <sub>0</sub> )		2,4-dinitrocresol (2,4-DNC)	
Ionóforos ( Ejemplo valinomicina)		CCCP	(Carbonilcianuro- <i>m</i> -clorofenilhidrazona)

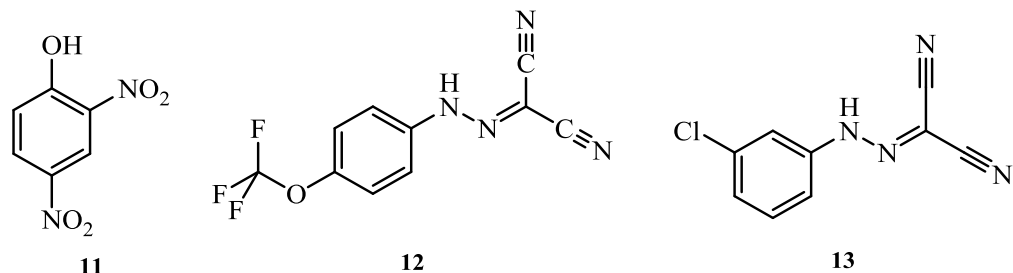
## 2.8. DESCOPLADORES DE LA CADENA RESPIRATORIA

El acoplamiento entre transporte electrónico y síntesis de ATP puede “desacoplarse” debido a ciertas condiciones y reactivos químicos (**Figura 10**) tales como el 2,4-dinitrofenol **11** (DNP) o el carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona **12**.<sup>69</sup> Estos compuestos conocidos como desacoplantes o desacopladores impiden la síntesis de ATP pero permiten el flujo de electrones por la cadena respiratoria. Igualmente, la adición de estas sustancias a una suspensión mitocondrial provoca un marcado aumento en el consumo de oxígeno.<sup>70</sup>

**Figura 10.** Algunos desacopladores de la fosforilación oxidativa. 2,4-dinitrofenol **11** (DNP).

Carbonilcianuro *p*-trifluorometoxifenilhidrazona **12** (FCCP). Carbonilcianuro-*m*-

clorofenilhidrazona **13** (CCCP).



La tasa de respiración mitocondrial es baja frente a sustratos como el succinato (complejo II). Sin embargo, la respiración aumenta cerca de 5 veces al adicionar ADP en un medio incubado con  $P_i$  (este aumento es el resultado de la fosforilación, cuando el ADP es fosforilado a ATP). Cuando se adiciona un desacoplador se produce un aumento abrupto de las tasas respiratorias,<sup>71</sup> ya que causan tasas de respiración máxima pero el transporte de electrones no genera ATP.

Los ácidos moderadamente débiles (pKa en el intervalo de 5-7) son conocidos como desacopladores potentes y potencializadores de la transferencia de  $H^+$  a través de la membrana fosfolipídica, también conocidos como desacopladores protonóforos. Los desacopladores protonóforos estimulan la actividad ATPasa sensible a la oligomicina, suprimen todas las reacciones relacionadas con la energía, tales como la síntesis de ATP y el transporte activo de iones.<sup>71</sup>

## 2.9. APOPTOSIS

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente e interactivo, propio de una amplia variedad de diferentes tipos de células, que puede desencadenarse por una variedad de señales extrínsecas e intrínsecas (**Tabla 2**).<sup>72</sup>

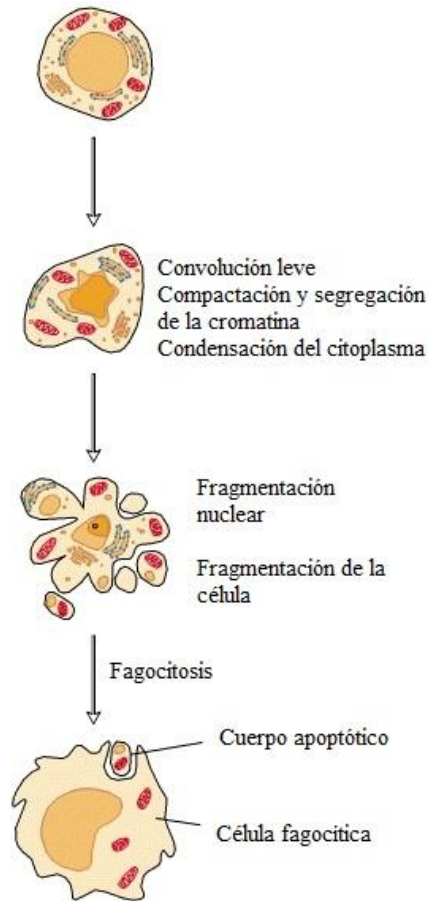
Durante este fenómeno actúan mecanismos proapoptósicos o antiapoptósicos, regulados genéticamente, que actúan en forma activa y equilibrada.<sup>73</sup> La apoptosis puede dividirse en tres etapas generales: 1) una fase de inducción o iniciación, que es extremadamente heterogénea y dependen de las señales específicas que inducen la muerte; 2) una fase efectora durante la cual, la célula "decide" suicidarse; y 3) una fase de degradación, durante la cual se activan las hidrolasas catabólicas (caspasas y nucleasas).<sup>74,75</sup>

**Tabla 2.** Lista de algunos de los agentes inhibidores e inductores de la apoptosis<sup>72</sup>

<b>Inhibidores de la apoptosis</b>		
<b>Inhibidores fisiológicos</b>		<b>Agentes farmacológicos</b>
Factores de crecimiento Matriz extracelular Aminoácidos neutros Zinc Estrógenos Andrógenos		Inhibidores de calpaina Inhibidores proteasa-cisteína Promotores tumorales
<b>Inductores de la apoptosis</b>		
<b>Activadores fisiológicos</b>	<b>Inductores de daño relacionado</b>	<b>Agentes de terapia asociada</b>
Transformadores de crecimiento Neurotransmisores Calcio	Choque térmico Infección viral Radicales libres Privación de nutrientes Oxidantes	Drogas quimioterapéuticas Radiación gamma Radiación UV

Frecuentemente la apoptosis es acompañada por un cambio característico de la morfología nuclear (condensación de la cromatina, picnosis, cariorrexis) y de la bioquímica de la cromatina (fragmentación del ADN) (**Figura 11**). También implica la activación de proteasas de cisteína específicas (caspasas),<sup>76</sup> las cuales utilizan un residuo de cisteína como nucleófilo catalítico y poseen una especificidad para cortar sustratos después de los residuos de ácido aspártico en las proteínas diana (es decir, catalizan un patrón altamente selectivo en la degradación de proteínas).<sup>77</sup>

**Figura 11.** Los cambios morfológicos que sufre la célula durante la apoptosis. En donde, inicialmente se condensa la cromatina a lo largo de la periferia nuclear, luego el núcleo y el citoplasma se fragmenta, formando cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados por células circundantes.<sup>78</sup>



Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos que se activan por escisión proteolítica (catalizada por otras caspasas), la activación inicial de una caspasas desencadena la activación de caspasas adicionales y lleva a la muerte celular. Por lo tanto, la regulación de las caspasas es clave para determinar la supervivencia celular. El gen CED-4 (presente en la larvas de *Caenorhabditis elegans*) se une a las caspasas y promueven su activación, mientras en los mamíferos homólogo (Apaf-1) codifican toda una familia de proteínas (familia Bcl-2), las cuales poseen miembros que inhiben la apoptosis (o al menos en parte) al bloquear la liberación del citocromo C (por ejemplo Bax y Bak),

mientras otros miembros son promotores de la activación de procaspasas y de la muerte celular ( por ejemplo Bad).<sup>79,80,81</sup>

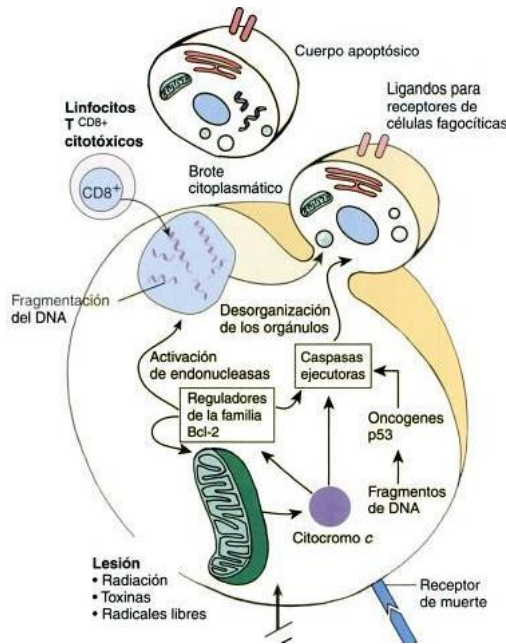
Por último, la fosfatidilserina (fosfolípido), que normalmente se encuentra en la capa interna de la membrana citoplasmática, es trastocada a la parte externa como consecuencia de un estímulo proapoptótico,<sup>82</sup> por otra parte su exposición en la superficie permite el reconocimiento y eliminación de células apoptóticas por sus vecinos sanos, previniendo que la ruptura de la membrana derrame el citosol u orgánulos en el espacio intracelular (**Figura 12**).<sup>76</sup>

En situaciones de normalidad existe en la célula un equilibrio entre los factores que favorecen la apoptosis y los que se oponen a ella, este equilibrio puede ser alterado por un tóxico como por ejemplo agentes farmacológicos.

En células temporales o renovables prevalecen los genes proapoptóticos, mientras que en las células cancerosas son los antiapoptóticos. Cuando los genes de uno u otro mecanismo sufre alguna mutación, surge distintas patologías como cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neurodegenerativas, etc.<sup>83</sup>

Actualmente ha incrementado el reconocimiento de que las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en las fases tempranas de la apoptosis. Así, en la vía mitocondrial de la apoptosis, la liberación desde la mitocondria al citosol de proteínas proapoptóticas, como el citocromo C, es un hecho crucial en la puesta en marcha de la subsiguiente cascada de cambios citoplasmáticos que desencadenan la muerte celular.

**Figura 12.** Mecanismos que llevan a la apoptosis. En donde se muestran activadores internos de la apoptosis como oncogenes, supresores de tumores como p53 y antimetabolitos privadores de nutrientes, al igual que el daño celular, la familia Bcl-2 compuesta por miembros antiapoptóticos y proapoptóticos que determinan la vida o la muerte de una célula y por último el citocromo c el cual es el más poderoso conductor de la apoptosis.<sup>84</sup>



## 2.10. ESPECIES REACTIVAS

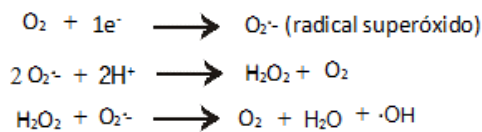
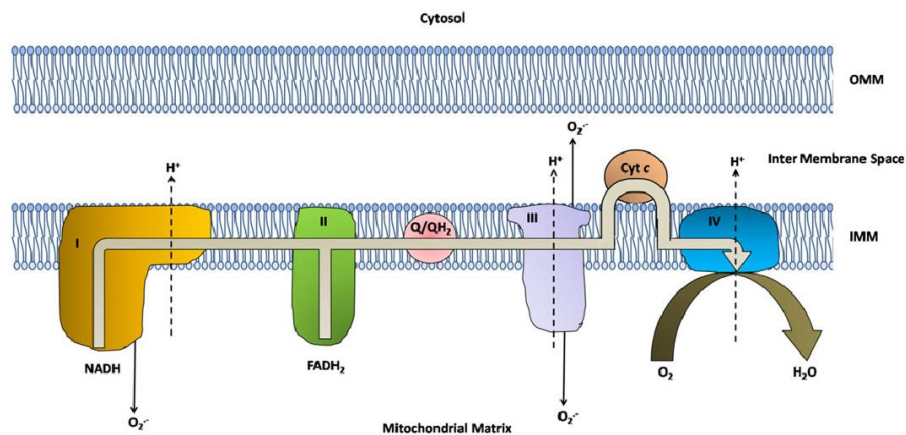
Los radicales libres son especies químicas que contienen mínimo un electrón no apareado, son altamente inestables y reaccionan fácilmente con sustancias químicas inorgánicas y orgánicas.<sup>85</sup> Son considerados radicales libres, los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxil ( $\cdot OH$ ), peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ), lipídico peroxil ( $LOO^{\cdot}$ ), alcoxil ( $RO^{\cdot}$ ).<sup>86</sup> En los sistemas vivos, los radicales libres derivados del oxígeno son la clase más importante de especies reactivas, aquellos radicales libres derivados del oxígeno ( $O_2$ ) por ejemplo el anión superóxido  $O_2^{\cdot-}$  y los radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ), son llamados especies reactivas de oxígeno (ERO).<sup>87</sup>

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se generan durante los procesos normales de fosforilación oxidativa en la mitocondria. Algunos de los electrones que pasan a través de

la cadena de transporte de electrones se escapan y reaccionan con el oxígeno molecular ( $O_2$ ) para formar superóxido que es rápidamente dismutado (por la enzima superóxido dismutasa mitocondrial) a  $H_2O_2$ . Así mismo, estos derivados de oxígeno altamente reactivos se obtienen al no precisar de 4 electrones que reduzcan una molécula de  $O_2$ , provocando que la reacción no sea completa (obteniendo derivados del oxígeno).<sup>88,89,90</sup>

De hecho, la cadena respiratoria genera la mayoría de las especies reactivas en la célula (**Figura13**), que luego pueden interactuar directamente con las proteínas mitocondriales, lípidos y ADN, limitando sus funciones. Particularmente ERO puede producir la peroxidación de lípidos y la peroxidación de cardiolipina (evento que se cree crítico en la inducción de apoptosis).<sup>91</sup>

**Figura 13.** Representación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el mitocondria en donde se afirma que la mayor parte del  $O_2^-$  generado por las mitocondrias de mamíferos (a partir de ensayos *in vitro*) es producido por el Complejo I; la contribución de los otros complejos y sitios parece ser relativamente baja. Así la producción  $O_2^-$  se obtiene principalmente en la matriz al lado de la membrana mitocondrial interna.<sup>87</sup>



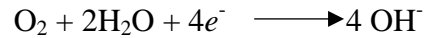
Los radicales libres pueden ser producidos a través de procesos metabólicos, radiación ultravioleta (UV), contaminantes del aire, xenobióticos, estrés, herbicidas y otros factores exógenos que pueden inducir una generación significativa de ERO.<sup>86</sup> Cuando las defensas antioxidantes de las células fallan al impedir la acumulación de ERO, se produce el estrés oxidativo (el cual puede ocasionar daño oxidativo en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros), que se define como el desequilibrio entre pro-oxidantes y anti-oxidantes, produciendo un aumento de los pro-oxidantes. Algunos antioxidantes como las enzimas isoformas de superóxido dismutasa (SOD1, SOD2 y SOD3), glutatión peroxidasa (Prxs), catalasa (CAT), glutatión S-transferasa (GST) y dos isoformas de tioredoxina (TRX1 y TRX2) y las no enzimáticas como glutatión (GSH) y disulfuro de glutatión (GSSG), impiden la acumulación de ERO.<sup>87,92</sup>

Aunque la producción de superóxido depende del tejido examinado,<sup>93</sup> se ha logrado establecer que el complejo I es el mayor productor de superóxido en la mitocondrias, mientras la contribución de los otros complejos es baja. Cuando las mitocondrias oxidan el succinato en ausencia de inhibidores de la cadena de transporte de electrones, la tasa de producción de superóxido es alta. Sin embargo, esta tasa es insignificante cuando el complejo I es inhibidor (ejemplo con rotenona).<sup>94,95</sup>

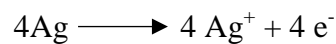
Otras especies de radicales libres como las especies reactivas de nitrógeno (ERN), también juegan un papel importante durante el estrés oxidativo y la apoptosis. Debido a que existe un gran número de células que liberan óxido nítrico (NO), el cual actúa como una molécula de señalización que activa la guanilato ciclasa quien actúa como inductor de la biogénesis mitocondrial (formación de nuevas mitocondrias en la célula).<sup>96,94</sup> Otra función de la especie reactiva NO<sup>•</sup> es inhibir la enzima citocromo c oxidasa (complejo IV), luego de un prolongado periodo de exposición al NO, que induce un incremento en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), y una marcada insensibilidad de la estado 4 de la respiración mitocondrial debido a que la citocromo c oxidasa tiene menos control sobre la tasa de respiración del estado 4.<sup>97</sup>

## 2.11. ELECTRODO DE OXÍGENO

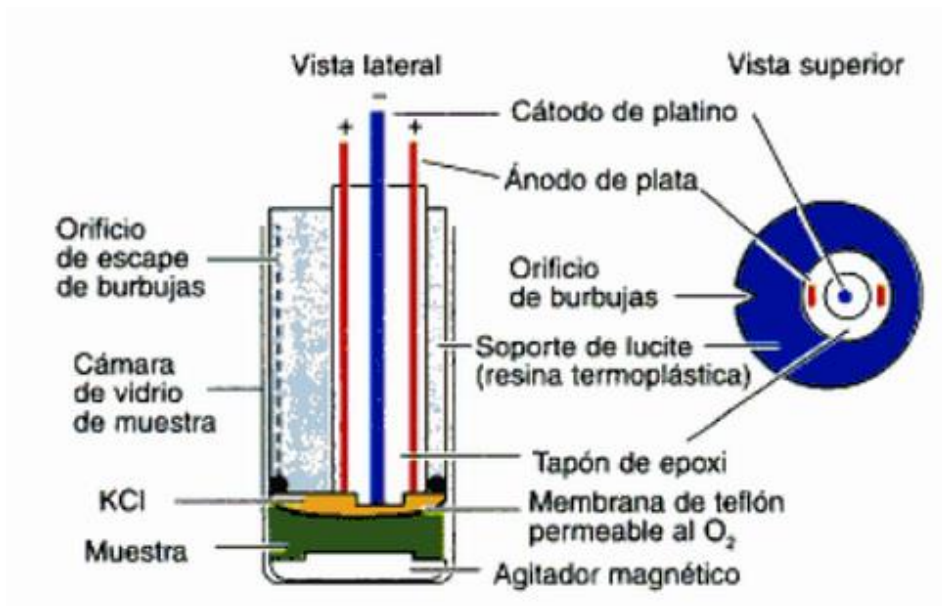
Una suspensión de mitocondrias aisladas posee una velocidad de consumo de  $O_2$  sensible al funcionamiento de la cadena de transporte de la mitocondria (**Figura14**). La cual puede medirse a través de un electrodo de oxígeno,<sup>67</sup> en donde las siguientes reacciones se llevan a cabo. En el cátodo de platino, el  $O_2$  es reducido:



Y en el ánodo de Ag:



**Figura 14.** Electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo de Pt, inmersos en una solución de KCl y en contacto con la cámara de muestra a través de una membrana permeable al  $O_2$ . El  $O_2$  se reduce a  $H_2O$  en el electrodo de Pt, y genera de ese modo un voltaje con respecto al electrodo de Ag/Cl que es proporcional a la concentración de  $O_2$  presente en la cámara.<sup>67</sup>



### **3. MATERIALES Y METODOS**

Para desarrollar los objetivos propuestos se utilizó la metodología que se presenta a continuación:

#### **3.1. REACTIVOS**

El aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* fue extraído por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales–CENIVAM, la hierba de limoncillo fue cultivadas en parcelas experimentales ubicadas en el Complejo Agroindustrial del CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Santander, Colombia, en un suelo franco- arcilloso-arenoso. El aceite esencial cuya densidad es de 877.5 mg/mL se sometió a análisis de cromatografía GC-MS. A partir de lo cual el CENIVAM identificó los siguientes constituyentes principales (%) geranial 37.5%, neral 28.2%, acetato de geranilo 10%, geraniol 9%, trans- $\beta$ -cariofileno 2%.<sup>13</sup>

#### **3.2. ANIMALES**

Para el aislamiento de las mitocondrias, se utilizaron ratas albinas machos de raza Wistar, con un peso entre 200 g – 300 g, mantenidas en el bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Los animales se mantuvieron en ayuno durante 12 horas y fueron sacrificados por decapitación.

#### **3.3. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATA**

Las mitocondrias de hígado de rata fueron aisladas por centrifugación diferencial de acuerdo a lo descrito por Voss (Dinor O. Voss 1961),<sup>98</sup> con algunas modificaciones, utilizándose como medio de aislamiento: D-manitol 250 mM, HEPES 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.2, EGTA 1 mM y BSA 0.1% p/v.

El hígado fue retirado inmediatamente después del sacrificio de la rata e inmerso en medio de extracción a 4°C. Después de lavado, el órgano fue cortado (picado) y llevado a un homogeneizador van Potter Elvehjen usando sucesivamente un pistilo grueso (3 veces) y uno angosto (2 veces). El homogenizado se centrifugó a 600 x g a 4 °C durante 10 minutos (eliminación de células intactas, membranas y núcleos). El sedimento fue descartado y el sobrenadante se centrifugado a 7000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido, constituido de mitocondrias intactas, se suspendió en un medio con las mismas especificaciones anteriores, pero sin BSA a una velocidad nuevamente de 7000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Las mitocondrias obtenidas se re-suspendieron en medio de extracción y se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.<sup>98</sup>

#### **3.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES EN LA SUSPENSIÓN**

La concentración de proteínas en cada muestra re-suspendida de mitocondrias de hígado, se determinó mediante el ensayo de Bradford a 595 nm.<sup>99</sup> Para esto se preparó una curva de calibración utilizando patrones de albúmina de suero bovino (BSA) disueltos en solución de buffer de fosfato. Las absorbancias de los patrones y las muestras fueron medidas en un equipo de ELISA marca Bio-Rad utilizando el programa Microplate Manager. Para el ensayo se prepararon 3 disoluciones cuyas relaciones fueron de 1:100, 2:200, 1:300 y un blanco, finalmente se cuantifico por el método de Bradford utilizando la curva de calibración determinada previamente.

#### **3.5. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO**

Se usaron mitocondrias de hígado de rata tal como se describió anteriormente, utilizando un medio de incubación compuesto por: HEPES 10 mM (pH 7.4), EGTA 0.1 mM, manitol 125 mM, KCl 65 mM y suplementadas con glutamato de sodio 5 mM o succinato de sodio 3 mM, P<sub>i</sub> 1.6 mM y ADP 0.6 mM. El aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* fue adicionado en diferentes concentraciones (1 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm) e incubados durante dos minutos con la proteína mitocondrial antes de inducir la respiración

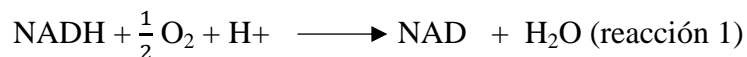
mitocondrial. El consumo de oxígeno por las mitocondrias intactas fue determinado polarográficamente en un oxígrafo, utilizando un electrodo tipo Clark, acoplado a un registrador. Los resultados se expresaron en nmol de O<sub>2</sub> consumido min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína, considerándose la solubilidad del oxígeno en agua a la temperatura usada y a 1 atm.<sup>98</sup>

### **3.6. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE MITOCONDRIAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS MITOCONDRIALES**

Las mitocondrias aisladas fueron congeladas a -70°C, y fragmentadas a través de ultrasonido durante diez minutos a temperatura ambiente, y mantenidas en baño de hielo hasta la realización de las pruebas enzimáticas. Los fragmentos de membrana fueron usados como fuente de enzimas. La actividad de las enzimas se determinó espectrofotométricamente con un equipo SHIMADZU UV-1800 utilizando el programa UV-Probe 2.33 y polarográficamente en un oxígrafo marca Hansatech utilizando el programa Oxygraph plus. El aceite esencial de *C. flexuosus* fue adicionado en una concentración de 10 µg·mL<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial e incubado durante dos minutos con la mitocondrial antes de inducir la reacción, para todas las enzimas estudiadas.

#### **3.6.1. NADH oxidasa**

La actividad de la NADH oxidasa se determinó por el método de Singer.<sup>100</sup> La velocidad de oxidación del NADH (reacción 1) se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente.



El sistema de reacción estuvo compuesto por tampón fosfato 80 mmol·L<sup>-1</sup> (pH 7,4), EDTA 50 µ mol·L<sup>-1</sup>, NADH 0,2 mmol·L<sup>-1</sup> y 1 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28 °C y la reacción se inició por la adición de NADH.

### 3.6.2. NADH deshidrogenasa

La actividad de la enzima se determinó por el método espectrofotométrico de Singer,<sup>100</sup> usando ferrocianato como receptor artificial de electrones en la presencia de rotenona, la reacción se monitoreo a 420 nm.



El sistema de reacción estuvo constituido por: tampón fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> (pH 7.4), EDTA 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>, NADH 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>, ferrocianato 600 mmol·L<sup>-1</sup>, rotenona 1mmol·L<sup>-1</sup>, NaCN 1 mmol·L<sup>-1</sup> y 0,1 mg de proteína mitocondrial.

### 3.6.3. NADH citocromo C reductasa

La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente por el método descrito por Somlo,<sup>101</sup> a través del monitoreamiento de la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm. El sistema de reacción se constituyó de: tampón fosfato 50 mmol·L<sup>-1</sup> (pH 7,4), EDTA 2 mmol·L<sup>-1</sup>, NADH 50 m mol·L<sup>-1</sup>, citocromo c (oxidado) 40 mmol·L<sup>-1</sup>, NaCN 1 mmol·L<sup>-1</sup> y 0,2 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.

### 3.6.4. Succinato oxidasa

La actividad de la enzima se determinó en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente. El sistema de reacción se compuso por tampón fosfato 80 mM (pH 7,4), EDTA 50 μM, succinato 10 mM y 1 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28 °C y la reacción fue iniciada por la adición de succinato.<sup>100</sup>

### 3.6.5. Succinato deshidrogenasa

La actividad de la succinato deshidrogenasa se determinó por el método de Singer,<sup>100</sup> utilizando DCPIP y PMS como receptores artificiales de electrones. La velocidad de reducción del DCPIP se monitoreo a 600 nm en un sistema de reacción compuesto por:

tampón fosfato de sodio  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7,4), succinato de sodio  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , EDTA  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , NaCN  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , rotenona  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , PMS  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $30 \mu\text{g}$  de proteína mitocondrial. Los reactivos presentes en el sistema, excepto el PMS y el DCPIP se incubaron por 10 minutos a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , la reacción se inició por la adición de DCPIP  $180 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### **3.6.6. Succinato citocromo C reductasa**

La actividad de esta enzima se determinó por el método descrito por Somlo,<sup>101</sup> midiendo la reducción del citocromo c después de bloquear la cadena respiratoria con NaCN  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  y rotenona  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , la velocidad de reducción del citocromo c será acompañada a  $550 \text{ nm}$ , usando un sistema de reacción compuesto por: tampón fosfato  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7,4), EDTA  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , NaCN  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , succinato de sodio  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , rotenona  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $20 \mu\text{g}$  de proteína mitocondrial. La reacción se inició por la adición de  $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de citocromo c.

### **3.6.7. Citocromo C oxidasa**

La actividad de esta enzima se determinó por el método descrito por Mason.<sup>102</sup> Acompañando la velocidad de oxidación del citocromo c a  $550 \text{ nm}$ , en un sistema de reacción constituido de: tampón fosfato  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7,4), EDTA  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , citocromo c reducido  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg}$  de proteína mitocondrial. La reacción se inició por la adición de citocromo c reducido.

### **3.6.8. Actividad ATPasa en mitocondrias intactas**

La actividad de la  $F_1F_0$  ATPasa en mitocondrias fragmentadas por ciclos de congelamiento/descongelamiento se determinó cuantificando el fosfato inorgánico resultante de la hidrólisis de ATP, según el método descrito por Pullman.<sup>103</sup> Sistema de reacción: tampón Tris-HCl  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7,4),  $\text{MgSO}_4$   $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  y proteína mitocondrial  $0.5 \text{ mg}$ , estos ensayos se realizaron a la par con una muestra que contenía el agente desacoplador FCCP ( $1 \mu\text{M}$ ), para conocer si el aceite tenía un efecto desacoplador mayor o menor que este. Después de la adición del medio de reacción y de

la piruvato quinasa, la reacción se incubo por 10 minutos a 28 °C, pasado este tiempo se inició la reacción con la adición de ATP 4 mmol·L<sup>-1</sup> y se interrumpió pasados 10 minutos por la adición de TCA al 5%. El material se centrifugo a 10.000 g durante 3 minutos. El fosfato inorgánico será dosado del sobrenadante siguiendo el método de Summer.<sup>104</sup>

### **3.6.9. Actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas**

La actividad de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPasa en mitocondrias fragmentadas por ciclos de congelamiento/descongelamiento se determinó cuantificando el fosfato inorgánico resultante de la hidrólisis de ATP, según el método descrito por Pullman.<sup>103</sup> Sistema de reacción: tampón Tris-HCl 50 mmol·L<sup>-1</sup> (pH 7,4), MgSO<sub>4</sub> 3 mmol·L<sup>-1</sup>, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 μmol·L<sup>-1</sup>, 10 unidades de piruvato quinasa (1 unidad de piruvato quinasa convierte 1 μmol de PEP a piruvato por min) y proteína mitocondrial 100 μg·mL<sup>-1</sup>. Después de la adición del medio de reacción y de la piruvato quinasa, la reacción se incubo por 10 minutos a 28 °C, posteriormente se inició la reacción con la adición de ATP 4 mmol·L<sup>-1</sup> y se interrumpo pasados 10 minutos, por la adición de TCA al 5%. El material se centrifugo a 10.000 g durante 1 minuto. El fosfato inorgánico fue dosado del sobrenadante siguiendo el método de Summer.<sup>104</sup>

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar, y sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Debido a que los resultados obtenidos presentan diferencias estadísticamente significativas, fue necesario realizar un análisis de seguimiento Tukey para muestras de igual tamaño (análisis *post hoc* o de comparaciones múltiples), el cual realiza comparaciones múltiples luego de haber obtenido una razón F significativa en la prueba ANOVA y determina en donde se encuentran las diferencias significativas (análisis realizado por el programa IBM SPSS Statistics 20).<sup>105</sup>

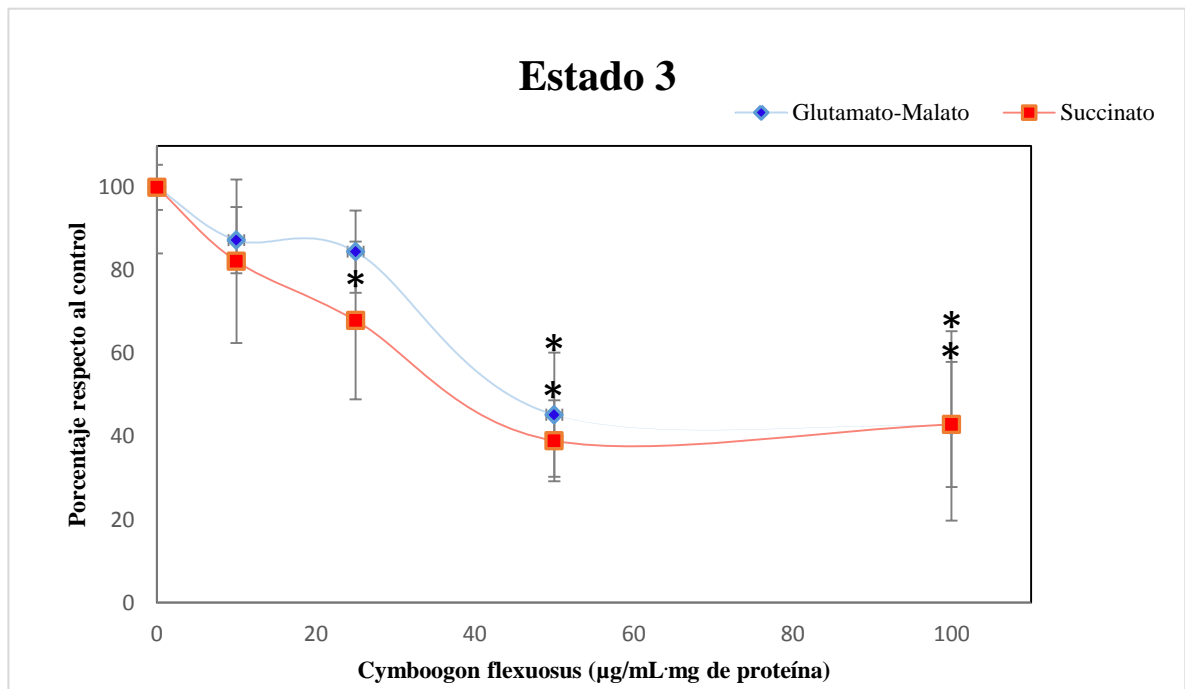
### 4.2. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* EN LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

Los efectos del aceite esencial de *C. flexuosus* se evaluaron utilizando glutamato (5mM) y succinato (2,5mM) como sustratos oxidables, sobre el metabolismo energético mitocondria, bajo parámetros como el consumo de oxígeno en presencia de ADP (estado 3), después de consumo de ADP (estado 4) y el coeficiente de control respiratorio-CCR (estado 3/estado 4). Posteriormente se evaluó la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria (NADH oxidasa, NADH citocromo c reductasa, NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, succinato oxidasa, succinato citocromo c reductasa, succinato deshidrogenasa, citocromo c oxidasa y ATPasa). Se evaluaron diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína.

En la **Figura 15** se observa que el *C. flexuosus* disminuye la velocidad de consumo de oxígeno de mitocondrias energizadas con glutamato-malato, a 10 ppm se observa ~12% de disminución, a 25 ppm ~15%, a 50 ppm ~55% y a 100 ppm ~57%, sin embargo solo a partir de la concentración de 50 ppm la inhibición en el estado 3 fue estadísticamente significativa.

Para el sustrato succinato el *C. flexuosus* disminuyó la velocidad de consumo de oxígeno de mitocondrias energizadas con glutamato-malato, a 10 ppm ~18% de disminución, solo a partir de la concentración de 25 ppm se observó un porcentaje de inhibición estadísticamente significativo de ~32%, a 50 ppm ~61% y a 100 ppm ~57%.

**Figura 15.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la velocidad del consumo de oxígeno en presencia de ADP (0.6 mM) con glutamato(5 mM) - malato(2,5 mM) y succinato (3 mM), 100% de actividad corresponde a  $44,32 \pm 18,18$  ( Glutamato-Malato), y  $52,40 \pm 16,21$  (succinato) nmol de  $O_2$  consumido por  $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína respectivamente \*significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

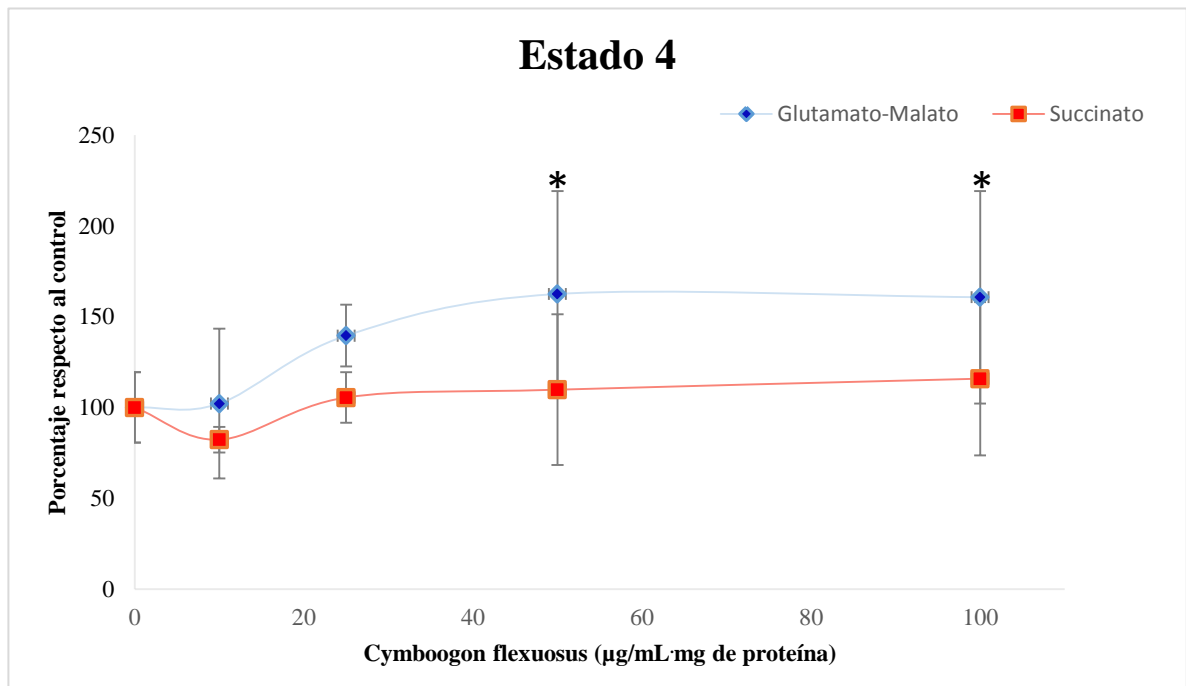


En la **Figura 16** muestra el consumo de oxígeno por la oxidación de glutamato-malato o succinato después del agotamiento del ADP (estado 4). Ambos sustratos evaluados presentan un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en las mitocondrias incubadas con *C. flexuosus*.

Así, el aceite muestra un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno de mitocondrias energizadas con glutamato-malato, a 10 ppm ~2% de incremento, a 25 ppm ~40%, a 50 ppm ~62% y a 100 ppm ~60%, sin embargo solo a partir de la concentración de 50 ppm la inhibición en el estado 3 fue estadísticamente significativa.

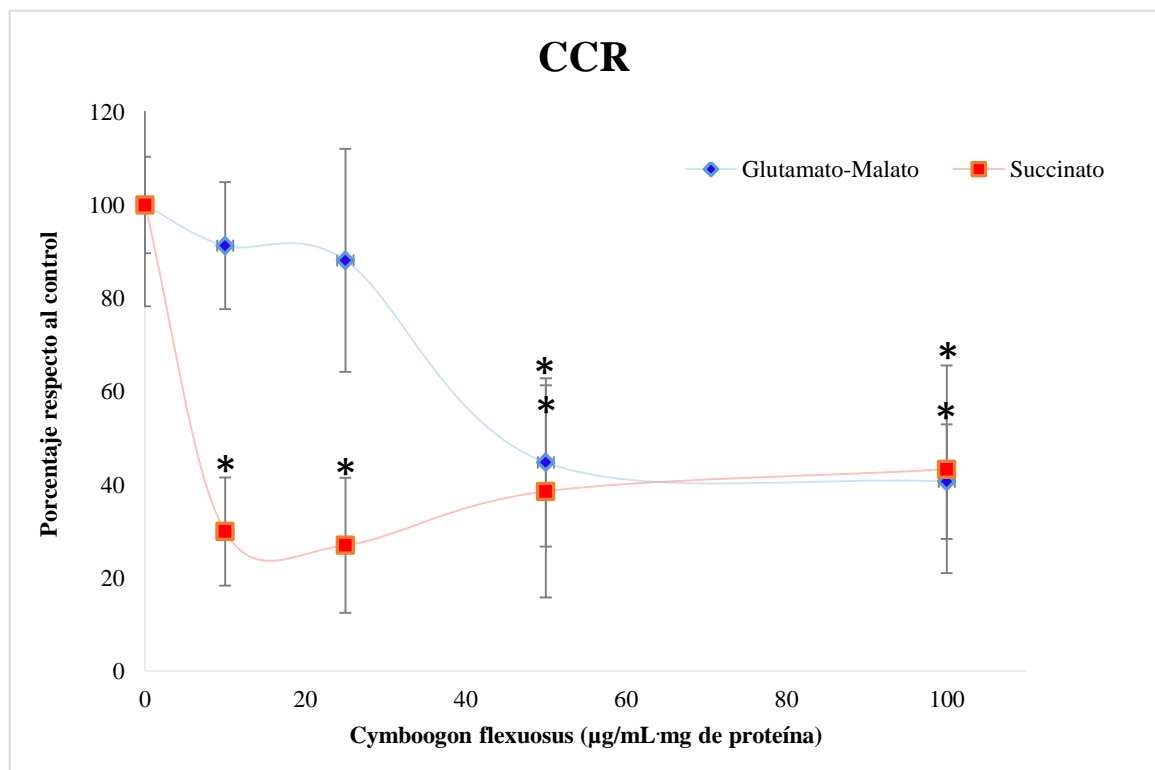
Para el sustrato succinato el *C. flexuosus* disminuyó la velocidad de consumo de oxígeno de mitocondrias energizadas con glutamato-malato, a 10 ppm ~18% de disminución, mientras que a 25 ppm en adelante se observó un porcentaje de incremento de ~5%, a 50 ppm ~9% y a 100 ppm ~15%, sin diferencias estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ).

**Figura 16.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP con Glutamato (5 mM)-Malato (2,5 mM) respectivamente y succinato (3 mM), 100% de actividad corresponde a  $5,13 \pm 2,24$  (Glutamato-Malato), y  $13,28 \pm 4,42$  (Succinato) nmol de  $O_2$  consumido por  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína respectivamente \* significativamente ( $p \leq 0.05$ ).



Así, como resultado de la inhibición del estado 3 y la estimulación del estado 4 para ambos sustratos, los valores del coeficiente de control respiratorio (CCR) se redujeron con ambos sustratos a partir de la concentración de 10 ppm (**Figura17**) para el glutamato-malato y 50 ppm para el succinato, con diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, el aceite esencial genera una marcada disminución del CCR (en torno al ~70%) en presencia de succinato, mientras que en mitocondrias energizadas con glutamato y malato esta disminución fue de ~9%.

**Figura 17.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre el coeficiente de control respiratorio (CCR) con Glutamato (5mM)-Malato (2,5 mM) y succinato (3mM)- Rotenona (10  $\mu$ m), 100% de actividad corresponde a  $2,39 \pm 1,46$  y  $4,89 \pm 2,66$  respectivamente. Cada valor representa el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimento independientes por triplicado cada uno,\* significativamente ( $p \leq 0.05$ ).



Con el fin de determinar de forma directa la inhibición y estimulación observadas para el estado 3 y 4, respectivamente, se estudió el efecto del aceite sobre cada una de las enzimas de la cadena respiratoria, resultados que se muestran a continuación:

#### **4.3. EFECTO DEL *C. flexuosus* SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS DE LA CADENA RESPIRATORIA**

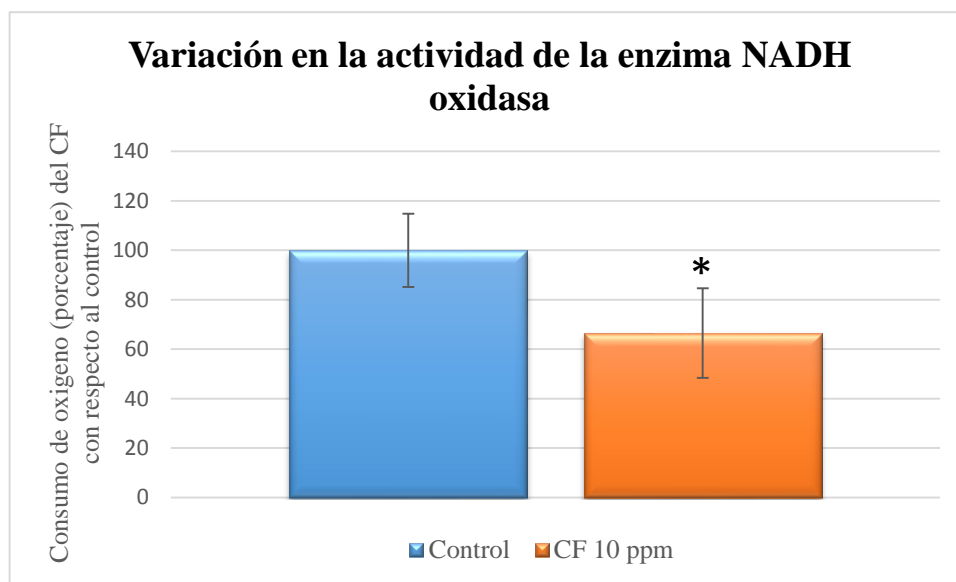
Luego de evaluar el efecto del *C. flexuosus* sobre el coeficiente de consumo de oxígeno, se determinó el impacto del *C. flexuosus* de forma independiente a la barrera de la membrana intacta, la actividad de fosforilación y otros procesos dependientes de la integralidad de la membrana externa. Así, al fraccionar la membrana se permitió la resolución de los cuatro distintos complejos que catalizan la transferencia electrónica a través de una fracción de la cadena respiratoria.

En este proceso se evaluó el efecto del *C. flexuosus* a 10 ppm, debido a que a esta concentración el aceite muestra inhibición con diferencias estadísticamente significativas del CCR (**Figura17**), los resultados se muestran a continuación:

##### **4.3.1. NADH oxidasa**

El efecto del aceite esencial a una concentración de 10 ppm se muestra en la figura 18, la cual muestra una inhibición estadísticamente significativa de la enzima NADH oxidasa de ~34% (**Figura 18**).

**Figura 18.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la enzima NADH oxidasa. Cada valor representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de  $27,49 \pm 18,96$  nmol de NADH oxidado  $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. \* Significativamente diferente del control (100%),  $p \leq 0,05$ .

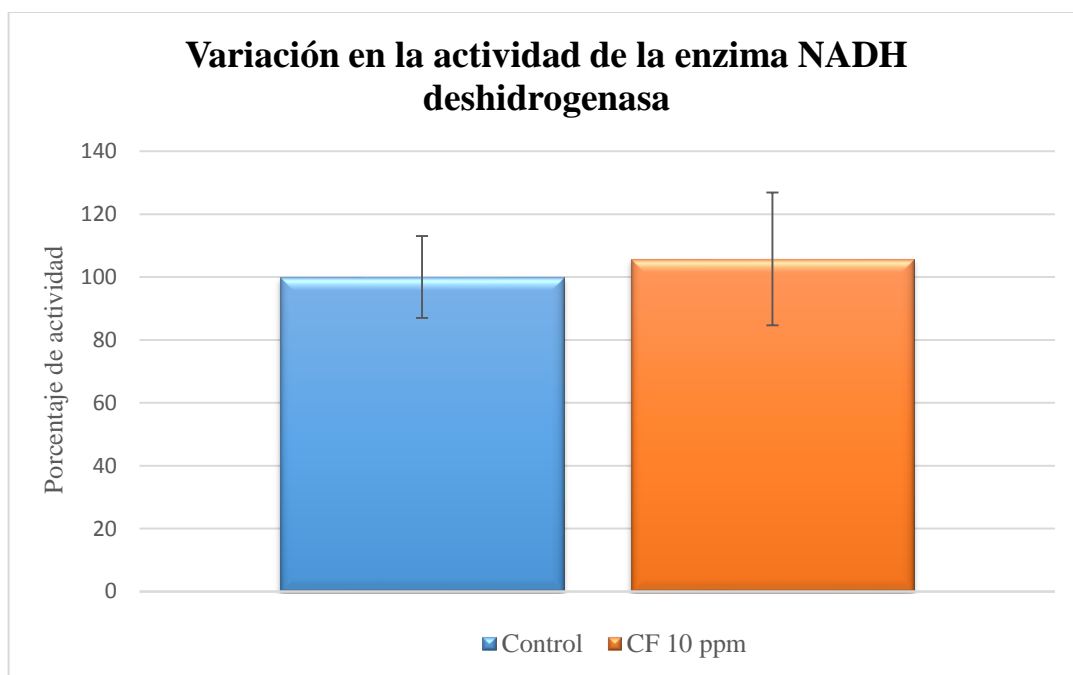


La **Figura 18** muestra que el *C. flexuosus* a 10 ppm inhibe la actividad de la NADH oxidasa, lo que indica que el aceite probablemente inhibe el paso del NADH hasta el oxígeno o algún punto intermedio entre este proceso.

#### 4.3.2. NADH deshidrogenasa

A diferencia de la NADH oxidasa, la enzima NADH deshidrogenasa, mostrada en la **Figura 19** no muestra diferencias significativas a la concentración de 10 ppm del *C. flexuosus*.

**Figura 19.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la enzima NADH Deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de  $1,361 \pm 0,028$  nmol de ferrocianuro reducido por  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. \* Significativamente diferente del control (100%),  $p \leq 0,05$ .

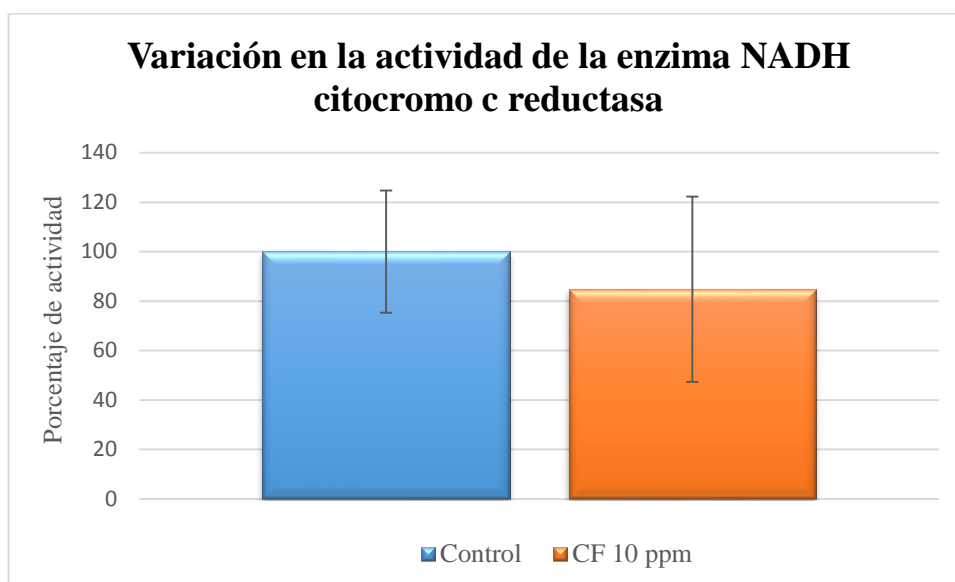


De la **Figura 19** podemos inferir que el *C. flexuosus* a 10 ppm no afecta el complejo I de la cadena respiratoria, lo que conlleva a que la inhibición presentada por la NADH oxidasa (**Figura 18**) se deba a inhibiciones en el transporte de electrones a nivel de ubiquinona, complejo III o complejo IV.

#### 4.3.3. NADH Citocromo C Reductasa

La actividad de la enzima NADH Citocromo C Reductasa se redujo en un ~16%, aunque este resultado no fue estadísticamente significativo, como se observa en la **Figura 20**.

**Figura 20.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la enzima NADH citocromo c reductasa. Cada valor representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de  $40,91 \pm 15,06 \mu\text{mol}$  de citocromo c reducido por  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. \* Significativamente diferente del control (100%),  $p \leq 0,05$ .

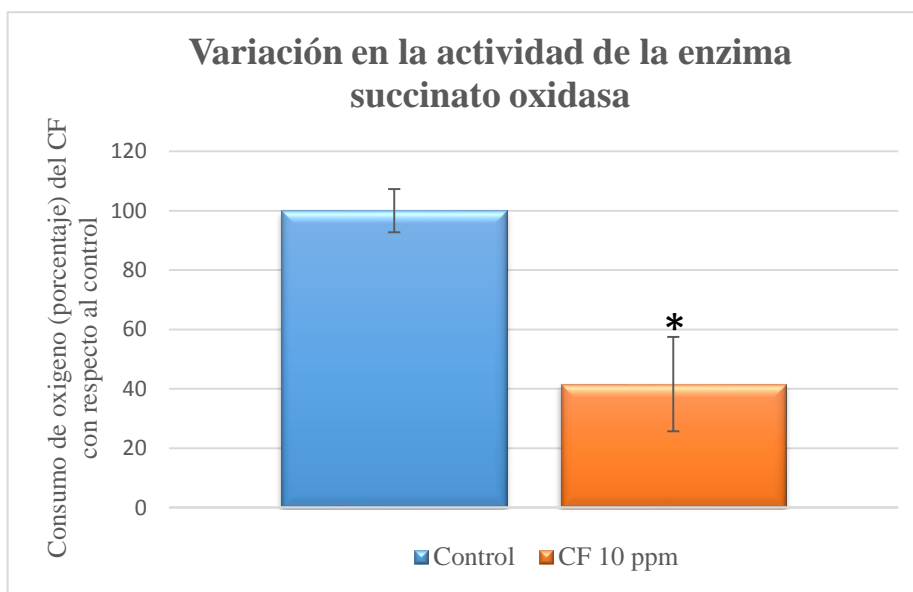


A partir de los resultados anteriores se observa que el *C. flexuosus* a 10 ppm no afecta el paso de los electrones desde el complejo I al complejo III.

#### 4.3.4. Succinato oxidasa

El aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* en una concentración de 1 ppm, inhibió la actividad de la succinato oxidasa por ~59% (**Figura 21**).

**Figura 21.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la enzima NADH oxidasa. Cada valor representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de  $15,83 \pm 5,60$  nmol de succinato oxidado  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. \* Significativamente diferente del control (100%),  $p \leq 0,05$ .

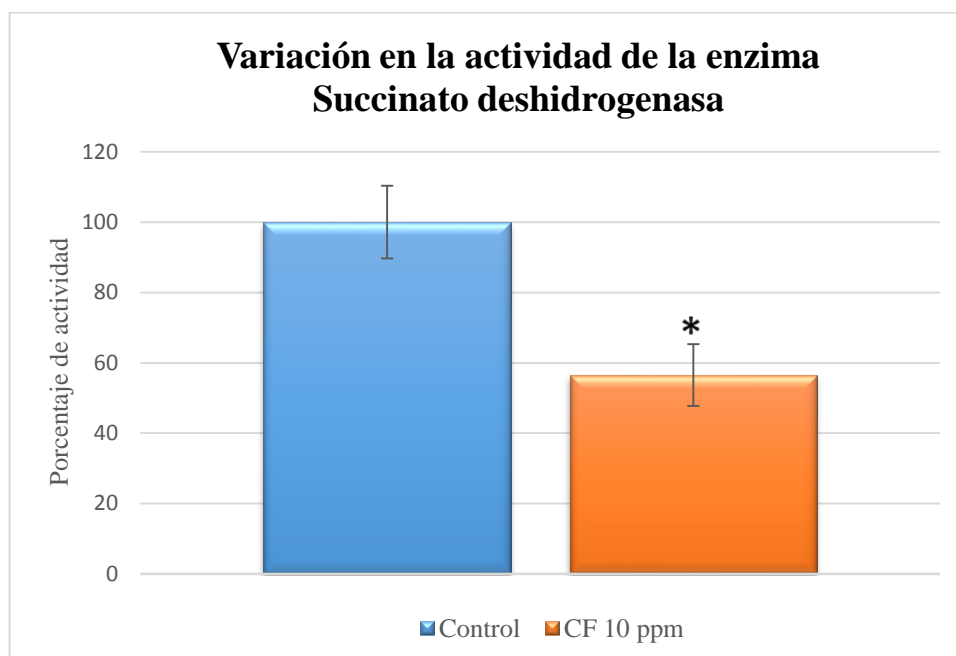


A partir de la **Figura 21** se observa que el *C. flexuosus* a 10 ppm inhibe la succinato oxidasa, al igual que la NADH oxidasa lo que indica que el aceite inhiba el paso del succinato hasta el oxígeno o algún punto intermedio entre este proceso.

#### 4.3.5. Succinato deshidrogenasa

La actividad de la enzima succinato deshidrogenasa se redujo en un ~44%, con diferencias estadísticamente significativas, como se observa en la **Figura 22**.

**Figura 22.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la enzima Succinato deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de  $44,71 \pm 5,93 \mu\text{mol}$  de DCPIP reducido por  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. \* Significativamente diferente del control (100%),  $p \leq 0,05$ .

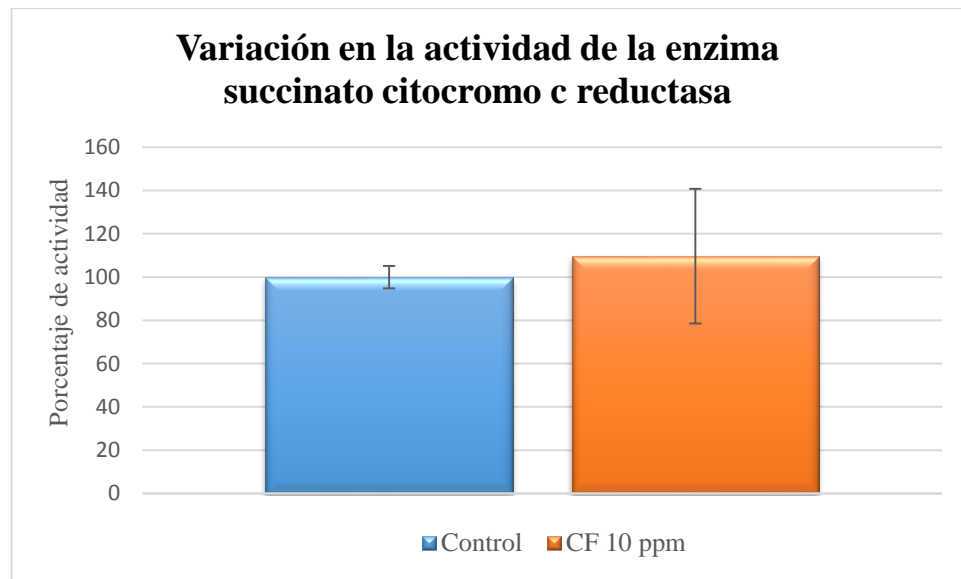


De la **Figura 22** se observa que al igual que la succinato oxidasa el *C. flexuosus* a 10 ppm inhibe la actividad de la succinato deshidrogenasa, a partir de lo cual se concluye que el *C. flexuosus* inhibe el paso de los electrones desde la oxidación del succinato en el complejo II de la cadena respiratoria.

#### 4.3.6. Succinato citocromo c reductasa

La actividad de la enzima succinato citocromo c reductasa, muestra un porcentaje de aumento del ~9% en presencia del aceite esencial de *C. flexuosus*, aunque este resultado no es estadísticamente significativo, como se observa en la **Figura 23**.

**Figura 23.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la enzima Succinato deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de  $41,45 \pm 4,32 \mu\text{mol}$  de citocromo c reducido por  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. \* Significativamente diferente del control (100%),  $p \leq 0,05$ .

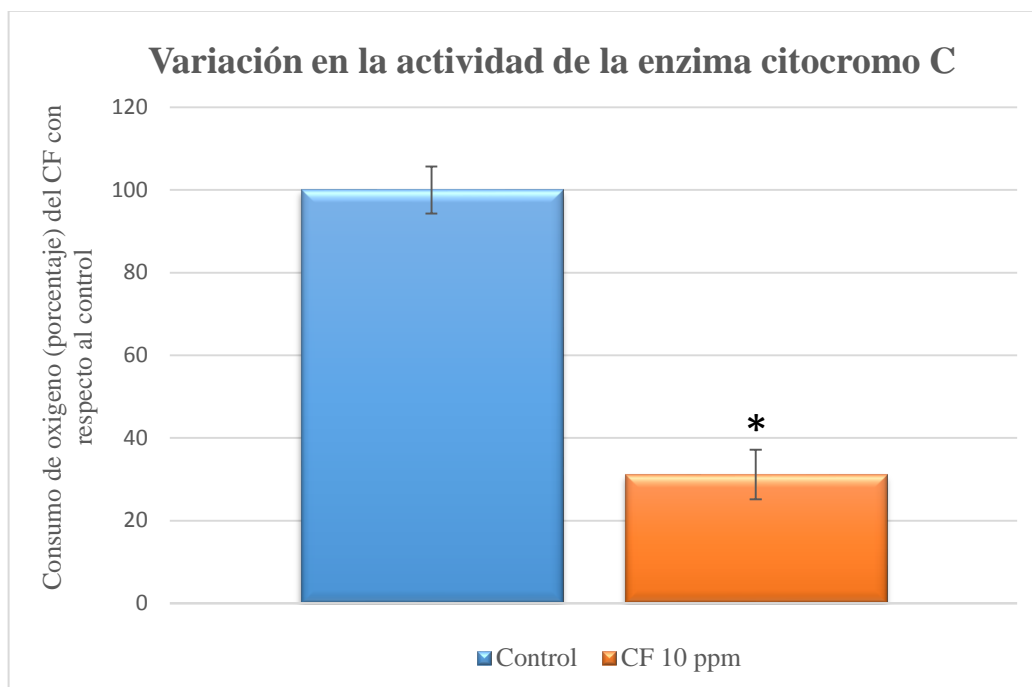


A partir de los resultados anteriores se observa que el *C. flexuosus* a 10 ppm no afecta el paso de los electrones desde el complejo II al complejo III.

#### 4.3.7. Citocromo C Oxidasa

La enzima citocromo c oxidasa se inhibió en un ~69% (**Figura 24**). Esta disminución del valor porcentual es similar al porcentaje de inhibición de la succinato oxidasa (~59%).

**Figura 24.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre Citocromo c oxidasa. Cada valor representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Los valores de control (100 %) fueron de  $41,45 \pm 4,32 \mu\text{mol}$  de citocromo c reducido por  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. \* Significativamente diferente del control (100%),  $p \leq 0,05$ .



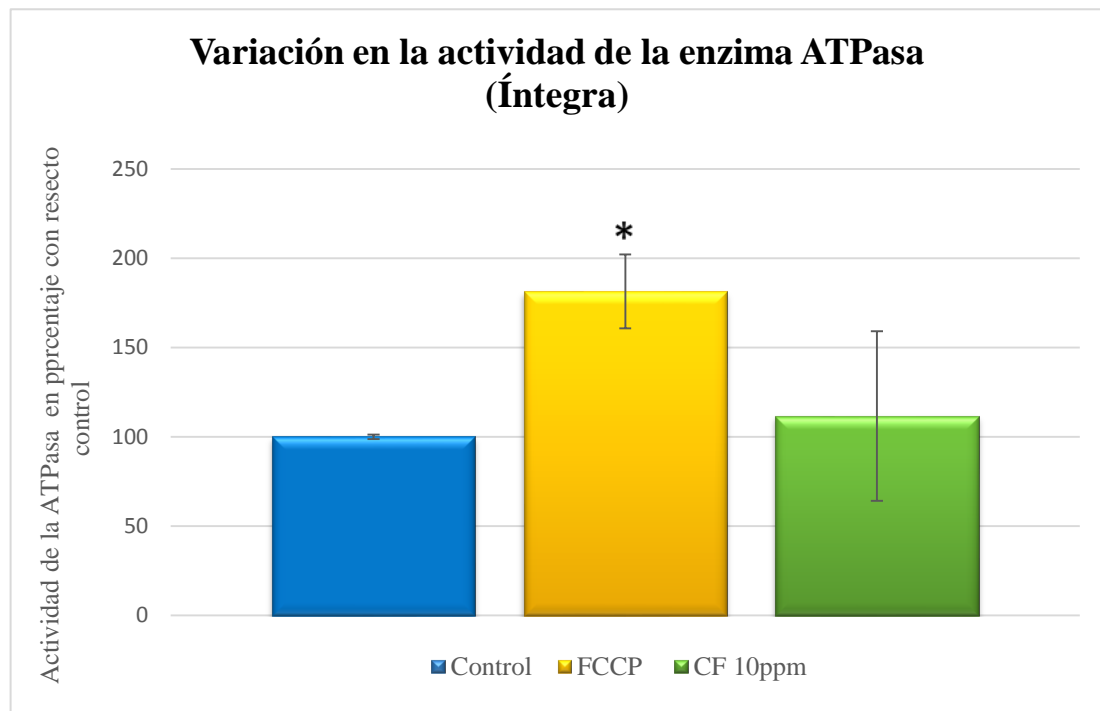
De la figura anterior se observa una fuerte inhibición del complejo IV de la cadena de transporte de la mitocondria, lo cual corrobora que la inhibición presentada por la NADH oxidasa es debida a la inhibición del complejo VI.

#### 4.3.8. Actividad ATPasa con mitocondria íntegra

Se evaluó el efecto del *C. flexuosus* en la actividad del complejo ATPasa en mitocondrias íntegras, utilizando diferentes condiciones experimentales. En el control se evaluó el paso de los electrones desde la matriz hasta el espacio intermembrana a través de la ATPsintasa (blanco) y se comparó con los resultados obtenidos al adicionar al sistema de reacción el desacoplador FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona), el cual acelera el paso de los electrones hacia el espacio intermembrana produciendo una mayor actividad con respecto al blanco. En la figura 25 se presenta la actividad de la enzima ATPasa en

mitocondrias íntegras, en donde se observa un ascenso en la actividad de la ATPasa con FCCP de *ca.* 81% respecto al control. Mientras en presencia de *C. flexuosus* no presenta variaciones estadísticamente significativas con respecto al control ( $p > 0,005$ ).

**Figura 25.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la actividad ATPasa en mitocondrias íntegras. Cada valor representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.\* Significativamente diferente del control ( $p \leq 0,05$ ) (a) Utilizando una concentración de 0 ppm del aceite (control) 100% de actividad corresponde a  $0,64 \pm 0,15$  mmol Pi liberado  $\text{mg}^{-1}$  de proteína (b) Muestra tratada con FCCP ( $1\mu\text{M}$ ):  $1,14 \pm 0,37$  mmol Pi liberado  $\text{mg}^{-1}$  de proteína (c) Ensayo realizado con *C. flexuosus* 10 ppm:  $0,26 \pm 0,11$  mmol Pi liberado  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

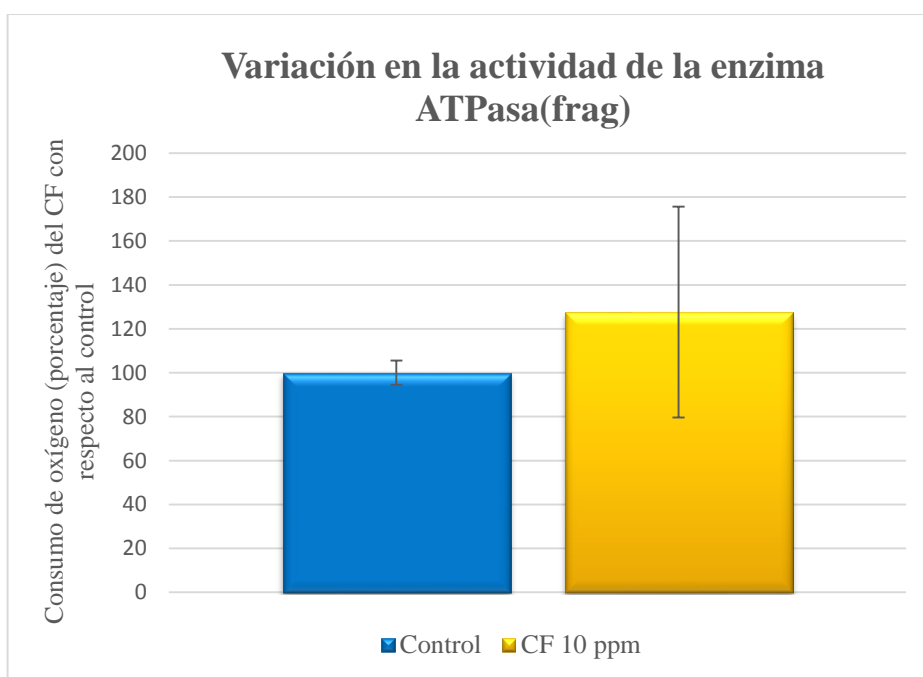


#### 4.3.9. Actividad ATPasa con mitocondria fragmentada

Los resultados del estudio de la liberación de ortofosfato en mitocondrias fragmentadas, se expresan como porcentaje en relación al control, donde 100% equivale a  $0,65$  Pi liberado por minuto por mg de proteína mitocondrial ( $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). En la **Figura 26** se muestra un aumento en la actividad de la ATPasa ( $\sim 20\%$ ), sin embargo, estos resultados no muestran

diferencias estadísticamente significativas. Confirmando que el aceite esencial no genera alteraciones sobre la enzima ATPasa.

**Figura 26.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas. Cada valor representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.\* Significativamente diferente del control ( $p \leq 0,05$ ), actividad ATPasa mitocondria fragmentada 100% de actividad corresponde a  $0,277 \pm 0,130 \mu\text{mol}$  de Pi hidrolizado.



## 5. DISCUSION

El aceite esencial de *C. flexuosus* disminuye la velocidad del consumo de oxígeno de las mitocondrias energizadas con glutamato-malato que suministra electrones para la generación de NADH (sustrato del complejo I) y aumenta el consumo de oxígeno con succinato (sustrato del complejo II). La reducción de la tasa de respiración estado 3 se puede explicar por los efectos inhibidores del aceite sobre el complejo IV el cual bombea protones hacia el espacio intermembrana.

La oxidación del sustrato glutamato-malato (sustrato del complejo II) fue menos afectado. Probablemente debido a que el aceite presenta una inhibición más fuerte de la actividad del complejo II en la cadena respiratoria mitocondrial que el complejo I.<sup>106</sup>

Los complejos de la cadena respiratoria fueron evaluados, cada uno por separado, con el propósito de aclarar el punto de la cadena respiratoria mitocondrial, en la cual se promovió la inhibición del consumo de oxígeno, como se descubrió en el ítem 3.6 (Tabla 3). Se observó que el *C. flexuosus* muestra un efecto en la NADH oxidasa (~34%), cuyo ensayo permite evaluar el transporte de electrones desde el complejo I hasta el IV. Sin embargo, al evaluar la actividad de la NADH deshidrogenasa no se observó una diferencia estadísticamente significativa, indicando que el transporte de electrones está bloqueado en un punto diferente al complejo I. A partir de los resultados de la actividad de la NADH citocromo c reductasa, suministrando electrones desde el complejo I y nuevamente no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la actividad de esta enzima, concluyendo de esta forma que el complejo III tampoco es inhibido por el *C. flexuosus*.

Al evaluar la actividad de la succinato oxidasa se observa una inhibición enzimática (~53%) al igual que la NADH oxidasa pero más pronunciada, indicando que existe una inhibición en el transporte de electrones desde el complejo II hasta el IV. Al evaluar específicamente la enzima succinato deshidrogenasa al nivel del paso de succinato a fumarato, donde se reduce el cofactor FADH a FADH<sub>2</sub> frente al *C. flexuosus* se observó

una fuerte inhibición ~44%, indicando que el aceite esencial inhibe el complejo II de la cadena respiratoria. Adicionalmente se evaluó el efecto del *C. flexuosus* sobre la succinato citocromo c reductasa, obteniendo al igual que la enzima NADH citocromo c reductasa ningún efecto estadísticamente significativo, confirmando que la inhibición del transporte de electrones no ocurre a nivel del complejo III.

Al evaluar la citocromo c oxidasa se observó una fuerte inhibición (~69%) de la enzima frente al 10 ppm del *C. flexuosus*, indicando que la inhibición observada al evaluar la NADH oxidasa probablemente ocurre por inhibiciones en el complejo IV y no por inhibición del complejo I.

**Tabla 3.** Efecto del *C. flexuosus* sobre la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria. Las condiciones experimentales se describen en el ítem 4. Los valores del control (100%) son: NADH oxidasa 27,49 nmol de NADH oxidado  $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; NADH deshidrogenasa: 1,36 nmol de ferrocianuro reducido  $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; NADH citocromo c reductasa: 41,91  $\mu\text{mol}$  de citocromo c reducido  $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; succinato oxidasa: 15,83 nmol de succinato oxidado  $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; succinato deshidrogenasa: 44,71  $\mu\text{mol}$  de DCPIP reducido  $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; succinato citocromo c deshidrogenasa 41,45  $\mu\text{mol}$  de citocromo c reducido  $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial; citocromo c oxidasa: 1,34  $\mu\text{mol}$  de citocromo c oxidado  $\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína mitocondrial. (n=3).

<b>Enzimas/Concentración del aceite</b>	<b>Actividad enzimática frente al <i>C. flexuosus</i> 0 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	<b>Actividad enzimática frente al <i>C. flexuosus</i> 10 <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>
NADH oxidasa (%)	100 $\pm$ 14,8	66,5 $\pm$ 18,1 *
NADH deshidrogenasa (%)	100 $\pm$ 13	105 $\pm$ 21,1
NADH citocromo c reductasa (%)	100 $\pm$ 24,7	84,9 $\pm$ 37,5
Succinato oxidasa (%)	100 $\pm$ 7,3	47,5 $\pm$ 16,20*
Succinato deshidrogenasa (%)	100 $\pm$ 10,3	56,5 $\pm$ 8,8*
Succinato citocromo c reductasa (%)	100 $\pm$ 5,2	109,6 $\pm$ 31,1
Citocromo C oxidasa (%)	100 $\pm$ 5,7	41,7 $\pm$ 5,9*

Para elucidar mejor el mecanismo subyacente del *C. flexuosus* en mitocondrias aisladas de hígado, se compararon con los de un desacoplador conocido, FCCP (carbonilcianida *p*-trifluorometoxifenilhidrazona), indicando que el *C. flexuosus* no presenta un efecto similar al FCCP, el cual presenta en partículas acopladas un aumento en la actividad ATPasa en respuesta al FCCP,<sup>107,108</sup> al igual que no presenta ningún efecto directo sobre la ATPasa (mitocondria fragmentada).

**Tabla 4.** Efecto del *C. flexuosus* sobre la actividad de la enzima ATPasa. Las condiciones experimentales se describen en el ítem 4. Valores del control (100%). Valores del control (100%) corresponden a: ATP en mitocondria intacta 0,26±0,11 mmol de P<sub>i</sub> mg<sup>-1</sup> de proteína; ATPasa en mitocondria fragmentada 56,76±8,73 mmol de P<sub>i</sub> mg<sup>-1</sup> de proteína; ATPasa en mitocondria intacta tratada con FCCP 1,14±0,37 mmol de P<sub>i</sub> mg<sup>-1</sup> de proteína. Resultados (promedio ± desviación estándar de tres experimentos diferentes por triplicado) expresados como el porcentaje de actividades respecto al control. (n=3).

<i>C. flexuosus</i> µg mL <sup>-1</sup>	ATPasa Intacta	Actividad de la ATPasa en mitocondrias intactas tratada con FCCP	Actividad de la ATPasa en mitocondrias fragmentada
0	100 ± 1,19	181,53± 20,72	100 ± 5,53
10	111,63 ± 47,47	-	127,62 ± 48,01

Los resultados anteriores demuestran que el aceite esencial de *C. flexuosus* inhibe el transporte de electrones, generando alteraciones en el potencial de membrana al inhibir fuertemente los complejos II y IV, generando fallas en la síntesis de ATP ya que no se genera potencial de membrana suficiente.

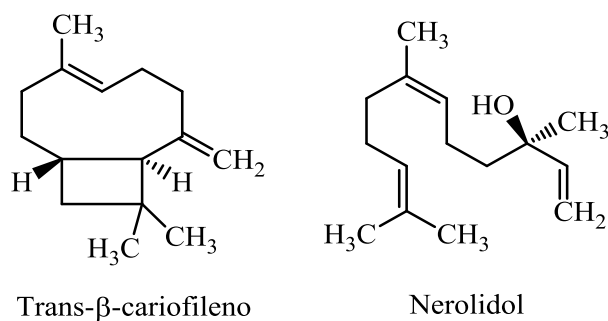
Sesquiterpenos como el trans-β-cariofileno al igual que el nerolidol son compuesto hidrófobos (similares en su propiedades hidrofóbicas.), que pueden cruzan la membrana plasmática y fácilmente interactuar con proteínas celulares y sitios intraorganela. Así investigaciones del nerodiol sobre la bioenergética mitocondrial muestran un aumento en la actividad de la cadena respiratoria y una disminución en la eficiencia de la fosforilacion.<sup>109</sup>

La inhibición del transporte de electrones puede despolarizar la membrana mitocondrial lo que causa la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS).<sup>110</sup> Donde, ROS incluyen radicales libres como el superóxido ( $O^{2-}$ ), el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El exceso de ROS podría afectar perjudicialmente las funciones celulares (oxidar o dañar lípidos, proteínas y ADN) e inducir la muerte celular.<sup>111,112</sup>

Estos resultados están relacionados con investigaciones en monoterpenos o sesquiterpenos (pequeñas moléculas en comparación con la mayoría de los fármacos utilizados en tratamientos farmacológicos clásicos)<sup>109</sup> como algunos terpenoides que pueden desestabilizar la membrana y modular funciones asociadas con la permeabilidad, la señalización celular, entre otros procesos que llevan a la muerte celular.<sup>113, 114, 115</sup>

Sesquiterpenos como nerolidol al ser compuesto hidrófobos, pueden cruzan la membrana plasmática y fácilmente interactuar con proteínas celulares y sitios intraorganelas. Así investigaciones del nerodiol sobre la bioenergética mitocondrial muestran un aumento en la actividad de la cadena respiratoria y una disminución en la eficiencia de la fosforilación.<sup>109</sup> Estos resultados son afines a los obtenidos por el *C. flexuosus*, quien está constituido por el sesquiterpeno trans- $\beta$ -cariofileno. Sin embargo, la estructura del nerolidol presenta algunas características estructurales diferentes al trans- $\beta$ -cariofileno (grupo  $-OH$  y estructura dinámica) y similitudes como su propiedades hidrofóbicas (**Figura27**).

**Figura 27.** Estructura química del trans- $\beta$ -cariofileno y el nerolidol.



## 6. CONCLUSIONES

El aceite esencial de *C. flexuosus* mostró una disminución en la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP (estado 3) con diferencias estadísticamente significativas a partir de la concentración de 50 ppm para glutamato-malato y 25 ppm con succinato, mientras el estado 4 mostró un aumento a partir de la concentración de 50 ppm con succinato. El CCR muestra un decrecimiento estadísticamente significativo a partir de 50 ppm con glutamato-malato y 10 ppm con succinato.

Durante la evaluación de los complejos enzimáticos involucrados en el transporte y síntesis del ATP, se determinó que el aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* muestra una fuerte inhibición de los complejos mitocondriales II y IV de la cadena respiratoria, lo cual conlleva a la inhibición del paso de electrónico a través de los complejos y con ello alteraciones, sin afectar la síntesis de ATP.

## 7. DIVULGACIONES

Los resultados de este proyecto fueron divulgados en:

- Congreso Internacional de Productos Fitofarmacéuticos 2013, celebrado en la ciudad de Bogotá del 10 al 12 de octubre de 2013.
- Primer Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2, celebrado en la ciudad de Bogotá del 04 al 07 de junio de 2014.
- 31° Congreso latinoamericano de química CLAQ – 2014 y XXVII congreso peruano de química celebrado en la ciudad de Lima, Perú del 14 al 17 de octubre del 2014.

## 8. RECOMENDACIONES

- Estudiar el efecto del *C. flexuosus* sobre el potencial de membrana en la mitocondria, frente al CF y así verificar que el aceite esencial no se comporta como un compuesto desacoplador.
- Estudios de hinchamiento mitocondrial, con el objetivo de evaluar la formación del poro transitorio de permeabilidad mitocondrial y así complementar los estudios realizados.
- Realizar estudios en la fluidez de la membrana, para confirmar si la actividad enzimática está siendo modificada por el aceite.
- Evaluar los metabolitos secundarios del aceite, para establecer, a cuál de sus metabolitos mayoritarios se debe su actividad o por el contrario comprobar que su efecto se debe a la sinergia del aceite.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological Effects of Essential Oils - A Review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475.
- (2) Kakarla, S.; Ganjewala, D. Antimicrobial Activity of Essential Oils of Four Lemongrass (*Cymbopogon Flexuosus* Steud) Varieties. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* **2009**, *3*, 107–109.
- (3) Sharma, P. R.; Mondhe, D. M.; Muthiah, S.; Pal, H. C.; Shahi, A. K.; Saxena, A. K.; Qazi, G. N. Anticancer Activity of an Essential Oil from *Cymbopogon Flexuosus*. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *179*, 160–168.
- (4) Ganjewala, D.; Luthra, R. Essential Oil Biosynthesis and Metabolism of Geranyl Acetate and Geraniol in Developing *Cymbopogon Flexuosus* (Nees Ex Steud) Wats Mutant Cv. GRL-1 Leaf. *Am. J. Plant Physiol.* **2007**, *4*, 269–275.
- (5) Kumar, A.; Malik, F.; Bhushan, S.; Sethi, V. K.; Shahi, A. K.; Kaur, J.; Taneja, S. C.; Qazi, G. N.; Singh, J. An Essential Oil and Its Major Constituent Isointermedeol Induce Apoptosis by Increased Expression of Mitochondrial Cytochrome c and Apical Death Receptors in Human Leukaemia HL-60 Cells. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *171*, 332–347.
- (6) Chaturvedi, R. K.; Flint Beal, M. Mitochondrial Diseases of the Brain. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *63*, 1–29.
- (7) Wallace, K.; Starkov, A. Mitochondrial Targets of Drug Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *40*, 353–388.
- (8) Prado, S. R. T.; Cechinel-Filho, V.; Campos-Buzzi, F.; Corrêa, R.; Cadena, S. M. C. S.; de Oliveira, M. B. M. Biological Evaluation of Some Selected Cyclic Imides: Mitochondrial Effects and in Vitro Cytotoxicity. *Z. Naturforsch. C.* **2004**, *59*, 663–672.
- (9) Pires, A. D. R. A.; de Oliveira, M. B. M.; Echevarria, A.; Silva, E. F.; Rocha, M. E. M.; Carnieri, E. G. S.; Martinez, G. R.; Noletto, G. R.; Cadena, S. M. S. C. Comparative Study of the Effects of 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Derivatives on Energy-Linked Functions of Rat Liver Mitochondria. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *186*, 1–8.
- (10) Abraham, D.; Braguini, W.; Kelmer-Bracht, A.; Ishii-Iwamoto, E. Effects of Four Monoterpenes on Germination, Primary Root Growth, and Mitochondrial Respiration of Maize. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 611–624.

- (11) Ortiz, R.; Vega, G.; Tamajón, A. Instructivo Técnico Para El Cultivo de *Cymbopogon Citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). *Rev. Cuba. Plant. Med.* **2002**, *7*, 89–95.
- (12) Thappa, R. K.; Hhar, K. L.; Atal, C. K. Isointermedeol, A New Sesquiterpene Alcohol from *Cymbopogon Flexuosus*. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 671–672.
- (13) Rodríguez Qa, R.; Ruiz N, C.; Arias M, G.; Castro S, H.; Martínez, J.; Stashenko, E. Estudio Comparativo de La Composición de Los Aceites Esenciales de Cuatro Especies Del Género *Cymbopogon* (Poaceae) Cultivadas En Colombia. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* **2012**, *11*, 77–85.
- (14) Lonkar, P. B.; Chavan, U. D.; Pawar, V. D.; Bansode, V. V.; Amarowicz, R. Studies on Preparation and Preservation of Lemongrass (*Cymbopogon Flexuosus* (Steud) Wats) Powder for Tea. *Emirates J. Food Agric.* **2013**, *25*, 585–592.
- (15) Maskinen, J.; Athela, D. K.; Mathela, C. S. Composition of the Essential Oil of *Cymbopogon Flexuosus*. *J. Chromatogr.* **1983**, *262*, 364–366.
- (16) Saddiq, A. A.; Khayyat, S. A. Chemical and Antimicrobial Studies of Monoterpene: Citral. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2010**, *98*, 89–93.
- (17) Tao, N.; OuYang, Q.; Jia, L. Citral Inhibits Mycelial Growth of *Penicillium Italicum* by a Membrane Damage Mechanism. *Food Control* **2014**, *41*, 116–121.
- (18) Pinto, E.; Gonçalves, M. J.; Hrimpeng, K.; Pinto, J.; Vaz, S.; Vale-Silva, L. A.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Thymus Villosus* Subsp. *Lusitanicus* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and Dermatophyte Species. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *51*, 93–99.
- (19) Gautam, N.; Mantha, A. K.; Mittal, S. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–13.
- (20) Carnecchi, S.; Bradaia, A.; Fischer, B.; Coelho, D.; Sholler-Guinard, M.; Gosse, F.; Raul, F. Perturbation by Geraniol of Cell Membrane Permeability and Signal Transduction Pathways in Human Colon Cancer Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 711–715.
- (21) Soares, D. C.; Portella, N. a; Ramos, M. F. D. S.; Siani, A. C.; Saraiva, E. M. Trans-B-Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* Spp.). *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 1–13.

- (22) Sabulal, B.; Dan, M.; J, A. J.; Kurup, R.; Pradeep, N.; Valsamma, R. K.; George, V. Caryophyllene-Rich Rhizome Oil of *Zingiber Nimmonii* from South India: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2469–2473.
- (23) Ashour, M. L.; El-Readi, M.; Youns, M.; Mulyaningsih, S.; Sporer, F.; Efferth, T.; Wink, M. Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil Obtained from *Bupleurum Marginatum* (Apiaceae). *J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, *61*, 1079–1087.
- (24) Amiel, E.; Ofir, R.; Dudai, N.; Soloway, E.; Rabinsky, T.; Rachmilevitch, S. B-Caryophyllene, a Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora Gileadensis*), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell Lines. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2012**, *2012*, 1–8.
- (25) Özkan, A.; Erdoğan, A. A Comparative Evaluation of Antioxidant and Anticancer Activity of Essential Oil from *Origanum Onites* (Lamiaceae) and Its Two Major Phenolic Components. *Turkish J. Biol.* **2011**, *35*, 735–742.
- (26) Baltzer, C.; Tiefenböck, S. K.; Frei, C. Mitochondria in Response to Nutrients and Nutrient-Sensitive Pathways. *Mitochondrion* **2010**, *10*, 589–597.
- (27) Bolender, N.; Sickmann, A.; Wagner, R.; Meisinger, C.; Pfanner, N. Multiple Pathways for Sorting Mitochondrial Precursor Proteins. *EMBO Rep.* **2008**, *9*, 42–49.
- (28) McBride, H. M.; Neuspiel, M.; Wasiak, S. Mitochondria: More than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, R551–R560.
- (29) Segura, C.; Blair, S. La Mitochondria En El Género *Plasmodium*. *Biomédica* **2003**, *23*, 351–363.
- (30) Frey, T.; Mannella, C. The Internal Structure of Mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 319–324.
- (31) Atamna, H.; Mackey, J.; Dhahbi, J. M. Mitochondrial Pharmacology: Electron Transport Chain Bypass as Strategies to Treat Mitochondrial Dysfunction. *Biofactors* **2012**, *38*, 158–166.
- (32) Mammucari, C.; Patron, M.; Granatiero, V.; Rizzuto, R. Molecules and Roles of Mitochondrial Calcium Signaling. *BioFactors* **2011**, *37*, 219–227.
- (33) Smith, R. A.; Hartley, R. C.; Cochemé, H. M.; Murphy, M. P. Mitochondrial Pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 341–352.

- (34) Wallace, D. C. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annu. Rev. Genet.* **2005**, *39*, 1–51.
- (35) Armstrong, J. S. Mitochondrial Medicine: Pharmacological Targeting of Mitochondria in Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 1154–1165.
- (36) Bertram, K.; Susan, M.; Anthony, T.; Martínez, A.; Pinto, B.; Roig, G.; Hernández, G.; Luis, J. *Farmacología Básica Y Clínica*. 11<sup>a</sup> Edición. New York, McGraw Hill, 2010. Pág. 11.
- (37) Florez, J.; Armijo, J.; Mediavilla, Á. *Farmacología Humana*. 4<sup>a</sup> Edición. Barcelona, Marsson, S.A., 1993. Pág. 14.
- (38) Aristil, P. *Manual de Farmacología Básica Y Clínica*. 5<sup>a</sup> Edición. México D.F., McGraw Hill, 2010. Pág. 3–7.
- (39) Jaramillo, F.; Cardona, E.; Rincón, A. R. *Farmacología General*. 2<sup>a</sup> Edición. México D.F., Departamento Editorial de La Universidad Autónoma de Aguascalientes, 2008. Cap. 1.
- (40) Feher, M.; Schmidt, J. M. Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 218–227.
- (41) Leach, A. R.; Hann, M. M. The in Silico World of Virtual Libraries. *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 326–336.
- (42) Hamm-Alvarez, S.; Cadenas, E. Mitochondrial Medicine and Mitochondrion-Based Therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1437–1438.
- (43) Scatena, R.; Bottoni, P.; Botta, G.; Martorana, G. E.; Giardina, B. The Role of Mitochondria in Pharmacotoxicology: A Reevaluation of an Old, Newly Emerging Topic. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2007**, *293*, C12–C21.
- (44) Lin, M. T.; Beal, M. F. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Nature* **2006**, *443*, 787–795.
- (45) Denicourt, C.; Dowdy, S. F. Targeting Apoptotic Pathways in Cancer Cells. *Science (80-. )*. **2004**, *305*, 1411–1413.
- (46) Kenakin, T. P. *A Pharmacology Primer: Theory, Applications, and Methods*. 2<sup>a</sup> Edición. United States of America, Elsevier Inc., 2006. Pág. 1–2.

- (47) Hernández R, M.; Sastre G, A. Tratado de Nutrición. Madrid, Ediciones Díaz de Santos S.A., 1999. Pág. 82.
- (48) Fornaguera, J.; Gómez, J. Bioquímica: La Ciencia de La Vida. Costa Rica, EUNED, 2004. Pág. 23–25.
- (49) Nelson, D.; Cox, M. Principles of Biochemistry. 5<sup>a</sup> Edición. New York, W.H. Freeman and Company, 2008. Pág. 723.
- (50) Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. Biochemistry. 5<sup>a</sup> Edición. New York, W.H. Freeman and Company, 2002. Pág. 502–503.
- (51) Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. Bioquímica. 5<sup>a</sup> Edición. New York, W.H. Freeman and Company, 2002. Pág. 503–504.
- (52) Devlin, T. Bioquímica. 3<sup>a</sup> Edición. Barcelona, Reverté S.A., 1999. Pág. 219.
- (53) Roach, J.; Lenyon, S. Lo Esencial En Metabolismo Y Nutrición. 2<sup>a</sup> Edición. España, Elsevier S.A., 2003. Pág. 11.
- (54) Bradley, F.; Peter, T. Bioquímica. New York, Reverté S.A., 1982. Pág. 308–309.
- (55) Teijón, J.; Garrido, A.; Blanco, D.; Villaverde, C.; Mendoza, C.; Ramírez, J. Fundamentos de Bioquímica Estructural. 2<sup>a</sup> Edición. Madrid, Tébar S.L., 2006. Pág. 434–435.
- (56) Santidrian, A.; Matsuno-Yagi, A.; Ritland, M.; Seo, B.; LeBoeuf, S.; Gay, L.; Yagi, T.; Habermann-Felding, B. Mitochondrial Complex I Activity and NAD<sup>+</sup>/NADH Balance Regulate Breast Cancer Progression. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 1068–1081.
- (57) Hatefi, Y. The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System. *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 1015–1069.
- (58) Grisham; Garrett. Biochemistry. 3<sup>a</sup> Edición. Canada, Thomson Brooks/Cole, 2005. Pág. 598–611.
- (59) Yankovskaya, V.; Horsefield, R.; Törnroth, S.; Luna-Chavez, C.; Miyoshi, H.; Léger, C.; Byrne, B.; Cecchini, G.; Iwata, S. Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation. *Science (80-. )*. **2003**, *299*, 700–704.
- (60) Hägerhäll, C. Succinate: Quinone Oxidoreductases. Variations on a Conserved Theme. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1320*, 107–141.

- (61) Quinlan, C.; Orr, A.; Perevoshchikova, I.; Treberg, J.; Ackrell, B.; Brand, M. Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27255–27264.
- (62) Nelson, D.; Cox, M. Principles of Biochemistry. 5<sup>a</sup> Edición. New York, W.H. Freeman and Company, 2008. Pág. 715.
- (63) Devlin, T. Bioquímica: Libro de Texto Con Aplicaciones Clínicas. 5<sup>a</sup> Edición. Barcelona, Reverté S.A., 2005. Pág. 570.
- (64) Richter, O.-M. H.; Ludwig, B. Cytochrome c Oxidase-Structure, Function, and Physiology of a Redox-Driven Molecular Machine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2003**, *147*, 47–74.
- (65) Cox, G. B.; Fimmel, A. L.; Gibson, F.; Hatch, L. The Mechanism of ATP Synthase: A Reassessment of the Functions of the a and B Subunits. **1986**, *849*, 62–69.
- (66) Müller, W. Bioquímica: Fundamentos Para Medicina Y Ciencias de La Vida. Barcelona, Reverté S.A., 2008. Pág. 518.
- (67) Voet, D.; Voet, J. Bioquímica. 3<sup>a</sup> Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S.A., 2006. Pág. 836.
- (68) Vasudevan, D.; Vaidyanathan, K. Texto de Bioquímica Para Estudiantes de Medicina. 6<sup>a</sup> Edición. Guadalajara, Editorial Cuéllar Ayala, 2011. Pág. 234.
- (69) Devlin, T. Bioquímica: Libro de Texto Con Aplicaciones Clínicas. 4<sup>a</sup> Edición. Barcelona, Reverté S.A., 2004. Pág. 578.
- (70) Pacheco, D. Bioquímica Médica. México D.F., Editorial Limusa S.A., 2004. Pág. 221.
- (71) Terada, H. Uncouplers of Oxidative Phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *87*, 213–218.
- (72) Thompson, C. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science (80- .)*. **1995**, *267*, 1456–1462.
- (73) Sánchez, D.; Trejo, N. Biología Celular Y Molecular. México D.F., Editorial Cep, 2006. Pág. 158.
- (74) Costantini, P.; Jacotot, E.; Decaudin, D.; Kroemer, G. Mitochondrion as a Novel Target of Anticancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 1042–1053.

- (75) Green, D.; Kroemer, G. The Central Executioners of Apoptosis: Caspases or Mitochondria? *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 267–271.
- (76) Kroemer, G.; Dallaporta, B.; Resche-Rigon, M. The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 619–642.
- (77) Chowdhury, I.; Tharakan, B.; Bhat, G. K. Caspases - An Update. *Comp. Biochem. Physiol., Part B Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *151*, 10–27.
- (78) Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology*. 5<sup>a</sup> Edición. New York, W.H. Freeman and Company, 2005. Pág.
- (79) Cooper, G. *The Cell: A Molecular Approach*. 2<sup>a</sup> Edición. Sunderland, Sinauer Associates, 2000. Pág.
- (80) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>a</sup> Edición. New York, Garland Science, 2002,. Pág.
- (81) Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira; Kaiser, C.; Krieger, M.; Scott, M.; Zipursky, J. *Biología Celular Y Molecular*. 5<sup>a</sup> Edición. Argentina, Editorial Médica Panamericana S.A., 2005. Pág. 928.
- (82) Delves, P.; Martín, S.; Burton, D.; Roitt, I. *Inmunología. Fundamentos*. 5<sup>a</sup> Edición. Madrid, Editorial Médica Panamericana S.A., 2006. Pág. 156.
- (83) Repetto, M.; Repetto, G. *Toxicología Fundamental*. 4<sup>a</sup> Edición. España, Ediciones Díaz de Santos, 2009. Pág. 167.
- (84) Ross, M.; Pawlin, W. *Histología. Textos Y Atlas Color Con Biología Celular Y Molecular*. 5<sup>a</sup> Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S.A., 2008. Pág. 100–101.
- (85) Kumar, V.; Cotran, R.; Robbins, S. *Patología Humana*. 8<sup>a</sup> Edición. Barcelona, Elsevier S.L., 2008. Pág. 16.
- (86) Sen, S.; Chakraborty, R. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*. United States of America, Oxford University Press Inc., 2011,. Pág. 3.
- (87) Sinha, K.; Das, J.; Pal, P. B.; Sil, P. C. Oxidative Stress: The Mitochondria-Dependent and Mitochondria-Independent Pathways of Apoptosis. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87*, 1157–1180.

- (88) Repetto, M.; Repetto, G. Toxicología Fundamental. 4ª Edición. España, Ediciones Díaz de Santos, 2009. Pág. 180.
- (89) Voet, D.; Voet, J.; Pratt, C. Fundamentos de Bioquímica, La Vida a Nivel Molecular. 3ª Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S.A., 2006. Pág. 585.
- (90) Liu, Y.; Fiskum, G.; Schubert, D. Generation of Reactive Oxygen Species by the Mitochondrial Electron Transport Chain. *J. Neurochem.* **2002**, *80*, 780–787.
- (91) Ott, M.; Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Mitochondria, Oxidative Stress and Cell Death. *Apoptosis* **2007**, *12*, 913–922.
- (92) Farrugia, G.; Balzan, R. Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast. *Front. Oncol.* **2012**, *2*, 1–21.
- (93) Barja, G. Mitochondrial Oxygen Radical Generation and Leak: Sites of Production in States 4 and 3, Organ Specificity, and Relation to Aging and Longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1999**, *31*, 347–366.
- (94) Orrenius, S.; Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 143–183.
- (95) Brand, M. D.; Affourtit, C.; Esteves, T. C.; Green, K.; Lambert, A. J.; Miwa, S.; Pakay, J. L.; Parker, N. Mitochondrial Superoxide: Production, Biological Effects, and Activation of Uncoupling Proteins. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37*, 755–767.
- (96) Beltrán, B.; Mathur, A.; Duchon, M.; Erusalimsky, J.; Moncada, S. The Effect of Nitric Oxide on Cell Respiration: A Key to Understanding Its Role in Cell Survival or Death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 14602–14607.
- (97) Brown, G. Regulation of Mitochondrial Respiration by Nitric Oxide Inhibition of Cytochrome c Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1504*, 46–57.
- (98) Dinor, O.; Annibal, P.; Bacila, C.; Bacila, M. The Respiratory Chain and the Oxidative Phosphorylation of Rat Brain Mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1961**, *4*, 48–51.
- (99) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (100) Singer, P. Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and Alfa-Glycerophosphate Dehydrogenases. *Methods Biochem. Anal.* **1974**, *22*, 123–175.

- (101) Somlo, M. Induction Des Lactico-Cytochrome c Reductases (D-ET L-) de La Levure Aerobie Par Les Lactates (D-ET L-). *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, *97*, 183–201.
- (102) Mason, T. L.; Poyton, R. O.; Wharton, C.; Schatz, G. Cytochrome c Oxidase from Bakers' Yeast: I. Isolation and Properties. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 1346–1354.
- (103) Pullman, M. E.; Penefsky, H. S.; Datta, A.; Racker, E. Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative: I. Purification and Properties of Soluble, Dinitrophenol-Stimulated Adenosine Triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 3322–3329.
- (104) Summer, J. B. Scientific Apparatus and Laboratory Methods. A Method for the Colorimetric Determination of Phosphorus. *Scientific* **1944**, *100*, 413–414.
- (105) Moncada, J. Estadística Para Ciencias Del Movimiento Humano. Costa Rica, Editorial de La Universidad de Costa Rica, 2005. Pág. 37.
- (106) Trumbeckait, S.; Burdulis, D.; Raudon, L.; Liobikas, J.; Toleikis, A.; Janulis, V. Direct Effects of Vaccinium Myrtillus L. Fruit Extracts on Rat Heart Mitochondrial Functions. *Phytother. Res.* **2013**, *27*, 499–506.
- (107) Galkin, M.; Venard, R.; Vaillier, J.; Velours, J.; Haraux, F. Functional Transitions of FoF1-ATPase Mediated by the Inhibitory Peptide IF1 in Yeast Coupled Submitochondrial Particles. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1963–1970.
- (108) Mendez-Sanchez, S. C.; Martinez, G. R.; Romão, S.; Echevarria, A.; Silva, E. F.; Rocha, M. E. M.; Noleto, G. R.; Carnieri, E. G. S.; Cadena, S. M. S. C.; de Oliveira, M. B. M. The Inhibition of Lipoperoxidation by Mesoionic Compound MI-D: A Relationship with Its Uncoupling Effect and Scavenging Activity. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *179*, 125–130.
- (109) Ilic, A. Biological Activities of Selected Mono- and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine, Universität Wien, 2013, pp. 1–93.
- (110) Cardoso, J.; Soares, M. J. In Vitro Effects of Citral on Trypanosoma Cruzi Metacyclogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 1026–1032.
- (111) Chen, Y.; McMillan-Ward, E.; Kong, J.; Israels, S. J.; Gibson, S. B. Mitochondrial Electron-Transport-Chain Inhibitors of Complexes I and II Induce Autophagic Cell Death Mediated by Reactive Oxygen Species. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 4155–4166.
- (112) Zhang, J.-G.; Tirmenstein, M. A.; Nicholls-Grzemski, F. A.; Fariss, M. W. Mitochondrial Electron Transport Inhibitors Cause Lipid Peroxidation-Dependent

and -Independent Cell Death: Protective Role of Antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *393*, 87–96.

- (113) Ota, Y.; Hamada, A.; Nakano, M.; Saito, H. Evaluation of Percutaneous Absorption of Midazolam by Terpenes. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2003**, *18*, 261–266.
- (114) Bard, M.; Albrecht, M.; Gupta, N.; Guynn, C.; Stillwell, W. Geraniol Interferes with Membrane Functions in Strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids* **1988**, *23*, 534–538.
- (115) Zore, G. B.; Thakre, A. D.; Jadhav, S.; Karuppayil, S. M. Terpenoids Inhibit *Candida Albicans* Growth by Affecting Membrane Integrity and Arrest of Cell Cycle. *Phytomedicine* **2011**, *18*, 1181–1190.
- (116) Oster, G.; Wang, H. ATP Synthase: Two Motors, Two Fuels. *Structure* **1999**, *7*, R67–R72.

## BIBLIOGRAFIA

Abraham, D.; Braguini, W.; Kelmer-Bracht, A.; Ishii-Iwamoto, E. Effects of Four Monoterpenes on Germination, Primary Root Growth, and Mitochondrial Respiration of Maize. *J. Chem. Ecol.* 2000, 26, 611–624.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>a</sup> Edición. New York, Garland Science, 2002,. Pág.

Amiel, E.; Ofir, R.; Dudai, N.; Soloway, E.; Rabinsky, T.; Rachmilevitch, S. B-Caryophyllene, a Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora Gileadensis*), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell Lines. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2012, 2012, 1–8.

Armstrong, J. S. Mitochondrial Medicine: Pharmacological Targeting of Mitochondria in Disease. *Br. J. Pharmacol.* 2007, 151, 1154–1165

Atamna, H.; Mackey, J.; Dhahbi, J. M. Mitochondrial Pharmacology: Electron Transport Chain Bypass as Strategies to Treat Mitochondrial Dysfunction. *Biofactors* 2012, 38, 158–166.

Aristil, P. *Manual de Farmacología Básica Y Clínica*. 5<sup>a</sup> Edición. México D.F., McGraw Hill, 2010. Pág. 3–7.

Ashour, M. L.; El-Readi, M.; Youns, M.; Mulyaningsih, S.; Sporer, F.; Efferth, T.; Wink, M. Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil Obtained from *Bupleurum Marginatum* (Apiaceae). *J. Pharm. Pharmacol.* 2009, 61, 1079–1087.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological Effects of Essential Oils- A Review. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 446–475.

Baltzer, C.; Tiefenböck, S. K.; Frei, C. Mitochondria in Response to Nutrients and Nutrient-Sensitive Pathways. *Mitochondrion* 2010, 10, 589–597.

Bard, M.; Albrecht, M.; Gupta, N.; Guynn, C.; Stillwell, W. Geraniol Interferes with Membrane Functions in Strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids* 1988, 23, 534–538.

Barja, G. Mitochondrial Oxygen Radical Generation and Leak: Sites of Production in States 4 and 3, Organ Specificity, and Relation to Aging and Longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999, 31, 347–366.

Beltrán, B.; Mathur, A.; Duchen, M.; Erusalimsky, J.; Moncada, S. The Effect of Nitric Oxide on Cell Respiration: A Key to Understanding Its Role in Cell Survival or Death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97, 14602–14607.

Bertram, K.; Susan, M.; Anthony, T.; Martínez, A.; Pinto, B.; Roig, G.; Hernández, G.; Luis, J. *Farmacología Básica Y Clínica*. 11<sup>a</sup> Edición. New York, McGraw Hill, 2010. Pág. 11.

Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. *Biochemistry*. 5<sup>a</sup> Edición. New York, W.H. Freeman and Company, 2002. Pág. 502–503.

Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. *Bioquímica*. 5<sup>a</sup> Edición. New York, W.H. Freeman and Company, 2002. Pág. 503–504.

Bolender, N.; Sickmann, A.; Wagner, R.; Meisinger, C.; Pfanner, N. Multiple Pathways for Sorting Mitochondrial Precursor Proteins. *EMBO Rep.* 2008, 9, 42–49.

Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.

Bradley, F.; Peter, T. *Bioquímica*. New York, Reverté S.A., 1982. Pág. 308–309.

Brand, M. D.; Affourtit, C.; Esteves, T. C.; Green, K.; Lambert, A. J.; Miwa, S.; Pakay, J. L.; Parker, N. Mitochondrial Superoxide: Production, Biological Effects, and Activation of Uncoupling Proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 37, 755–767

Brown, G. Regulation of Mitochondrial Respiration by Nitric Oxide Inhibition of Cytochrome c Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, *1504*, 46–57.

Cardoso, J.; Soares, M. J. In Vitro Effects of Citral on Trypanosoma Cruzi Metacyclogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2010, *105*, 1026–1032.

Carnecchi, S.; Bradaia, A.; Fischer, B.; Coelho, D.; Sholler-Guinard, M.; Gosse, F.; Raul, F. Perturbation by Geraniol of Cell Membrane Permeability and Signal Transduction Pathways in Human Colon Cancer Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002, *303*, 711–715.

Cooper, G. The Cell: A Molecular Approach. 2<sup>a</sup> Edición. Sunderland, Sinauer Associates, 2000. Pág.

Costantini, P.; Jacotot, E.; Decaudin, D.; Kroemer, G. Mitochondrion as a Novel Target of Anticancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, *92*, 1042–1053.

Cox, G. B.; Fimmel, A. L.; Gibson, F.; Hatch, L. The Mechanism of ATP Synthase: A Reassessment of the Functions of the a and B Subunits. 1986, *849*, 62–69.

Chaturvedi, R. K.; Flint Beal, M. Mitochondrial Diseases of the Brain. *Free Radic. Biol. Med.* 2013, *63*, 1–29.

Chen, Y.; McMillan-Ward, E.; Kong, J.; Israels, S. J.; Gibson, S. B. Mitochondrial Electron-Transport-Chain Inhibitors of Complexes I and II Induce Autophagic Cell Death Mediated by Reactive Oxygen Species. *J. Cell Sci.* 2007, *120*, 4155–4166.

Chowdhury, I.; Tharakan, B.; Bhat, G. K. Caspases - An Update. *Comp. Biochem. Physiol., Part B Biochem. Mol. Biol.* 2008, *151*, 10–27.

Denicourt, C.; Dowdy, S. F. Targeting Apoptotic Pathways in Cancer Cells. *Science (80-. ).* 2004, *305*, 1411–1413.

Delves, P.; Martín, S.; Burton, D.; Roitt, I. Inmunología. Fundamentos. 5<sup>a</sup> Edición. Madrid, Editorial Médica Panamericana S.A., 2006. Pág. 156.

Devlin, T. Bioquímica. 3<sup>a</sup> Edición. Barcelona, Reverté S.A., 1999. Pág. 219.

Devlin, T. Bioquímica: Libro de Texto Con Aplicaciones Clínicas. 5<sup>a</sup> Edición. Barcelona, Reverté S.A., 2005. Pág. 570.

Devlin, T. Bioquímica: Libro de Texto Con Aplicaciones Clínicas. 4<sup>a</sup> Edición. Barcelona, Reverté S.A., 2004. Pág. 578.

Dinor, O.; Annibal, P.; Bacila, C.; Bacila, M. The Respiratory Chain and the Oxidative Phosphorylation of Rat Brain Mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1961, 4, 48–51.

Farrugia, G.; Balzan, R. Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast. *Front. Oncol.* 2012, 2, 1–21

Feher, M.; Schmidt, J. M. Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003, 43, 218–227.

Fornaguera, J.; Gómez, J. Bioquímica: La Ciencia de La Vida. Costa Rica, EUNED, 2004. Pág. 23–25.

Florez, J.; Armijo, J.; Mediavilla, Á. Farmacología Humana. 4<sup>a</sup> Edición. Barcelona, Marsson, S.A., 1993. Pág. 14.

Frey, T.; Mannella, C. The Internal Structure of Mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 2000, 25, 319–324.

Galkin, M.; Venard, R.; Vaillier, J.; Velours, J.; Haraux, F. Functional Transitions of FoF1-ATPase Mediated by the Inhibitory Peptide IF1 in Yeast Coupled Submitochondrial Particles. *Eur. J. Biochem.* 2004, 271, 1963–1970.

Ganjewala, D.; Luthra, R. Essential Oil Biosynthesis and Metabolism of Geranyl Acetate and Geraniol in Developing *Cymbopogon Flexuosus* (Nees Ex Steud) Wats Mutant Cv. GRL-1 Leaf. *Am. J. Plant Physiol.* 2007, 4, 269–275.

Gautam, N.; Mantha, A. K.; Mittal, S. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. *Biomed Res. Int.* 2014, 2014, 1–13.

Green, D.; Kroemer, G. The Central Executioners of Apoptosis: Caspases or Mitochondria? *Trends Cell Biol.* 1998, 8, 267–271.

Grisham; Garrett. *Biochemistry*. 3<sup>a</sup> Edición. Canada, Thomson Brooks/Cole, 2005. Pág. 598–611.

Hägerhäll, C. Succinate: Quinone Oxidoreductases. Variations on a Conserved Theme. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1320, 107–141.

Hamm-Alvarez, S.; Cadenas, E. Mitochondrial Medicine and Mitochondrion-Based Therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008, 60, 1437–1438.

Hatefi, Y. The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System. *Annu. Rev. Biochem.* 1985, 54, 1015–1069.

Hernández R, M.; Sastre G, A. *Tratado de Nutrición*. Madrid, Ediciones Díaz de Santos S.A., 1999. Pág. 82.

Ilic, A. *Biological Activities of Selected Mono- and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine*, Universität Wien, 2013, pp. 1–93.

Jaramillo, F.; Cardona, E.; Rincón, A. R. *Farmacología General*. 2ª Edición. México D.F., Departamento Editorial de La Universidad Autónoma de Aguascalientes, 2008. Cap. 1.

Kakarla, S.; Ganjewala, D. Antimicrobial Activity of Essential Oils of Four Lemongrass (*Cymbopogon Flexuosus* Steud) Varieties. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 2009, 3, 107–109.

Kenakin, T. P. *A Pharmacology Primer: Theory, Applications, and Methods*. 2ª Edición. United States of America, Elsevier Inc., 2006. Pág. 1–2.

Kumar, A.; Malik, F.; Bhushan, S.; Sethi, V. K.; Shahi, A. K.; Kaur, J.; Taneja, S. C.; Qazi, G. N.; Singh, J. An Essential Oil and Its Major Constituent Isointermedeol Induce Apoptosis by Increased Expression of Mitochondrial Cytochrome c and Apical Death Receptors in Human Leukaemia HL-60 Cells. *Chem. Biol. Interact.* 2008, 171, 332–347.

Kumar, V.; Cotran, R.; Robbins, S. *Patología Humana*. 8ª Edición. Barcelona, Elsevier S.L., 2008. Pág. 16.

Kroemer, G.; Dallaporta, B.; Resche-Rigon, M. The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1998, 60, 619–642.

Leach, A. R.; Hann, M. M. The in Silico World of Virtual Libraries. *Drug Discov. Today* 2000, 5, 326–336.

Liu, Y.; Fiskum, G.; Schubert, D. Generation of Reactive Oxygen Species by the Mitochondrial Electron Transport Chain. *J. Neurochem.* 2002, 80, 780–787.

Lin, M. T.; Beal, M. F. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Nature* 2006, 443, 787–795.

Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira; Kaiser, C.; Krieger, M.; Scott, M.; Zipursky, J. *Biología Celular Y Molecular*. 5ª Edición. Argentina, Editorial Médica Panamericana S.A., 2005. Pág. 928.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology*. 5<sup>a</sup> Edición. New York, W.H. Freeman and Company, 2005. Pág.

Lonkar, P. B.; Chavan, U. D.; Pawar, V. D.; Bansode, V. V.; Amarowicz, R. Studies on Preparation and Preservation of Lemongrass (*Cymbopogon Flexuosus* (Steud) Wats) Powder for Tea. *Emirates J. Food Agric.* 2013, 25, 585–592.

Mammucari, C.; Patron, M.; Granatiero, V.; Rizzuto, R. Molecules and Roles of Mitochondrial Calcium Signaling. *BioFactors* 2011, 37, 219–227.

Maskinen, J.; Athela, D. K.; Mathela, C. S. Composition of the Essential Oil of *Cymbopogon Flexuosus*. *J. Chromatogr.* 1983, 262, 364–366.

Mason, T. L.; Poyton, R. O.; Wharton, C.; Schatz, G. Cytochrome c Oxidase from Bakers' Yeast: I. Isolation and Properties. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 1346–1354.

McBride, H. M.; Neuspiel, M.; Wasiak, S. Mitochondria: More than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.* 2006, 16, R551–R560.

Mendez-Sanchez, S. C.; Martinez, G. R.; Romão, S.; Echevarria, A.; Silva, E. F.; Rocha, M. E. M.; Noleto, G. R.; Carnieri, E. G. S.; Cadena, S. M. S. C.; de Oliveira, M. B. M. The Inhibition of Lipoperoxidation by Mesoionic Compound MI-D: A Relationship with Its Uncoupling Effect and Scavenging Activity. *Chem. Biol. Interact.* 2009, 179, 125–130.

Moncada, J. *Estadística Para Ciencias Del Movimiento Humano*. Costa Rica, Editorial de La Universidad de Costa Rica, 2005. Pág. 37.

Müller, W. *Bioquímica: Fundamentos Para Medicina Y Ciencias de La Vida*. Barcelona, Reverté S.A., 2008. Pág. 518.

Nelson, D.; Cox, M. *Principles of Biochemistry*. 5<sup>a</sup> Edición. New York, W.H. Freeman and Company, 2008. Pág. 723.

Nelson, D.; Cox, M. Principles of Biochemistry. 5<sup>a</sup> Edición. New York, W.H. Freeman and Company, 2008. Pág. 715.

Orrenius, S.; Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007, 47, 143–183.

Ortiz, R.; Vega, G.; Tamajón, A. Instructivo Técnico Para El Cultivo de *Cymbopogon Citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). *Rev. Cuba. Plant. Med.* 2002, 7, 89–95.

Ota, Y.; Hamada, A.; Nakano, M.; Saito, H. Evaluation of Percutaneous Absorption of Midazolam by Terpenes. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2003, 18, 261–266.

Ott, M.; Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Mitochondria, Oxidative Stress and Cell Death. *Apoptosis* 2007, 12, 913–922.

Oster, G.; Wang, H. ATP Synthase: Two Motors, Two Fuels. *Structure* 1999, 7, R67–R72.

Özkan, A.; Erdoğan, A. A Comparative Evaluation of Antioxidant and Anticancer Activity of Essential Oil from *Origanum Onites* (Lamiaceae) and Its Two Major Phenolic Components. *Turkish J. Biol.* 2011, 35, 735–742.

Pacheco, D. Bioquímica Médica. México D.F., Editorial Limusa S.A., 2004. Pág. 221.

Pinto, E.; Gonçalves, M. J.; Hrimpeng, K.; Pinto, J.; Vaz, S.; Vale-Silva, L. A.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Thymus Villosus* Subsp. *Lusitanicus* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and Dermatophyte Species. *Ind. Crops Prod.* 2013, 51, 93–99.

Pires, A. D. R. A.; de Oliveira, M. B. M.; Echevarria, A.; Silva, E. F.; Rocha, M. E. M.; Carnieri, E. G. S.; Martinez, G. R.; Noletto, G. R.; Cadena, S. M. S. C. Comparative Study of the Effects of 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Derivatives on Energy-Linked Functions of Rat Liver Mitochondria. *Chem. Biol. Interact.* 2010, 186, 1–8.

Pullman, M. E.; Penefsky, H. S.; Datta, A.; Racker, E. Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative: I. Purification and Properties of Soluble, Dinitrophenol-Stimulated Adenosine Triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 1960, 235, 3322–3329.

Prado, S. R. T.; Cechinel-Filho, V.; Campos-Buzzi, F.; Corrêa, R.; Cadena, S. M. C. S.; de Oliveira, M. B. M. Biological Evaluation of Some Selected Cyclic Imides: Mitochondrial Effects and in Vitro Cytotoxicity. *Z. Naturforsch. C.* 2004, 59, 663–672.

Quinlan, C.; Orr, A.; Perevoshchikova, I.; Treberg, J.; Ackrell, B.; Brand, M. Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 27255–27264.

Repetto, M.; Repetto, G. Toxicología Fundamental. 4<sup>a</sup> Edición. España, Ediciones Díaz de Santos, 2009. Pág. 167.

Repetto, M.; Repetto, G. Toxicología Fundamental. 4<sup>a</sup> Edición. España, Ediciones Díaz de Santos, 2009. Pág. 180.

Richter, O.-M. H.; Ludwig, B. Cytochrome c Oxidase-Structure, Function, and Physiology of a Redox-Driven Molecular Machine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2003, 147, 47–74.

Roach, J.; Lenyon, S. Lo Esencial En Metabolismo Y Nutrición. 2<sup>a</sup> Edición. España, Elsevier S.A., 2003. Pág. 11.

Rodríguez Qa, R.; Ruiz N, C.; Arias M, G.; Castro S, H.; Martínez, J.; Stashenko, E. Estudio Comparativo de La Composición de Los Aceites Esenciales de Cuatro Especies Del Género *Cymbopogon* (Poaceae) Cultivadas En Colombia. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 2012, 11, 77–85.

Ross, M.; Pawlin, W. Histología. Textos Y Atlas Color Con Biología Celular Y Molecular. 5<sup>a</sup> Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S.A., 2008. Pág. 100–101.

Sabulal, B.; Dan, M.; J, A. J.; Kurup, R.; Pradeep, N.; Valsamma, R. K.; George, V. Caryophyllene-Rich Rhizome Oil of Zingiber Nimmonii from South India: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity. *Phytochemistry* 2006, 67, 2469–2473.

Saddiq, A. A.; Khayyat, S. A. Chemical and Antimicrobial Studies of Monoterpene: Citral. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2010, 98, 89–93.

Sánchez, D.; Trejo, N. Biología Celular Y Molecular. México D.F., Editorial Cep, 2006. Pág. 158.

Santidrian, A.; Matsuno-Yagi, A.; Ritland, M.; Seo, B.; LeBoeuf, S.; Gay, L.; Yagi, T.; Habermann-Felding, B. Mitochondrial Complex I Activity and NAD<sup>+</sup>/NADH Balance Regulate Breast Cancer Progression. *J. Clin. Invest.* 2013, 123, 1068–1081.

Scatena, R.; Bottoni, P.; Botta, G.; Martorana, G. E.; Giardina, B. The Role of Mitochondria in Pharmacotoxicology: A Reevaluation of an Old, Newly Emerging Topic. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007, 293, C12–C21.

Segura, C.; Blair, S. La Mitocondria En El Género Plasmodium. *Biomédica* 2003, 23, 351–363.

Sen, S.; Chakraborty, R. Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy. United States of America, Oxford University Press Inc., 2011., Pág. 3.

Soares, D. C.; Portella, N. a; Ramos, M. F. D. S.; Siani, A. C.; Saraiva, E. M. Trans-B-Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* Spp.). *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013, 2013, 1–13.

Singer, P. Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and Alfa-Glycerophosphate Dehydrogenases. *Methods Biochem. Anal.* 1974, 22, 123–175.

Sinha, K.; Das, J.; Pal, P. B.; Sil, P. C. Oxidative Stress: The Mitochondria-Dependent and Mitochondria-Independent Pathways of Apoptosis. *Arch. Toxicol.* 2013, 87, 1157–1180.

Somlo, M. Induction Des Lactico-Cytochrome c Reductases (D-ET L-) de La Levure Aerobie Par Les Lactates (D-ET L-). *Biochim. Biophys. Acta* 1965, 97, 183–201.

Summer, J. B. Scientific Apparatus and Laboratory Methods. A Method for the Colorimetric Determination of Phosphorus. *Scientific* 1944, 100, 413–414.

Sharma, P. R.; Mondhe, D. M.; Muthiah, S.; Pal, H. C.; Shahi, A. K.; Saxena, A. K.; Qazi, G. N. Anticancer Activity of an Essential Oil from *Cymbopogon Flexuosus*. *Chem. Biol. Interact.* 2009, 179, 160–168.

Smith, R. A.; Hartley, R. C.; Cochemé, H. M.; Murphy, M. P. Mitochondrial Pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 2012, 33, 341–352.

Tao, N.; OuYang, Q.; Jia, L. Citral Inhibits Mycelial Growth of *Penicillium Italicum* by a Membrane Damage Mechanism. *Food Control* 2014, 41, 116–121.

Teijón, J.; Garrido, A.; Blanco, D.; Villaverde, C.; Mendoza, C.; Ramírez, J. Fundamentos de Bioquímica Estructural. 2ª Edición. Madrid, Tébar S.L., 2006. Pág. 434–435.

Terada, H. Uncouplers of Oxidative Phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* 1990, 87, 213–218.

Thappa, R. K.; Hhar, K. L.; Atal, C. K. Isointermedeol, A New Sesquiterpene Alcohol from *Cymbopogon Flexuosus*. *Phytochemistry* 1979, 18, 671–672.

Thompson, C. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* (80- ). 1995, 267, 1456–1462.

Trumbeckait, S.; Burdulis, D.; Raudon, L.; Liobikas, J.; Toleikis, A.; Janulis, V. Direct Effects of *Vaccinium Myrtillus* L. Fruit Extracts on Rat Heart Mitochondrial Functions. *Phytother. Res.* 2013, 27, 499–506.

Vasudevan, D.; Vaidyanathan, K. Texto de Bioquímica Para Estudiantes de Medicina. 6<sup>a</sup> Edición. Guadalajara, Editorial Cuéllar Ayala, 2011. Pág. 234.

Voet, D.; Voet, J. Bioquímica. 3<sup>a</sup> Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S.A., 2006. Pág. 836.

Voet, D.; Voet, J.; Pratt, C. Fundamentos de Bioquímica, La Vida a Nivel Molecular. 3<sup>a</sup> Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S.A., 2006. Pág. 585.

Wallace, D. C. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Ageing, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annu. Rev. Genet.* 2005, 39, 1–51.

Wallace, K.; Starkov, A. Mitochondrial Targets of Drug Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000, 40, 353–388.

Yankovskaya, V.; Horsefield, R.; Törnroth, S.; Luna-Chavez, C.; Miyoshi, H.; Léger, C.; Byrne, B.; Cecchini, G.; Iwata, S. Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation. *Science* (80-. ). 2003, 299, 700–704.

Zore, G. B.; Thakre, A. D.; Jadhav, S.; Karuppayil, S. M. Terpenoids Inhibit *Candida Albicans* Growth by Affecting Membrane Integrity and Arrest of Cell Cycle. *Phytomedicine* 2011, 18, 1181–1190.

Zhang, J.-G.; Tirmenstein, M. A.; Nicholls-Grzemeski, F. A.; Fariss, M. W. Mitochondrial Electron Transport Inhibitors Cause Lipid Peroxidation-Dependent and -Independent Cell Death: Protective Role of Antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001, 393, 87–96.

# ANEXOS

## Anexo A. Divulgación de resultados

Fitoextractivos, ingredientes naturales, fitocosméticos y suplementos dietarios  
**CIENCIA, INNOVACIÓN Y TECNOLOGÍA**

1ER. CONGRESO INTERNACIONAL DE PRODUCTOS FITOFARMACÉUTICOS

**EL COLEGIO NACIONAL DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS DE COLOMBIA**

**CERTIFICA QUE:**

**DIANA CAROLINA MONTAGUT GUEVARA**

Asistió al 1er. Congreso Internacional de Productos Fitofarmacéuticos, con una intensidad de 16 horas los días 11 y 12 de octubre de 2013.

**EN CALIDAD DE:**

**PONENTE**

Bogotá, octubre 12 de 2013

  
**Jazmin Prieto Maldonado**  
Presidente del Congreso

  
**Juan Carlos Soto C.**  
Junta Directiva Nacional

**ORGANIZA**  **Colégio Nacional de Químicos Farmacéuticos de Colombia**

**APOYAN**  **APQVIA**  **UNIVALLE**  **UNICEN**  **UNICEN**  **UNICEN**  **UNICEN**  **UNICEN**  **UNICEN**  **UNICEN**  **UNICEN**  **UNICEN**  **UNICEN**  **UNICEN**  **UNICEN**



31° CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA  
CLAQ - 2014

XXVII CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA

Lima, Perú 14 - 17 de octubre del 2014

"Latinoamérica unida por la química sostenible"



## CONSTANCIA

La Dirección Científica deja constancia que el trabajo científico:

**Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre la actividad de enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial**

de los autores:

**Diana Montagut Guevara, Stelia Mendez Sanchez y Elena Stashenko**

ha sido presentado al 31° Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ-2014) – XXVII Congreso Peruano de Química, realizado del 14 al 17 de octubre del año 2014 en la ciudad de Lima, Perú.

Lima, 17 de octubre de 2014

Dra. Ana María Muñoz J.  
Secretaria Ejecutiva

Dra. Ana C. Valderrama Negrón  
Directora Científica



**31° CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA**  
**CLAQ 2014**  
**XXVII CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA**  
**"Latinoamérica unida por la química sostenible"**  
**LIMA, PERÚ**



## **CERTIFICADO**

La Mesa Directiva otorga a:

*Diana Carolina Montagut Suenara*

por su participación en el 31° Congreso Latinoamericano de Química y XXVII Congreso Peruano de Química, realizado en la ciudad de Lima, del 14 al 17 de octubre del 2014, en calidad de: **Asistente**

Lima, 17 de octubre del 2014

*Ana María Muñoz Jauregui*  
Secretaría



*Mario Ceroni Calleso*  
Presidente

