

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE
Eucalyptus citriodora SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCODRIAL

LUIS CARLOS VESGA GAMBOA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2013

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE
Eucalyptuscitriodora SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCODRIAL

LUIS CARLOS VESGA GAMBOA
Proyecto de grado para optar al título de
Químico

Directora
Dra. STELIA CAROLINA MÉNDEZ SÁNCHEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2013

“ A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Ha sido un privilegio ser su hijo, son los mejores padres.”

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de Dios y muchas personas, las cuales quiero expresar mis mas profundos agradecimientos.

En primer lugar, a mi directora, maestra y “madre científica”, la Dra Stelia Carolina Méndez Sánchez. Gracias por todas sus enseñanzas científicas en el campo de la bioenergética, gracias por su inagotable optimismo, por la confianza que depositó en mi, y por su capacidad de hacer sacar a cada uno lo mejor de si mismo.

A mis padres Carmen y Carlos, que desde el primer momento han confiado en mi y se han sacrificado para darme lo mejor cada día, por darme toda la libertad para elegir e intentar hacer todo lo que me proponga en la vida, estando siempre ahí para aconsejarme y ayudarme. A mi hermano pipe en quien encuentro siempre un gran apoyo, a mi nona Carmen quien se trasnochaba y madrugaba para hacerme las comidas con toda la humildad y cariño del mundo, a los que están y a los que ya se fueron. A toda mi familia, en especial a mis tias, que siempre tienen para mi una sonrisa en su cara.

A mis compañeros del Grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología, quienes siempre estuvieron pendientes y al tanto para brindarme una mano de apoyo en cualquier momento que lo necesitara.

A todos mis amigos y amigas, especialmente: Diana, Keyla, Mayra, Anderson, Kristty, Kheila S, Carlos, Lady, Alba, Fabian, Faruck; con los que he crecido, he discutido, he viajado, me he hecho mayor, hemos descubierto cosas nuevas, no hemos equivocado y hemos disfrutado tanto juntos.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. MARCO TEÓRICO.....	18
3.1. Eucalyptuscitriodora (<i>Hook</i>).....	18
3.1.1. Etnofarmacología	18
3.1.2. Composición química.....	19
3.1.3. Toxicidad	22
3.2. La Mitocondria	22
3.2.1. Muerte celular	24
3.2.2. Transporte de calcio en la mitocondria.	29
3.2.3. Estrés oxidativo	30
3.2.4. Fosforilación oxidativa	31
3.2.5. Respiración mitocondrial	34
3.2.6. Inhibidores de los complejos mitocondriales	37
3.3. Farmacología mitocondrial	42
3.3.1. Fármacos proapoptóticos	43
3.3.2. Fármacos antiapoptóticos.	43
3.3.3. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos.	44
4. MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1. Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata.....	44
4.2. Determinación de la concentración de proteínas mitocondriales	45
4.3. Determinación del consumo de oxígeno.....	45
4.4. Preparación de la suspensión de mitocondrias para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales.....	46
4.4.1. NADH oxidasa EC 1.6.3.1	46
4.4.2. NADH deshidrogenasa EC 1. 6.99.3.....	47
4.4.3. NADH citocromo c reductasa	47

4.4.4.	Succinato oxidasa	47
4.4.5.	Succinatodeshidrogenasa EC 1.5.3.1	48
4.4.6.	Succinato citocromo c reductasa EC 1.6.99.1.....	48
4.4.7.	Citocromo c oxidasa EC 1.9.3.1	48
4.4.8.	Actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas	49
4.4.9.	Actividad ATPasa en mitocondrias integras.	49
4.5.	Análisis estadístico.....	50
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
5.1.	Análisis control respiratorio	50
5.2.	Análisis de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.....	54
5.2.1.	NADH oxidasa	55
5.2.2.	NADH deshidrogenasa	56
5.2.3.	NADH citocromo c reductasa.....	56
5.2.4.	Succinatooxidasa.	57
5.2.5.	Succinatodeshidrogenasa.	58
5.2.6.	Succinato citocromo c reductasa.....	59
5.2.7.	Citocromo c oxidasa.....	60
5.2.8.	Actividad ATPasa con mitocondria integra.	62
5.2.9.	Actividad ATPasa con mitocondria fragmentada	63
6.	CONCLUSIONES.....	67
7.	RECOMENDACIONES.....	68
8.	DIVULGACIÓN DE RESULTADOS.....	69
	BIBLIOGRAFÍA.....	70

Lista de tablas

<i>Tabla 1. Caracterización química del aceite esencial de Eucalyptus citriodora extraído de las hojas de la planta.⁶</i>	20
Tabla 2 <i>Fármacos que modulan funciones mitocondriales.</i>	42
Tabla 3 <i>Fármacos inhibidores de los complejos de la cadena transportadores de electrones y patologías que presentan alteraciones de éstos</i>	44

Lista de figuras

Figura 1. Micrografía de mitocondrias de hígado de rata aisladas en medio con sacarosa 0.25mM ²⁷	23
Figura 2 Papel de la mitocondria en la transmisión de las señales apoptóticas ⁴³ .	27
Figura 3 Principales especies reactivas de oxígeno producidas en la mitocondria. ⁵⁴	31
Figura 4 . El bombeo de protones (H ⁺) a través de la cadena de transporte de electrones. ²⁵	33
Figura 5 Estructura de los principales desacopladores de la fosforilación oxidativa. a) 2,4- dinitrofenol (DNP) b) carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) c) carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP) ^{64,65}	36
Figura 6 Estructura de la rotenona ⁷²	38
Figura 7 Estructura de Antimicina A ⁶¹	40
Figura 8 Estructura de Oligomicina ⁸¹	42
Figura 9 Esquema de reacción del NADH. Tomado de Singer, 1974.	46
Figura 10 Esquema de reacción NADH deshidrogenasa. Tomado de Singer 1974	47
Figura 11 Efecto del aceite esencial de <i>Eucalyptus citriodora</i> sobre la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP (0.6mM) (estado 3) con Glutamato-Malato (5mM-2,5mM) respectivamente y Succinato (3mM), 100% de actividad corresponde a 41,25 ±6,13, y 32±7,28 nmol de O ₂ consumido por min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína respectivamente * significativamente (p≤0.05).	52
Figura 12 Efecto del aceite esencial de <i>Eucalyptus citriodora</i> sobre la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP (0.6mM) (estado 4) con Glutamato-Malato (5mM-2,5mM) respectivamente y Succinato (3mM), 100% de actividad corresponde a 30,56 ±9,15 y 21,83 ± 10,35 nmol de O ₂ consumido por min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína respectivamente * significativamente (p≤0.05).	52

Figura 13 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre el coeficiente de control respiratorio (CCR) con Glutamato-Malato y succinato- Rotenona, 54

Figura 14 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre NADH Oxidasa, Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), El 100% corresponde a $24,601 \pm 13,72$ nmol de O_2 consumido/min .mg de proteína 55

Figura 15 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre NADH Deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), el 100% corresponde a $0,78 \pm 0,16$ nmol de ferrocianuro reducido min⁻¹.mg⁻¹ de proteína 56

Figura 16 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre NADH Citocromo c Reductasa, Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), y el 100% corresponde a $0,13 \pm 0,048$ pmol de citocromo c reducido por min.mg proteína..... 57

Figura 17 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre Succinato oxidasa, Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), y el 100% corresponde a $11,217 \pm 3,49$ nmol de O_2 consumido/min .mg de proteína 58

Figura 18 Efecto del aceite esencia de *Eucalyptus citriodora* sobre Succinato Deshidrogenasa, cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), y el 100% corresponde a $0,216 \pm 0,06$ pmol de DCIP reducido por min/mg de proteína. 59

Figura 19 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre Succinato Citocromo c Reductasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * significativamente diferente del control ($p \leq$

0,05), el 100% corresponde a $0,112 \pm 0,022$ pmol de citocromo c reducido por min . mg de proteína mitocondrial. 60

Figura 20 Efecto del aceite esencial *Eucalyptus citriodora* sobre Citocromo c Oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), el 100% corresponde a $0,061 \pm 0,014$ pmol de citocromo c oxidado por min mg de proteína 61

Figura 21 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre la actividad ATPasa en mitocondrias integras. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), ATPasa mitocondria integra 100% de actividad corresponde a $8,01 \pm 0,83 \mu\text{mol}$ de Pi hidrolizado 62

Figura 22 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* 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 $7,91 \pm 0,63 \mu\text{mol}$ de Pi hidrolizado. 63

RESUMEN

TITULO:
ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus citriodora* SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL

AUTOR: Luis Carlos Vesga Gamboa *

PALABRAS CLAVE: fosforilación oxidativa, Eucalyptus, Actividad enzimática, estrés oxidativo

RESUMEN

La planta *Eucalyptuscitriodora Hook* es una planta utilizada para el tratamiento “casero” de enfermedades como gripes y resfriados, despertando así un gran interés científico para su uso como posterior fármaco gracias a sus diversas actividades biológicas registradas. Del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora Hook* se ha reportado en la literatura que posee actividad antimicrobiana, pesticida, analgésica, antiinflamatoria, antioxidante, entre otras, por lo que nace la necesidad de estudiar el mecanismo de acción del aceite esencial de esta planta en la mitocondria para contribuir al conocimiento de su actividad farmacológica a nivel celular, y contribuir así a tratamientos alternativos. Por esto el principal objetivo de este trabajo es estudiar el mecanismo de acción del aceite esencial de esta planta sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Para el aislamiento de las mitocondrias de hígado de rata se usaron ratas wistar macho únicamente con un peso entre 200-250 gramos con 12 horas de ayuno, siguiendo el método descrito por Voss (Dinor O. Voss, 1961), utilizándose medio de aislamiento compuesto por D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7.2, EGTA 1 mmol.L⁻¹ y BSA 0.1 g%. Los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial fueron evaluados acompañando el consumo de oxígeno. El aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora Hook* fue adicionado en diferentes concentraciones e incubados durante dos minutos con la proteína mitocondrial antes de inducir la respiración mitocondrial.

Los resultados obtenidos sugieren que el aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora Hook* presenta una actividad desacopladora de la fosforilación oxidativa, haciendo que el transporte de electrones a través de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria sea más rápido, lo cual es traducido en una protección para la mitocondria de la formación de posibles radicales libres además los resultados en mitocondria fragmentada sugieren un aumento en la actividad enzimática de la enzima citocromo c oxidasa.

* Trabajo de grado

**Facultad de ciencias: Escuela de química Directora: PhD Stelia Carolina Méndez Sánchez

ABSTRACT

TITLE:

STUDY OF THE MECHANISM OF ACTION OF ESSENTIAL OIL *Eucalyptus citriodora* ON MITOCHONDRIAL ENERGY METABOLISM

AUTHOR:

Luis Carlos Vesga Gamboa

KEYWORDS:

oxidative phosphorylation, *Eucalyptus*, enzymatic activity, oxidative stress

ABSTRACT

Eucalyptus citriodora Hook plant is a plant used to treat " home " of diseases like colds and flu , thus arousing great scientific interest for use as drug later thanks to its diverse biological activities registered . Given the health sector interest in obtaining new molecules for the treatment of various diseases comes to natural products as sources of active ingredients with potential pharmacological activity.

Essential oil of *Eucalyptus citriodora* Hook has been reported in the literature that has antimicrobial activity , pesticide, analgesic , anti-inflammatory , antioxidant, among others , so comes the need to study the mechanism of action of the essential oil of this plant in the mitochondria to contribute to knowledge of their pharmacological activity at the cellular level , thus contributing to alternative treatments. Therefore the main objective of this work is to study the mechanism of action of the essential oil of this plant on mitochondrial oxidative phosphorylation .

For isolation of mitochondria from rat liver were used only male Wistar rats weighing between 200-250 grams with 12 hours fasting , following the method described by Voss, using insulation means consisting of D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7.2, EGTA 1 mmol.L⁻¹ y BSA 0.1 g%. The complexes of the mitochondrial respiratory chain were evaluated accompanying oxygen consumption . 1mg protein was used supplemented with mitochondrial succinate or sodium glutamate , ADP and Pi . The essential oil of *Eucalyptus citriodora* Hook was added in different concentrations and incubated for two minutes with the mitochondrial protein before inducing mitochondrial respiration .

The results suggest that the essential oil of *Eucalyptus citriodora* Hook presents an uncoupling activity of oxidative phosphorylation , causing the electron transport through the enzyme complexes of the respiratory chain is faster , which is translated into a protection for the mitochondria possible free radical formation also results in fragmented mitochondria suggest an increase in the enzymatic activity of the cytochrome c oxidase enzyme.

* Grade work

** Science faculty:Chemistryschool Directora: PhD Stelia Carolina Méndez Sánchez

INTRODUCCIÓN

La familia Myrtaceae representa una fuente importante de aceites esenciales con diversas actividades biológicas, incluyendo efectos fungistáticos, bacteriostáticos (Motamayel, Hassanpour, & Alikhani, 2013), antiinflamatorias, antioxidantes, entre otras. Varias especies de Myrtaceae poseen un fuerte potencial antimicrobiano y sus aceites volátiles se utilizan como agentes antimicrobianos y antifúngicos en cremas, jabones y cremas dentales. (S. Luqman, G.R. Dwivedi, M.P. Darokar, A.Kalra, 2008)

Dentro de esta familia encontramos la *Eucalyptus citriodora* o popularmente conocida como "Eucalipto Limón" (Bakkali, Averbek, Averbek, & Idaomar, 2008). Esta planta es popularmente usada para el tratamiento de gripes o resfriados y estudios científicos han señalado varios usos farmacológicos del aceite esencial de esta planta, lo cual ha despertado el interés como posible fármaco. Entre sus actividades biológicas se ha reportado actividad antibacteriana (Motamayel et al., 2013), anti fúngica, antiséptica, antiespasmódica (Silva et al., 2003), antivirales, actividad antioxidante (Singh et al., 2012), entre otras (Batish, Singh, Kohli, & Kaur, 2008), las cuales le son atribuidas a sus metabolitos mayoritarios (Victoria et al., 2012).

No obstante las investigaciones para conocer las propiedades farmacológicas de esta planta, aún se desconoce el mecanismo de acción del aceite esencial sobre la mitocondria. Donde la mitocondria sin duda es el común denominador de muchos de los estudios que albergan procesos de muerte celular tanto apoptótica como necrótica, la cual la postula como diana de gran importancia para el estudio de fármacos que regulan las funciones mitocondriales y que podrían permitir un mejor abordaje a enfermedades degenerativas tales como el Parkinson, Alzheimer, la esclerosis entre otras (Green & Reed, 1998).

Con este trabajo se contribuye con el conocimiento del mecanismo de acción del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre el metabolismo energético mitocondrial, específicamente su actividad sobre la cadena respiratoria, su actividad desacopladora, la actividad de las enzimas mitocondriales y la producción de ATP. Estos experimentos fueron realizados *in vitro*, en mitocondrias aisladas de hígado de rata usando técnicas espectrofotométricas para la evaluación de la actividad de cada una de las enzimas de la cadena respiratoria y técnicas de oximetría para evaluar el efecto del aceite sobre la respiración mitocondrial.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Todas las áreas de la investigación están encaminadas al mejoramiento de la calidad de vida del ser humano, pero quizás la más importante es el sector salud. Es por esto el afán de conseguir y sintetizar nuevos productos con actividad farmacológica para el tratamiento y la prevención de enfermedades. Siendo este sector unos de los sectores más rentables e influyentes de la sociedad.

Son muchos los estudios realizados sobre la *Eucalyptus citriodora* y sus metabolitos que han permitido establecer una gran variedad de actividades biológicas presentes en esta, tales como actividad pesticida, anti-oxidante, anti-inflamatoria, anti-microbiana, repelente entre otras (Batish et al., 2008; Batish, Singh, Setia, Kaur, & Kohli, 2006; Nerio, Olivero-Verbel, & Stashenko, 2010; Silva et al., 2003; Singh et al., 2012). No obstante aún no existe ningún reporte previo de investigación, sobre el mecanismo de acción del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* que permita establecer su actividad farmacológica a nivel celular y así contribuir al desarrollo o mejoramiento de nuevos tratamientos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. (F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, 2008)

2. OBJETIVOS

2.1.1. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Contribuir al conocimiento del posible mecanismo de acción del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora*, sobre el metabolismo energético mitocondrial.

2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar los efectos del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre los siguientes parámetros mitocondriales, utilizando glutamato y succinato como sustratos oxidables:
 - Consumo de oxígeno en la presencia de ADP (estado III);
 - Consumo de oxígeno después del consumo de ADP (estado IV);
 - Coeficiente de control respiratorio (CCR);
 - Relación (ADP/O)
- ✓ Determinar el efecto en la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria producido por el aceite esencial de *EucalyptusCitriodora* sobre las siguientes:
 - NADH oxidasa
 - NADH deshidrogenasa
 - NADH citocromo c reductasa
 - Succinato oxidasa
 - Succinato deshidrogenasa
 - Succinato citocromo c reductasa
 - Citocromo c oxidasa
 - ATPasa.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Eucalyptuscitriodora (Hook)

El *Eucalyptuscitriodora* o comúnmente conocido como eucalipto limón pertenece a la familia Myrtaceae, las mirtáceas son una especie de árboles ricos en aceites esenciales, incluyendo cerca de unos 130 géneros y alrededor de 2900 especies en regiones tropicales y subtropicales.(Nakamura, Monteiro, Bizarri, Siani, & Ramos, 2010)

El género *Eucalyptus* tiene cerca de 700 especies, la mayoría oriunda de Australia. Ahora crece en casi todas las áreas tropicales y subtropicales, el Eucalipto se utiliza para tratar enfermedades humanas y algunas del ganado, extractos de Eucalipto, aceite y hojas frescas se utilizan en tratamiento por inhalación del vapor, se consume en infusiones, o se utiliza en baños.(Maria, Farias, & Souza, 2006)

La eficacia de los aceites depende de su composición química, en general los aceites de Eucalipto tienen propiedades antimicrobianas, anti fúngicas y anti repelente. Pero quizás la aplicación más importante para los productores de ganado es su actividad contra la mastitis y su tratamiento preventivo contra la endometritis, siendo estas hierbas usadas en el gel de uso tópico para el tratamiento de dicha enfermedad.(Hase, Digraskar, Ravikanth, Dandale, & Maini, 2013)

3.1.1. Etnofarmacología

La evidencia farmacológica y medicinal de esta planta se basa en el uso que se le ha dado en la medicina tradicional a lo largo del mundo, una gran cantidad de estudios muestran las propiedades farmacológicas tanto del aceite como de las hojas(Belay, Tariku, Kebede, & Hymete, 2011), el aceite esencial que se

encuentra en las hojas es un poderoso antiséptico, alivia la tos y los resfriados, posee actividades, antitripanosomal, anti fúngicas, antioxidantes(Singh et al., 2012) y antimicrobianas contra cepas de *Staphylococcus aureus*(Zore, Thakre, Jadhav, & Karuppayil, 2011), *E.coli* y *Salmonella choleraesuis* y presenta actividad larvicida sobre *Lutzomyia longipalpis*, atribuyéndose principalmente el efecto a el monoterpeno citronelal(Nerio et al., 2010).

3.1.2. Composición química

Los aceites esenciales son productos naturales constituidos principalmente por terpenos, en su mayoría monoterpenos y sesquiterpenos. Los terpenos son productos naturales y materias primas sostenibles para la industria de la química fina, son obtenidos de aceites esenciales y usados en saborizantes, fragancias y fármacos. En los últimos años los constituyentes mayoritarios han sido objeto de investigación debido a diferentes usos en la medicina tradicional, también han sido reportados diversos constituyentes mayoritarios de aceites esenciales con actividades biológicas específicas, por ejemplo, el eugenol constituyente mayoritario del clavo de olor ha presentado actividad antiinflamatoria al ser modificado químicamente.(Batish et al., 2006)

En función del biotipo (días de sol, clima, composición del suelo, altitud, etc.), una misma planta puede secretar esencias muy diferentes desde el punto de vista bioquímico. De estas variaciones de los aceites esenciales surge la noción de quimiotipo. Dos quimiotipos del mismo aceite esencial presentan no solamente propiedades terapéuticas diferentes sino también índices de toxicidad variables.(Stashenko, Jaramillo, & Martínez, 2004)

El aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* Hook está compuesto principalmente de citronellol (aproximadamente el 58%), conocido por sus propiedades aromáticas, entre otros compuestos donde se encuentran citronellal, limoneno, linalool, entre otros. El aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* cultivado en la India mostró la siguiente composición.(Singh et al., 2012)

Tabla 1. Caracterización química del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* extraído de las hojas de la planta. (Singh et al., 2012)

COMPONENTE	PORCENTAJE
α -Thujene	0.04
α -Pinene	0.86
Sabinene	0.19
β -Pinene	0.87
β -Myrcene	0.23
α -Phellandrene	0.28
α -Terpinene	0.04
p-Cymene	0.55
Limonene	0.47
trans- β -Ocimene	0.05
cis- β -Ocimene	0.08
γ -Terpinene	0.26
p-Mentha-3,8-diene	0.26
1,8-Cineole	1.86
Linalool	0.03
Citronellal	60.66

Isopulegol	8.19
Isoisopulegol	0.58
β -Citronellol	12.58
Geraniol	0.16
Citral	0.07
Citronellylacetate	2.38
β -Caryophyllene	2.91
2,6-Dimethyl-5-heptena	0.26

Otro ejemplo delquimitipo muestra la composición del aceite esencial y la actividad insecticida contra la *L. longipalpis* causante de la leishmaniosis, utilizando diferentes concentraciones en mg/ml de aceites esenciales de ***EucalyptusCitriodora***,*E.staigeriana*, y *E.globulus*. Donde el componente mayoritario para *E.staigeriana* es limoneno (28,82%), Z-citral (10,77%) y E-citral (14,16%). La *E.citriodora* contenía β -citronellal (71,77%) y la *E.globulus* 1,8 cineole(83,89%), todos estos aceites de eucaliptos estudiados fueron efectivos tanto en la fase de huevo, larva y adulto de *L. longipalpis*. El aceite de *E.staigeriana* tuvo mayor efecto en la fase de insecto que *E.citriodora* y *E.globulus* respectivamente, mientras que en la etapa de larva la *E. globulus* presenta mayor inhibición que los otros dos aceites estudiados, dando como resultado que los aceites esenciales de eucaliptos muestran cada uno una buena actividad para el control del vector de la leishmaniosis(Nerio et al., 2010).

3.1.3. Toxicidad

El eucalipto tiene altos niveles de compuestos fenólicos y terpenoides que pueden ser tóxicos, animales tales como el koala que se alimentan de Eucalipto han desarrollado métodos para desintoxicación de los compuestos en el hígado. Habilidad que no poseen la mayoría de los animales.(Mishra & Dubey, 1994)

Varias reacciones adversas se han atribuido al uso o contacto con aceites de eucalipto, extractos, material fresco y procesado. Algunos de los compuestos específicos que pueden ser tóxicos o causar reacciones adversas incluyen a 1,8-cineol, glucósidos cianogénicos y taninos.(Jaafari et al., 2012) La mayoría de los estudios sobre las reacciones adversas se han realizado en ratas de laboratorio, y en algunos casos los estudios se centran en reacciones adversas sobre los humanos.(Singh, Batish, Kaur, Kohli, & Arora, 2006)

3.2. La Mitocondria

Las mitocondrias son organelas intracelulares situadas en el citoplasma de las células eucariotas, el número de mitocondrias por célula varía según el tipo celular(Emelyanov, 2003). Sea cual sea su forma, la mitocondria presenta una estructura estándar: tiene dos membranas que determinan dos cavidades. La membrana mitocondrial externa separa el espacio intermembranoso del citosol(Desler & Rasmussen, 2013), y la membrana mitocondrial interna separa la matriz mitocondrial del espacio intermembranoso.(Scatena, Bottoni, Botta, Martorana, & Giardina, 2007; Weissig, Cheng, & D'Souza, 2004).

La membrana interna delimita una cavidad central, llamada matriz mitocondrial, que contiene las enzimas del ciclo de Krebs y de la β -oxidación de los ácidos grasos y el genoma mitocondrial. La membrana interna se distingue por tener numerosos repliegues o crestas mitocondriales, que aumentan de manera considerable su superficie. Además, posee una proporción importante de cardiolípidos (20% de los lípidos totales de esta membrana) los cuales le confieren una impermeabilidad importante frente a los iones, de manera que todos los intercambios se realizan mediante transportadores específicos para los

metabolitos. Esta membrana es el punto donde tiene lugar la fosforilación oxidativa, ya que contiene los cuatro complejos de la cadena de transporte de electrones (e-) y la ATP sintasa (Berdanier, 2005).

Aunque esté rodeada de una doble barrera, la mitocondria mantiene relaciones funcionales con otros componentes celulares como el citoplasma, el retículo endoplasmático, el citoesqueleto o el núcleo.

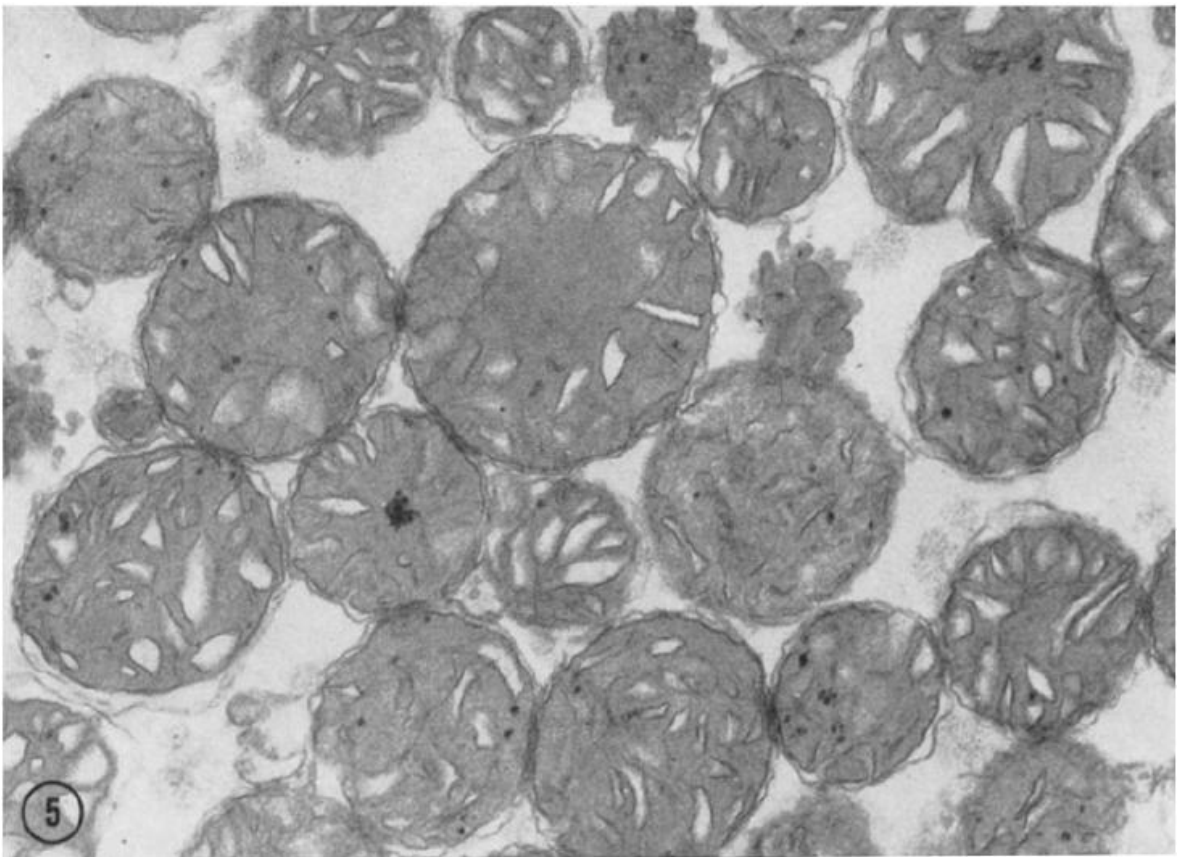


Figura 1. Micrografía de mitocondrias de hígado de rata aisladas en medio con sacarosa 0.25mM (Vasington & Greenawalt, 1968)

La mitocondria juega un papel importante en el metabolismo celular al mantener los niveles de ATP dando la energía necesaria para el funcionamiento de la célula, y regula los niveles de mensajeros secundarios como Ca^{2+} (Szewczyk et al.,

2010)y especies reactivas de oxígeno. Pero también se destaca por su participación en los procesos de inducción de muerte celular la cual está relacionada con el aumento de la permeabilidad de sus membranas(Sims & Muyderman, 2010; Zorov et al., 2009).

3.2.1. Muerte celular

Una forma de muerte celular es la Apoptosis. La apoptosis está asociada con una completa permeabilización de la membrana mitocondrial externa que conduce a la liberación de proteínas intermembrana al citosol. Estas proteínas incluyen activadores de caspasas que son efectores de muerte celular, como ejemplo de estas proteínas están el citocromo C y la Smac/DIABLO. Las mitocondrias también se someten a una permeabilización parcial y transitoria de la membrana mitocondrial interna lo que resulta en la pérdida de la función respiratoria. La permeabilización de la membrana mitocondrial es inducida por diferentes moléculas pro-apoptóticas incluyendo Ca^{2+} , especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, ácidos grasos, proteínas pro-apoptóticas de la familia de las Bcl-2 y xenobióticos diferentes(Bianchi, Rimessi, Prandini, Szabadkai, & Rizzuto, 2004; Boya et al., 2003; Desagher & Martinou, 2000; Indran, Tufo, Pervaiz, & Brenner, 2011; Krieger & Duchon, 2002).

La familia de las proteínas Bcl-2 posee miembros con características proapoptóticas y antiapoptóticas las cuales pueden atenuar los efectos causados por los inductores de apoptosis manteniendo la célula viva. Por otro lado, la activación de los miembros proapoptóticos (por ejemplo Bax y Bak), que normalmente están en su forma inactiva, lleva al desequilibrio de la relación entre los miembros de la familia Bcl2, haciendo que el proceso de apoptosis sea desencadenado. Una vez activa la proteína Bax, se dirige a la mitocondria donde se oligomeriza llevando a la formación de canales proteicos en la membrana mitocondrial externa, lo que promueve la liberación de factores inductores de

apoptosis y al aumento de la concentración citosólica de calcio. El papel de Bak en este proceso parece ser el de inducir la oligomerización de Bax en la membrana. Bak y Bax son importantes constituyentes del denominado MAC, canales mitocondriales inductores de apoptosis. De esta forma, semejante a la formación del PTPM, la inducción de permeabilidad mitocondrial por proteínas de la familia Bcl-2 lleva a la inhibición de la respiración mitocondrial y al colapso del potencial de membrana. Una vez que las alteraciones en la respiración mitocondrial se presentan en los dos procesos que promueven el aumento de la permeabilidad de las membranas mitocondriales y considerando que tales alteraciones pueden resultar en el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno que están íntimamente relacionadas a procesos de daños celulares(Boya et al., 2003).

La apoptosis se caracteriza por la contracción de la célula manteniendo la integridad de los orgánulos, la condensación y fragmentación del ADN seguido de una eliminación de fagocitos, funciona como un "suicidio" programado y causa daño mínimo a los tejidos circundantes. La apoptosis se ha subdividido en dos tipos de vías de muerte celular, es decir, la vía extrínseca y la vía intrínseca, mediada por la mitocondria. La vía extrínseca o mediada por receptores requiere un compromiso eficaz entre el receptor de muerte que se encuentra en la superficie de las membranas celulares y sus respectivos ligandos, esta vía implica el factor de necrosis tumoral (TNF), CD95(FAS). Estos receptores tienen un dominio extracelular y un dominio citoplasmático o intracelular, estos se encargan de transmitir la señal de la muerte de la superficie hacia las vías de dominio intracelular(Desagher & Martinou, 2000). La activación de CD95 o del factor de necrosis tumoral a menudo conduce a la agrupación y a la captación de los receptores en un complejo de señalización que induce a la muerte (DISC) que activan caspasas iniciadoras como la procaspasa 8(Su et al., 2006). La caspasa 8 activa la fase de la ejecución de la apoptosis a través de la activación de la caspasa 3(Aranha et al., 2002). Las caspasas activadas pueden también producir daño mitocondrial y reforzar la señal de la muerte facilitando la salida de

amplificadores de las proteínas mitocondriales del espacio intermembrana(Desagher & Martinou, 2000)(Ballot et al., 2010). Aunque las especies reactivas de oxígeno (EROs)(Liu, Fiskum, & Schubert, 2002) no actúan directamente sobre los receptores de muerte pueden contribuir mediante la vía extrínseca de la muerte celular por la alteración del medio extracelular dando un ambiente propicio para la participación efectiva entre los ligandos y los receptores o la ejecución de eventos posteriores que conducen a la apoptosis (Boveris & Chance, 1973; Sims & Muyderman, 2010). La vía intrínseca de la muerte celular es susceptible a EROs se ha demostrado que una adición de peróxido de hidrógeno tiene un efecto inhibitorio sobre el antiporter sodio-hidrógeno[Na⁺/H⁺] dando como resultado una acidificación creando un ambiente propicio para la apoptosis(Gechev, Petrov, & Minkov, n.d.).

Por otro lado la vía intrínseca o mitocondrial puede ser activada por una gran variedad de receptores y estímulos tales como la radiación, radicales libres e infecciones virales(Boya et al., 2003). Inicialmente se demostró que estos desencadenan cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna debido a la apertura de un poro de permeabilización mitocondrial. Las principales consecuencias de este cambio en la permeabilidad son la pérdida de potencial de membrana, liberación de proteínas pro-apoptóticas y la detención de la función bioenergética de la mitocondria. Al liberarse las proteínas estas se pueden clasificar en dos clases. La primera categoría se compone de las proteínas que activan la vía dependiente de las caspasas, este grupo incluye proteínas como el citocromo C y Smac/DIABLO. Que conducen a la activación de la caspasa 9 formando el apoptosoma y activando las caspasas 3 y 7 dando como resultado el desmantelamiento de la célula a través de la fragmentación nuclear. La Smac/DIABLO se une a las proteínas inhibitoras de apoptosis inhibiéndolas evitando así que estas detengan el proceso de apoptosis(Gechev et al., n.d.)(Su et al., 2006).

El segundo grupo incluye otras proteínas pro-apoptóticas como el factor de inducción de la apoptosis y la endonucleasa G, el desplazamiento del factor de inducción de apoptosis (AIF) al núcleo promueve la fragmentación del ADN. Tanto la AIF como la Endo G actúan de forma independiente en la muerte celular(Gechev et al., n.d.)(Reed, Jurgensmeier, & Matsuyama, 1998).

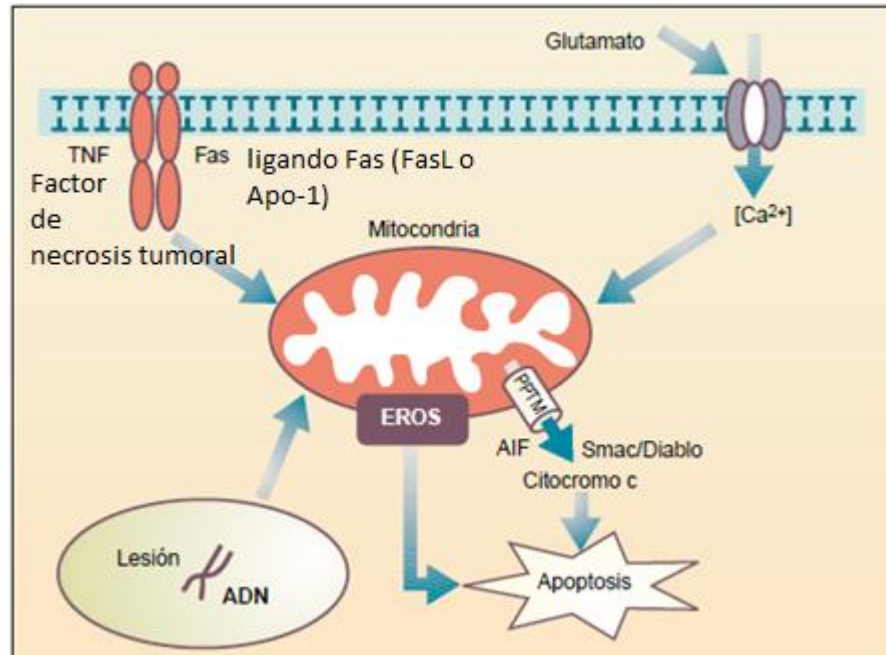


Figura 2 Papel de la mitocondria en la transmisión de las señales apoptóticas(Tornero, 2012)

El otro tipo de muerte celular es la NECROSIS esta es la muerte de un conjunto de células provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede curar o reparar, se puede denominar como la muerte celular caracterizada por una ruptura de membranas plasmáticas, dilatación de organelos citoplasmáticos, así como una moderada condensación de la cromatina. La característica fundamental que distingue la mayoría de las formas de necrosis de la apoptosis es la rápida pérdida de los potenciales de membrana la cual puede ser consecuencia de daño en lípidos de membrana y la función de las bombas iónicas. La disminución de la función de las bombas ATP dependientes pueden llevar a cabo a la apertura de los canales de muerte en membrana citoplasmática,

la apertura de estos canales resulta en la entrada de cationes que llevan al hinchamiento celular y posterior ruptura de membrana(Reed et al., 1998). El estrés resultante de la escasez de alimento o de un aporte de O₂ insuficiente a menudo resulta en la disminución de ATP, este tipo de necrosis se puede ver en la región interna de tumores, donde el suministro de oxígeno y nutrientes es limitado(Jordán, Ceña, & Prehn, 2003).

Otro factor a tener en cuenta es la capacidad de la mitocondria de regular las concentraciones de calcio, el calcio intracelular es importante en numerosas respuestas celulares. En ciertas condiciones ligandos extracelulares pueden inducir necrosis dependientes de Ca²⁺, como por ejemplo las membranas intracelulares son casi impermeables al calcio, la mayor parte del calcio se almacena en el retículo endoplasmático, cuando este es liberado al citosol, atraviesa la membrana plasmática y puede iniciar muerte celular por la activación de proteasas dependientes de calcio o sobrecarga del calcio mitocondrial(Celsi et al., 2009). Esto lleva a cabo una auto amplificación del calcio citosólico y su prolongada estadía en el citosol lleva a la sobrecarga mitocondrial del calcio, lo que consecuentemente induce a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) haciendo que la mitocondria pierda su capacidad de producción de ATP por la cadena respiratoria, además de la activación de proteasas dependientes de calcio, el aumento en la concentración de calcio puede iniciar el proceso de apoptosis o necrosis(Kroemer, Galluzzi, & Brenner, 2007)(Arti, Ankur, Seema, Amarjeet, & Ashok, 2012). Igualmente las células en un ambiente aeróbico generan constantemente especies reactivas de oxígeno(EROs), su excesiva producción lleva al estrés oxidativo, daño intracelular de moléculas y membranas y finalmente necrosis. La mitocondria es la fuente principal de EROs que puede originar necrosis donde el exceso mitocondrial de EROs puede dañar el ADN causando el quiebre en la hebras de ADN, estos también modifican lípidos, los dobles enlaces de los ácidos poli-insaturados, donde la oxidación de lípidos puede llevar a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y de las organelas intracelulares, como lisosomas y retículo

endoplasmático con la consiguiente liberación de proteasas o un influjo de calcio que puede resultar en necrosis(Boya et al., 2003).

3.2.2. Transporte de calcio en la mitocondria.

La mitocondria no solamente está relacionada con el metabolismo energético sino también con la señalización del calcio intracelular, esta organela puede captar e inducir la liberación del ion en el citosol. Este flujo es realizado por un uniportador que permite la acumulación de calcio en la matriz mitocondrial. El uniporter puede ser inhibido competitivamente por otros cationes divalentes (Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+}), que también son transportados por esta vía, y por poliaminas específicas, particularmente la espermina, que promueve la acumulación de calcio cuando el ion está presente en bajas concentraciones(Rasola & Bernardi, 2011).

El influjo de calcio es realizado por dos transportadores catiónicos, el independiente de sodio ($\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$) y el dependiente de sodio ($\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$). El transportador $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ predomina en mitocondrias de hígado, riñones y músculos lisos, siendo la energía del flujo proviene de la fuerza protón motriz. Ya el transportador $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$, predominante en mitocondrias de corazón, musculo esquelético y cerebro entre otros tejidos, puede ser inhibido por Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} externo, benzodiazepinas y activado por Na^+ , espermina y espermidina. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) también ha sido considerado como una vía de flujo regulada por los cambios en las concentraciones de calcio en la matriz mitocondrial(Jeyaraju, Cisbani, & Pellegrini, 2009).

3.2.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como “una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas del oxígeno como una disminución en los sistemas de defensa”.

Hay varios tipos de especies reactivas: especies reactivas de oxígeno (EROS), especies reactivas de cloro (RCS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Estas especies reactivas son productos normales del metabolismo celular y son necesarias, a bajas concentraciones, para mantener el estado redox celular, la función celular y la señalización intracelular. (Group, 2009) Por ejemplo, intervienen en la defensa del organismo frente a agentes infecciosos. El estrés oxidativo aparece cuando existe una sobreproducción de EROS/RCS/RNS no compensado por los sistemas anti-oxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos. El exceso de radicales libres daña la estructura y función de componentes celulares como los lípidos, proteínas o el ADN. Debido a esto, el estrés oxidativo está implicado en la etiología de varias enfermedades humanas y en procesos de envejecimiento. (Hirst, King, & Pryde, 2008)

Los radicales libres derivados del oxígeno constituyen el tipo más importante de radicales libres formados por los organismos. El anión superóxido (O_2^-) se considera como el principal EROS y puede interaccionar con otras moléculas para generar EROS “secundarios” (Modi & Katyare, 2009). Se genera en la mitocondria por una fuga prematura de electrones hacia el oxígeno durante la transducción de energía. Del 1-3% de todos los electrones de la cadena de transporte “se fugan” en los complejos respiratorios I y III para generar superóxido en lugar de reducir completamente el oxígeno a agua. El radical hidroxilo (OH^-) posee una gran reactividad y una vida media “in vivo” muy corta. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es otra especie reactiva de oxígeno importante (Boveris & Chance, 1973).

Los peroxisomas producen únicamente H_2O_2 , pero no superóxido, en condiciones fisiológicas normales. Los peroxisomas constituyen un lugar

muy importante de consumo de oxígeno en las células y este elevado consumo les lleva a producir H_2O_2 con el que oxidan diferentes moléculas. Esta organela también contiene catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno y evita su acumulación muy tóxica. Por lo tanto, en el peroxisoma se mantiene un delicado equilibrio entre la producción de H_2O_2 y su descomposición. Cuando estas organelas sufren algún daño, el H_2O_2 sale al citosol contribuyendo en los fenómenos del estrés oxidativo (Galkin & Vinogradov, 1999).

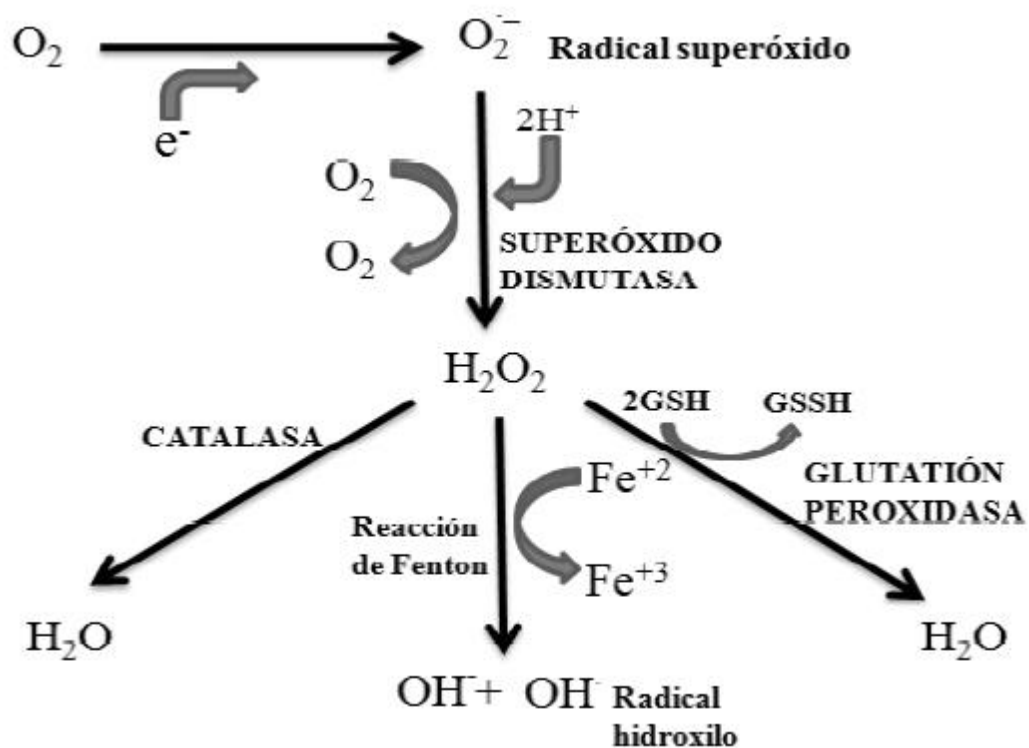


Figura 3 Principales especies reactivas de oxígeno producidas en la mitocondria. (Saavedra et al., 2010)

3.2.4. Fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa es el punto de culminación de todo el proceso metabólico donde hay producción de energía, tal como la degradación de ácidos grasos, aminoácidos y glúcidos los cuales llegan a este punto que es la etapa final de la

respiración celular. La energía de la oxidación da lugar a la síntesis de ATP, en los organismos eucariotas la fosforilación oxidativa es un proceso exclusivamente mitocondrial donde se produce la reducción de oxígeno a agua gracias a los electrones dados por el NADH y FADH₂ formados en la glicolisis, en la oxidación de ácidos grasos y en el ciclo de ácido cítrico. Estas son moléculas ricas en energía porque poseen un par de electrones con un elevado potencial de transferencia, los cuales son transferidos al oxígeno molecular liberando una gran cantidad de energía que impulsa la generación de ATP.(Lemieux, Semsroth, Antretter, Höfer, & Gnaiger, 2011)

En pocas palabras la fosforilación oxidativa es el proceso por el cual se forma ATP como resultado de la transferencia de electrones desde NADH o del FADH₂ al O₂ a través de una serie de transportadores de electrones(Puchowicz et al., 2004).

El flujo de estos electrones desde el NADH o el FADH₂ al O₂ a través de complejos proteicos localizados en la membrana interna de la mitocondria provoca el bombeo de protones hacia el exterior de la matriz mitocondrial.(Barbi de Moura et al., 2012; Lemieux et al., 2011)

La cadena respiratoria mitocondrial consta de una serie de transportes electrónicos. Existen entonces 4 transportadores de electrones, cada uno de ellos capaces de catalizar la transferencia electrónica a través de una porción de la cadena a través de centros de hierro-azufre. Los complejos I y II catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona (Q) a partir de dadores electrónicos diferentes.(Lenaz et al., 1995) Los electrones de alto potencial del NADH entran a la cadena respiratorio a nivel de la NADH-Q reductasa (complejo I), esta etapa inicial comprende la unión del NADH y transferencia de sus 2 electrones a la flavina que es el grupo prostético de este complejo. Luego que los electrones son transferidos al FMN finalmente se transfiere a la coenzima Q reduciéndose a ubiquinol. El flujo de 2 electrones desde el NADH al QH₂ a través de la NADH.Q reductasa provoca el bombeo de 4H⁺ hacia afuera de la membrana interna de la mitocondria. La ubiquinona también es el punto de llegada de los electrones desde

el FADH_2 que se forma en el ciclo de ácido cítrico por oxidación del succinato a fumarato por medio de la succinato deshidrogenasa, la cual es componente del complejo II (succinato-Q reductasa). Este complejo transfiere electrones desde el FADH_2 a Q no son bombas de protones, y la producción de ATP es menor debido a la cantidad de protones bombeada al espacio intermembrana. (Cocco, Cutecchia, Montedoro, & Lorusso, 2002; Vinogradov & Grivennikova, 2005)

Los electrones fluyen desde la ubiquinona al citocromo c a través de la citocromo c reductasa la cual es la segunda bomba de la cadena respiratoria, la función de la citocromo reductasa es catalizar la transferencia de los electrones al citocromo c, este flujo de electrones provoca el transporte de dos H^+ hacia el lado exterior. (Milakovic & Johnson, 2005)

Finalmente el último de los complejos que bombean protones la citocromo oxidasa, que es la que cataliza la transferencia de los electrones del citocromo c al O_2 para formar agua, en total son cedidos 4 electrones al oxígeno para generar 2 moléculas de agua (Lemieux et al., 2011). En la figura 3 se muestran los distintos complejos proteicos presentes en la cadena respiratoria. (Weissig et al., 2004)

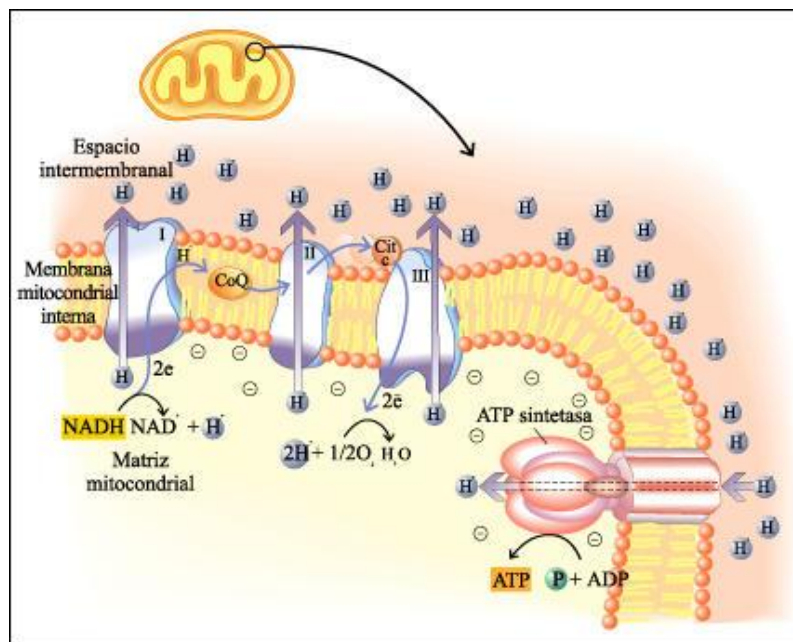


Figura 4 . El bombeo de protones (H^+) a través de la cadena de transporte de electrones, que acompaña a la transferencia de e^- en el complejo I, III y IV) crea una fuerza protón-motriz, suma de

las contribuciones de un potencial químico y un potencial eléctrico, que sirve como almacén de energía para la síntesis de ATP por acción de la ATPasa-complejo V ATP: adenosina-5'-trifosfato; ADP: adenosina-5'-difosfato; Cyt C: citocromo c; F0: subunidad F0 de la ATP-asa; F1: subunidad F1 de la ATP-asa; H⁺: protón; H₂O₂: agua; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido; O₂: oxígeno; Pi: fosfato inorgánico; Q: ubiquinona.(Weissig et al., 2004)

3.2.5. Respiración mitocondrial

La respiración mitocondrial es originada por la oxidación de sustratos a través de los diferentes complejos mitocondriales donde finalmente el oxígeno es reducido a una molécula de agua, el control de la respiración mitocondrial se lleva a cabo por el consumo de oxígeno a lo largo del tiempo.

Los parámetros clásicos para la descripción de la fosforilación oxidativa son: (a) la velocidad de consumo de O₂ en estado 3 o respiración activa, en presencia de exceso de sustrato, ADP y O₂, con velocidades máximas de consumo de O₂ y producción de ATP; (b) la velocidad de consumo de O₂ en estado 4 o respiración controlada, en presencia de exceso de sustrato y O₂, con velocidades bajas de consumo de O₂, donde las reacciones de transferencia de electrones son controladas por el potencial electroquímico del H⁺; y (c) el coeficiente de control respiratorio, que es el cociente entre el consumo de O₂ en estado 3/estado 4. Este valor adimensional, usualmente entre 3 y 8, indica claramente el papel del ADP en la regulación del consumo de O₂ mitocondrial y provee un índice sensible para medir el grado de acoplamiento y la integridad de la membranas interna de las mitocondrias aisladas; y (d) el índice P/O, o sea el número de fosfatos incorporados como ATP (fosforilación) por átomo (2 e-) de oxígeno consumido (oxidación).

El estado 4 se define como la respiración mitocondrial debida a la fuga o entrada pasiva de protones desde el citosol a la matriz mitocondrial. Los equivalentes de reducción (NADH y FADH₂) se oxidan en los complejos respiratorios I y II,

respectivamente y pueden ser generados por la adición de glutamato/malato (produce NADH) o succinato/malato (origina FADH₂). (Powell & Jackson, 2003)

El estado 3 de la respiración refleja simultáneamente la respiración mitocondrial en estado fosforilante en presencia de ADP y también la respiración del estado 4 ocasionada por la pérdida de energía (fuga de H⁺). Estos estados permiten calcular un parámetro relacionado con el grado de acoplamiento de la organela, el coeficiente de control respiratorio (CCR) representa la relación entre el estado 3 y el estado 4 de la respiración (estado3/estado4). Esta relación disminuye cuando aumenta el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Este parámetro permite evaluar la calidad de la preparación mitocondrial. (Lemieux et al., 2011)

Por otra parte, los desacopladores protonóforos permeabilizan la membrana mitocondrial interna a los protones desacoplando así la respiración (transporte de e⁻ y consumo de oxígeno) de la fosforilación. Por tanto, se disipa el potencial de membrana y los protones entran en la matriz mitocondrial directamente a través de la membrana sin producir ATP. En esta situación, hay inhibición de la síntesis de ATP asociada a un aumento importante del transporte de electrones y consumo de oxígeno con el fin de re-establecer el gradiente de protones y el potencial de membrana (estado desacoplado). (Romana Fato, Christina Bergamini, 2010)

La permeabilidad a los protones de la membrana mitocondrial interna puede aumentarse, de manera artificial, utilizando desacopladores protonóforos como 2,4-dinitrofenol (DNP) o el carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (CCCP). Estos agentes desacoplantes colapsan el potencial de membrana y activan la cadena respiratoria al máximo (To et al., 2010).

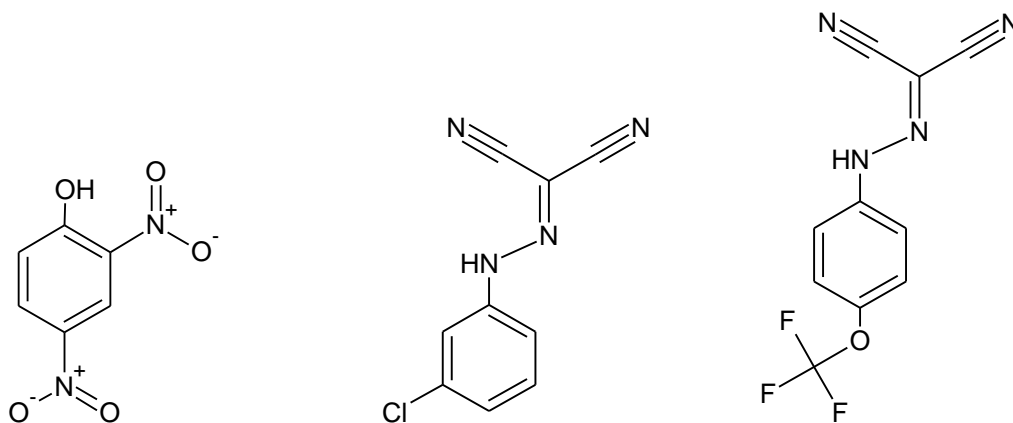


Figura 5 Estructura de los principales desacopladores de la fosforilación oxidativa. a) 2,4-dinitrofenol (DNP) b) carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) c) carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP)(Rousset et al., 2004; To et al., 2010)

Además de lo anterior la mitocondria contiene las enzimas del ciclo del ácido cítrico, las cuales están localizadas en su matriz, y desempeñan un papel crucial en la degradación de carbohidratos así como de ácidos grasos y aminoácidos. La oxidación de acetil CoA está acoplada a la reducción de NAD^+ y FAD a $\text{NADH}+\text{H}^+$ y FADH_2 respectivamente. En la mitocondria el metabolismo de azúcares y ácidos grasos se completa mediante su oxidación a CO_2 y H_2O liberándose moléculas de ATP. Todo esto hace de la mitocondria una organela de gran interés para evaluación de posibles fármacos y así poder inferir su posible mecanismo de acción a nivel celular.(Sims & Muyderman, 2010)

Permeabilidad de membrana a los protones (protonleak)

La fuerza protón motriz permite la síntesis de ATP generando un flujo de protones a través de la ATP sintasa, las membranas biológicas son más o menos permeables y una cierta cantidad de protones son susceptibles de escapar de la ATP sintasa y de volver a entrar en la matriz sin participar en la síntesis de ATP. Este proceso contribuye a la disipación de la energía almacenada en forma

de gradiente de protones, de manera que, a mayor fuga de protones, menor es la fosforilación oxidativa.

Patinaje de las bombas de protones (slipping)

El “slipping” es una pérdida de la eficacia de las bombas de protones, debida a un desacoplamiento parcial y variable de las reacciones químicas (transferencia de electrones o síntesis de ATP) y del transporte de protones. Azzone y sus colaboradores observaron que la citocromo c oxidasa podía cambiar de estequiometría a medida que la concentración de sustrato aumentaba glutamato-malato o succinato según el complejo estudiado. En presencia de una mayor cantidad de sustrato, el consumo de oxígeno se elevaba sin modificación de la fuerza protón-motriz. Esta disociación no estaba ligada a un aumento de “leak”, pero sí a la bajada de la relación de los H^+ expulsados sobre los electrones donados al oxígeno en el complejo IV (Azzone y cols., 1985). A este mecanismo de desacoplaje “intrínseco” le denominaron como “slipping”, por ser una bomba que patina en su acción. (Azzone, Zoratti, Petronilli, & Pietrobon, 1985)

3.2.6. Inhibidores de los complejos mitocondriales

Complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa). (Ventura, Genova, Bovina, Formiggini, & Lenaz, 2002) La rotenona, inhibidor del complejo I, aumenta la producción de EROS en presencia de una concentración elevada de NADH. (Batandier, Fontaine, Kériel, & Lerverve, 2002) (Cunha-Oliveira et al., 2013) La rotenona se une a una serie de aceptores y donantes de electrones, incluyendo una flavoproteína y varios (quizá siete) centros de hierro-azufre cuya relación exacta no está determinada. Cuatro protones son trasladados a través de la membrana para la reducción de cada molécula de ubiquinona a ubiquinol. Dentro de este hay una serie de complejos hierro-azufre que se cree que es el portador final que pasa electrones a la ubiquinona. Esta es la región en la que actúan la

mayor parte de los inhibidores potentes, incluyendo rotenona y una serie de nuevas acaricidas-insecticidas.(Van den Bogert, Holtrop, De Vries, & Kroon, 1985)(Glinka & Youdim, 1995)

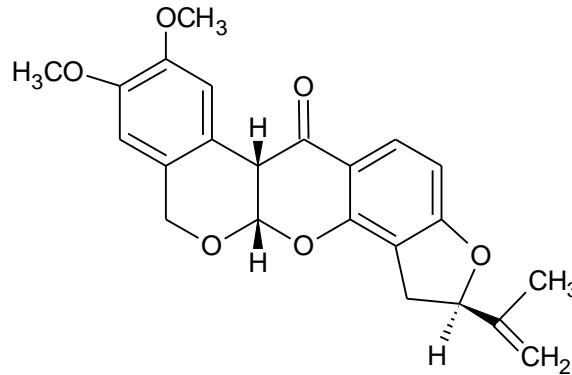


Figura 6 Estructura de la rotenona (Grivennikova & Vinogradov, 2006)

El complejo II (succinato: ubiquinona oxidorreductasa) En contraste con el complejo I, complejo II es relativamente simple que consiste en sólo cuatro subunidades polipeptídicas. Aunque aún, no hay una estructura de alta resolución de este complejo disponible, a pesar de su aparente simplicidad, características importantes de la estructura y el mecanismo de transferencia de electrones interno del complejo II aún no está establecido.

Dos de las cuatro subunidades se extienden dentro de la matriz, una de ellas lleva el sitio catalítico para la conversión de succinato a fumarato. Los dos electrones liberados en esta oxidación son recogidos por un cofactor FAD y transmiten a través de tres grupos de sulfuro de hierro en la segunda unidad. Juntas, estas dos unidades representan la enzima succinato deshidrogenasa. Los otros dos subunidades actúan como anclajes de membrana para la succinato deshidrogenasa. Ellos comparten un tipo de citocromo b de función desconocida. Dos sitios de unión de ubiquinona están presentes, uno cerca de la cara interior y la otra cerca de la cara externa de la membrana en una disposición que recuerda a la del complejo III, aunque en el caso del complejo II no hay protones son bombeados hacia el exterior como se produce en el ciclo de Q del complejo III. Complejo II es el foco de la acción de un grupo de fungicidas carboxamidas, y el

malonato el cual es un inhibidor competitivo de la succinato deshidrogenasa(Liu et al., 2002)

Complejo III (ubiquinol: citocromo c oxidorreductasa)

Complejo III (que es a menudo denominado citocromo c reductasa o el complejo bcl) consta de 11 subunidades peptídicas en los vertebrados. La comprensión de su estructura se ha avanzado notablemente alta resolución por cristalografía de rayos X. Sin embargo, algunos detalles del flujo de electrones a través del complejo y el mecanismo de bombeo de protones son todavía desconocidos. Gran parte del complejo sobresale dentro de la matriz. La cadena de transferencia de electrones desde ubiquinol implica, en secuencia, un complejo de hierro-azufre, citocromo b, y citocromo c. La reacción se completa por la transferencia de un electrón al citocromo c. Durante estas transferencias de electrones, cuatro protones son transferidos de la matriz al lado citoplasmático de la membrana interna.(Lagoa, Graziani, Lopez-Sanchez, Garcia-Martinez, & Gutierrez-Merino, 2011)

Dos centros de reacción de ubiquinona están presentes. Una Qi designado (o QN) que se encuentra hacia la matriz (interior, negativa), mientras que el otro (Qo o Qp) está situado cerca de la cara citoplásmica (exterior, positivo). Juntos se postulan para operar en el "ciclo Q" en el que se divide el par de electrones recibida de ubiquinol, uno que se pasa en el centro hierro-azufre y de allí a los citocromos C. El otro electrón pasa de nuevo a través de la ubiquinona al citocromo b. Un punto de importancia toxicológica es que durante las operaciones del ciclo Q, iones radicales ubisemiquinona (Q-) se crean como productos de reacción parciales. Por interacciones con oxígeno molecular, estos pueden actuar como una fuente para las especies reactivas de oxígeno (EROS) tales como superóxido, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno, y los radicales peroxinitrilo(Turrens, 1997) que pueden causar la peroxidación de lípidos y otras oxidaciones celulares perjudiciales. La mayoría de los inhibidores interactúan ya

sea con el sitio Qo (por ejemplo, myxothiazol) o en el sitio Qi (por ejemplo, antimicina A). (Chen, Li, Lavigne, Trush, & Yager, 1999)

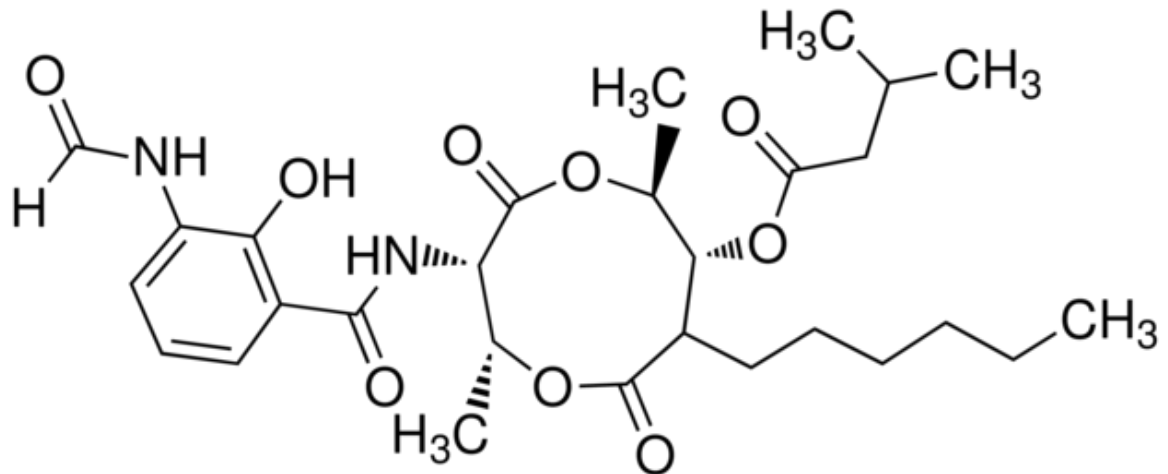


Figura 7 Estructura de Antimicina A(Milakovic & Johnson, 2005)

Complejo IV citocromo oxidasa El complejo final en la cadena respiratoria es la citocromo c oxidasa. Durante la acción del complejo IV, el citocromo c se vuelve a oxidar y los electrones de la cadena respiratoria se utilizan para reducir el oxígeno molecular resultante en la formación de agua. En este proceso dos protones se bombean hacia el exterior de la matriz por cada átomo de oxígeno reducido. Un punto de importancia toxicológica(Leavesley, Li, Prabhakaran, Borowitz, & Isom, 2008) es que durante la reducción de oxígeno por el complejo IV, se forman especies reactivas parcialmente oxidados tales como el radical superóxido. La fuga de tales EROs del complejo IV podría contribuir al estrés oxidativo en la célula, aunque la fuga de electrones de sitios anteriores en la cadena respiratoria es tal vez una fuente más general de EROs.(Leavesley et al., 2008)

El cianuro de hidrógeno es un fuerte inhibidor de esta oxidasa, que todavía se utiliza como fumigante, y un segundo fumigante, fosfina (generada a partir de precursores tales como el fosforo de aluminio), que también se sabe que inhibe la citocromo oxidasa, al igual que los gases de monóxido de carbono y óxido nítrico(Jensen, Wilson, Aasa, & Malmstrom, 1984)(Cooper & Brown, 2008).

El complejo V: FoF1-ATP sintasa

Las ATP sintasas (ATPasa) están presentes en las membranas transductoras de energía, como las membranas de mitocondrias, de cloroplastos y también en la membrana plasmática de los procariontes. Recientemente, también se han localizado sobre las membranas plasmáticas de numerosas células, como los hepatocitos y los adipocitos. Aunque en esta localización las ATPasas parecen tener una modesta actividad sintetizadora de ATP, juegan un papel muy importante en la señalización celular y limitan la acumulación de gotitas de triglicéridos intracitosólicos. (Arakaki, Kita, Shibata, & Higuti, 2007)

Este complejo está constituido por 3 dominios distintos: un dominio hidrosoluble F₁ que contiene los sitios catalíticos, un dominio F₀ membranoso que forma el canal de protones y un dominio que permite el anclaje de F₁ a la membrana. El dominio membranoso F₀ es un oligómero de subunidades c que giran cuando se produce el paso de protones del espacio intermembranoso a la matriz. El dominio F₁ fue purificado en 1961 por Rackery está constituido por 5 subunidades diferentes:

Las subunidades α y β contienen los sitios de fijación de los nucleótidos adenílicos y los sitios catalíticos están situados en cada una de las subunidades β . La FoF₁-ATP sintasa asocia el bombeo de protones desde el espacio transmembranario hasta la matriz mitocondrial a la síntesis de ATP a partir del ADP. (Galkin & Vinogradov, 1999)

Este complejo permite convertir el gradiente electroquímico de protones en una energía química transportada por las moléculas de ATP. Se trata de un mecanismo reversible.

La oligomicina inhibe la síntesis de ATP mediante la inhibición directa de la ATPasa. En este caso, se inhibe la respiración asociada a la fosforilación de ADP y se mantiene la respiración del estado 4 controlada únicamente por la entrada pasiva de protones del citosol a la matriz mitocondrial (Holtzman & Magruder, 1977).

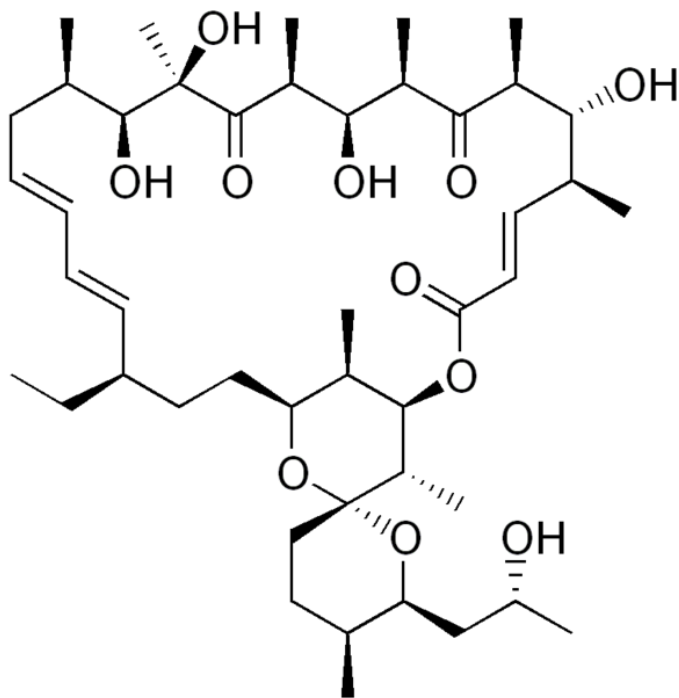


Figura 8 Estructura de Oligomicina(Evelin rojas, 2009)

3.3. Farmacología mitocondrial

La capacidad reguladores de los procesos de muerte celular por parte de la mitocondria la convierte en la organela de estudio de fármacos con actividades tanto proapoptóticas, con el fin de matar la célula, como antiapoptóticas, con el fin de prevenir su muerte. (Contreras, Drago, Zampese, & Pozzan, 2010)

Tabla 2 Fármacos que modulan funciones mitocondriales.

Activadores de la apoptosis	Tapsigargina, doxorubicina
Moduladores del estrés oxidativo	N-acetil cisteína, ácido pantoténico
Agonistas de canales de potasio	Cromacalima, nocorandil, diazóxido
Sulfoniureasas	Glibenclamida, glipicida
Benzodiazepinas	4-clorodiazepan
Inmunosupresores	Ciclosporina A
Antivirales	AZT
Antiinflamatorios no esteroides	Aspirina, Ibuprofeno

Anestésicos locales	Dibucaína, bupivacaína
Moduladores del metabolismo de lípidos	Amiodarona

3.3.1. Fármacos proapoptóticos

Entre los mecanismos de acción de los fármacos proapoptóticos existe la manipulación de la concentración de calcio en el interior de la célula, por ejemplo, mediante el uso de la taspigargina que previene la acumulación de calcio en el retículo y que conduce a apoptosis en varios tipos celulares. Otros promotores de la apoptosis, son las EROS. La producción excesiva de radicales libres puede ser inducida por un gran número de xenobióticos, iones de metales de transición y radicales ionizantes. (Aranha et al., 2002)

La activación del PTPM o la modificación de la estabilidad de la membrana mitocondrial constituyen parte del mecanismo de acción de gran número de fármacos anticancerígenos. (Mesner & Kaufmann, 1999)

3.3.2. Fármacos antiapoptóticos.

Con el fin de proteger a la mitocondria contra el daño producido por las EROS, son varias las aproximaciones que se están realizando (donde se destaca el aumento de los valores de glutatión) mediante el uso de precursores de su síntesis como puede ser la N-acetilcisteína, que tiene además, por si sola propiedades antioxidantes. Este efecto también se produce en el incremento en la concentración de coenzima A mediante la administración de su precursor, el ácido pantoténico, o mediante la curcumina. (Jordán et al., 2003)

Otros antioxidantes intracelulares generales son el ácido ascórbico, el alfatocoferol, betacaroteno y el alfaácidolipoico. En los últimos se está introduciendo el ubiquinol, la forma reducida de la coenzima Q, un antioxidante natural que, además de la mitocondria, tiene como diana otras membranas celulares y se están desarrollando estudios sobre sus propiedades contra el envejecimiento y para retardar y/o reducir los síntomas de Alzheimer y de

Parkinson así como la enfermedad de Huntington.(Eckert, Lipka, & Muller, 2013; Rasola & Bernardi, 2011; Riederer & Mandel, 2007)

3.3.3. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroides, como los salicilatos y el ibuprofeno, comúnmente recetados, presentan efectos secundarios que parecen estar mediados por un proceso que incluye daño mitocondrial e inhibición de ciclooxigenasas. A este nivel, hoy se sabe que estos fármacos modifican la fosforilación oxidativa, inhibiendo la producción de ATP y alterando la permeabilidad de la membrana interna.(Moreno-sa, Silveira, & Marti, 1999)

Tabla 3 Fármacos inhibidores de los complejos de la cadena transportadora de electrones y patologías que presentan alteraciones de éstos

Complejo	I	II	III	IV	V
Fármaco inhibidor	Rotenona Amital	TTFA malonato	Antimicina A	Cianida Monóxido de carbono Acida	Oligomicina
Alteraciones	Enfermedad de Alzheimer Parkinson Cardiomiopatía Enfermedad de Leber Miopatías Enfermedad de Leigh	Enfermedad de Leigh Miopatías Paraganglioma Feocromocitoma	Cardiomiopatía Enfermedad de Leber Miopatías	Ataxia Enfermedad de Alper Enfermedad de Leber Enfermedad de Leigh Miopatías Rabdomiólisis	Enfermedad de Leber Enfermedad de Leigh

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata

Las Mitocondrias de hígado de rata fueron aisladas como descrito por Voss(Dinor O. Voss, 1961), utilizándose como medio de aislamiento: D-manitol 250 mmol.L⁻¹, HEPES 10 mmol.L⁻¹, pH 7.2, EGTA 1 mmol.L⁻¹ y BSA 0.1 g%. Para la obtención de las mitocondrias los animales (ratas albinas de raza wistar, únicamente machos, pesando aproximadamente 200 gramos y en ayuno durante 12 horas) fueron sacrificadas por decapitación. El hígado fue inmediatamente retirado e inmerso en medio de aislamiento helado. Después de lavado, el órgano fue

cortado y homogenizado en homogeneizador van Potter Elvehjen. La suspensión obtenida fue centrifugada a 600 x g a 4°C durante 10 minutos, para eliminación de células intactas, membranas y núcleos. El sedimento fue descartado y el sobrenadante centrifugado a 7000 x g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado obtenido, constituido de mitocondrias intactas, fue resuspendido, lavado dos veces en medio de extracción, y centrifugado a 7000 x g durante 10 minutos a 4°C con medio de extracción sin BSA. Las mitocondrias obtenidas fueron resuspendidas en medio de extracción sin BSA y mantenidas a 4°C hasta su utilización. (Fernández-Vizarrá et al., 2010)

Este trabajo de investigación se realizó de acuerdo con lo establecido por las leyes colombianas que rigen el uso de animales vivos en experimentos e investigación, Ley 84 de 1989 (Cap. IV, Art. 23-26) y la resolución 8430 de 1993 (Tit. IV, Art. 83-93).

4.2. Determinación de la concentración de proteínas mitocondriales

La concentración de proteínas en cada muestra resuspendida de mitocondrias de hígado se determinó mediante el ensayo de Bradford (1976) a 595 nm (Bradford, 1976). Para esto se preparó una curva de calibración utilizando patrones de albúmina de suero bovino (fraction V, MERCK) disueltos en solución buffer de fosfato. Las absorbancias de los patrones y las muestras fueron medidas en un ELISA marca Bio-Rad utilizando el programa Microplate Manager 6. Para esta cuantificación se prepararon 3 diluciones 1:100, 2:200, 1:300 y un blanco, se cuantificaron por el método de Bradford utilizando la curva de calibración determinada previamente.

4.3. Determinación del consumo de oxígeno

Fueron usadas mitocondrias de hígado de rata (1mg/mL) aisladas como se describió en el ítem 5.1, en un medio de incubación compuesto de: HEPES 10 mM (pH 7.4), EGTA 0.1 mM, manitol 125 mM, KCl 65 mM y suplementadas con glutamato de sodio 5 mM más malato 2.5mM o succinato de sodio 3 mM, Pi 1.6 mM e ADP 0.6 mM. El aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* fue adicionado en

diferentes concentraciones e incubados durante dos minutos con las mitocondrias antes de inducir la respiración mitocondrial.

Los experimentos se realizaron bajo agitación constante en cámara termostatzada a 28°C (VOSS *et al.*, 1961)(Dinor O. Voss, 1961). El consumo de oxígeno por la mitocondrias intactas se determinó polarográficamente en un oxígrafo, utilizando un electrodo tipo Clark, acoplado a un registrador, marca Hansatech.

4.4. Preparación de la suspensión de mitocondrias para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales.

La actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria se determinó en un espectrofotómetro 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 Eucalyptuscitriodora fue adicionado en una concentración de 10µg.mL⁻¹.mg⁻¹de proteína mitocondrial e incubado durante dos minutos con la mitocondrial antes de inducir la reacción, para todas las enzimas estudiadas.

4.4.1. NADH oxidasa EC 1.6.3.1

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

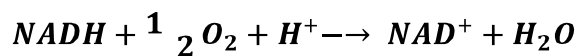


Figura 9Esquema de reacción del NADH. Tomado de Singer, 1974.

El sistema de reacción se compuso por tampón fosfato 80 mmol.L⁻¹(pH 7,4), EDTA 50µM, NADH 0.2mM e 1 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28°C y la reacción fue iniciada por la adición de NADH(Thoomas P. Singer, 1974)

4.4.2. NADH deshidrogenasa EC 1. 6.99.3

La actividad de la enzima fue determinada por el método espectrofotométrico usando ferrocianato como receptor artificial de electrones en la presencia de rotenona, la reacción fue monitoreada a 420 nm.

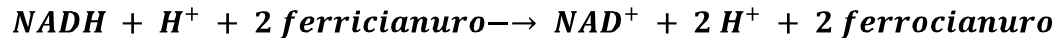


Figura 10 Esquema de reacción NADH deshidrogenasa. Tomado de Singer 1974

El sistema de reacción estaba compuesto de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2.0 mM, NADH 0.2 mM, ferrocianuro de potasio 600 mM, rotenona 1mM, NaCN 1 mM y 1 mg de proteína mitocondrial. La reacción fue iniciada por la adición del ferrocianuro y se monitoreó durante 3 minutos (Mason, Poyton, & Wharton, 1973)

4.4.3. NADH citocromo c reductasa

La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente a través del monitoreo de la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm. El sistema de reacción estaba constituido de tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, NADH 50 mM, citocromo c (oxidado) 40 mM, NaCN 1 mM y 1 mg de proteína mitocondrial. Todos los reactivos excepto el citocromo c, fueron incubados por 10 min a 28°C, la reacción se inició por la adición del citocromo c, y la lectura se realizó durante 2 minutos (Somlo, 1965)

4.4.4. 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), 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. (Thoomas P. Singer, 1974)

4.4.5. Succinatodeshidrogenasa EC 1.5.3.1

La actividad de la succinato deshidrogenasa fue determinada utilizando DCIP (2,6-Dicloroindofenol) y PMS (5-Metilfenazinametil sulfato) como receptores artificiales de electrones. La velocidad de reducción del DCIP fue monitoreada a 600 nm en un sistema de reacción compuesto por: tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4), succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM, NaCN 1 mM, rotenona 1 mM, PMS 1 mM 0.2 mg de proteína mitocondrial. Los reactivos presentes en el sistema, excepto el PMS y el DCPIP fueron incubados por 10 minutos a 28°C, la reacción se inició por la adición de DCPIP 180 μ M. (Thoomas P. Singer, 1974)

4.4.6. Succinato citocromo c reductasa EC 1.6.99.1

La actividad de esta enzima fue determinada por el método descrito por Somlo (Somlo, 1965), midiendo la reducción del citocromo c después de bloquear la cadena respiratoria con NaCN 1 mmol. L⁻¹ y rotenona mmol.L⁻¹, la velocidad de reducción del citocromo c fue acompañada a 550 nm, usando un sistema de reacción compuesto por: tampón fosfato 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,4), EDTA 2 mmol.L⁻¹, NaCN 1 mmol.L⁻¹, succinato de sodio 5 mmol.L⁻¹, rotenona 1 mmol.L⁻¹ e 0.2mg de proteína mitocondrial. La reacción fue iniciada por la adición de 40 mmol.L⁻¹ de citocromo c. (Somlo, 1965)

4.4.7. Citocromo c oxidasa EC 1.9.3.1

La actividad de esta enzima fue determinada por el método descrito por Mason *et al* (1973) (Mason *et al.*, 1973). Acompañando la velocidad de oxidación del citocromo c a 550 nm, en un sistema de reacción constituido de: tampón fosfato 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,4), EDTA 2 mmol.L⁻¹, citocromo c reducido 30 μ mol.L⁻¹ e 0.2mg de proteína mitocondrial.

La reacción fue iniciada por la adición de citocromo c reducido

4.4.8. Actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas

La actividad de la F1Fo ATPasa en mitocondrias fragmentadas por ciclos de congelamiento/descongelamiento fue determinada cuantificando el fosfato inorgánico resultante de la hidrólisis de ATP, según el método descrito por Pullman *et al* (1960)(Soluble, 1960). Sistema de reacción: tampón Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,4), MgSO₄ 3 mmol.L⁻¹, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 μmol.L⁻¹, 10 unidades de piruvato quinasa (1 unidad de piruvato quinasa convierte 1 μmol de PEP a piruvato por min) y proteína mitocondrial 1mg. Después de la adición del medio de reacción y de la piruvato quinasa, la reacción fue incubada por 10 minutos a 28°C, pasado este tiempo se inició la reacción con la adición de ATP 4 mmol.L⁻¹ e interrumpida pasados 10 minutos por la adición de Ácido tricloroacetico (TCA) al 5%. El material fue centrifugado a 10.000 g durante 1 minuto. El fosfato inorgánico fue cuantificado del sobrenadante siguiendo el método de Summer (1944)(Ii & Illinois, 1940).

4.4.9. Actividad ATPasa en mitocondrias integras.

La actividad de la F1Fo ATPasa en mitocondrias integras fue determinada cuantificando el fosfato inorgánico resultante de la hidrólisis de ATP, según el método descrito por Pullman *et al* (1960)(Soluble, 1960). Sistema de reacción: tampón Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,4), MgSO₄ 3 mmol.L⁻¹, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 μmol.L⁻¹, y proteína mitocondrial 1mg, estos ensayos se realizaron a la par con una muestra que contenía FCCP(1μg/mL), el cual ya es conocida su actividad desacopladora, 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 fue incubada por 10 minutos a 28°C, pasado este tiempo se inició la reacción con la adición de ATP 4 mmol.L⁻¹ e interrumpida pasados 10 minutos por la adición de Ácido tricloroacetico (TCA) al 5%. El material fue centrifugado a 10.000 g durante 1 minuto. El fosfato inorgánico fue cuantificado del sobrenadante siguiendo el método de Summer (1944)(Ii & Illinois, 1940).

4.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm desviaciones estándar y sometidas a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Turkey para la comparación de medias. Se consideró estadísticamente significativo si se compara el nivel de significación de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se describen los resultados obtenidos al evaluar concentraciones de 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre el metabolismo energético mitocondrial, todos los resultados aquí expresados como porcentaje en relación al control.

5.1. Análisis control respiratorio

Los efectos del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre la cadena respiratoria fueron evaluados en varias concentraciones, siendo incubados durante 2 minutos, evaluando los parámetros propios de la respiración mitocondrial: Consumo de oxígeno en presencia de ADP (estado 3), velocidad del consumo de oxígeno después del agotamiento del ADP (estado 4) y coeficiente de control respiratorio (CCR).

Cada uno de estos parámetros fue evaluado con dos sustratos independientes, Glutamato-Malato (5mM-2,5mM) respectivamente y Succinato (3mM), sustratos adecuados para la evaluación de los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial.

En la Figura 11 se compara el consumo de oxígeno con los dos sustratos para el estado 3 en presencia de ADP. Los resultados muestran que la adición del aceite en las concentraciones anteriormente dichas causa un aumento en la velocidad del consumo de oxígeno en el estado 3, de forma dosis dependiente con ambos sustratos, siendo mayor la velocidad de consumo para la concentración de 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína para los dos sustratos, cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar de tres experimento independientes realizado por triplicado cada uno, * significativamente ($p \leq 0.05$).

El aceite esencial mostró un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP (estado 3) del (186%) para Glutamato-Malato en comparación con un (166%) para Succinato, ambas medidas respecto al control. Existiendo diferencias significativas entre los dos sustratos.

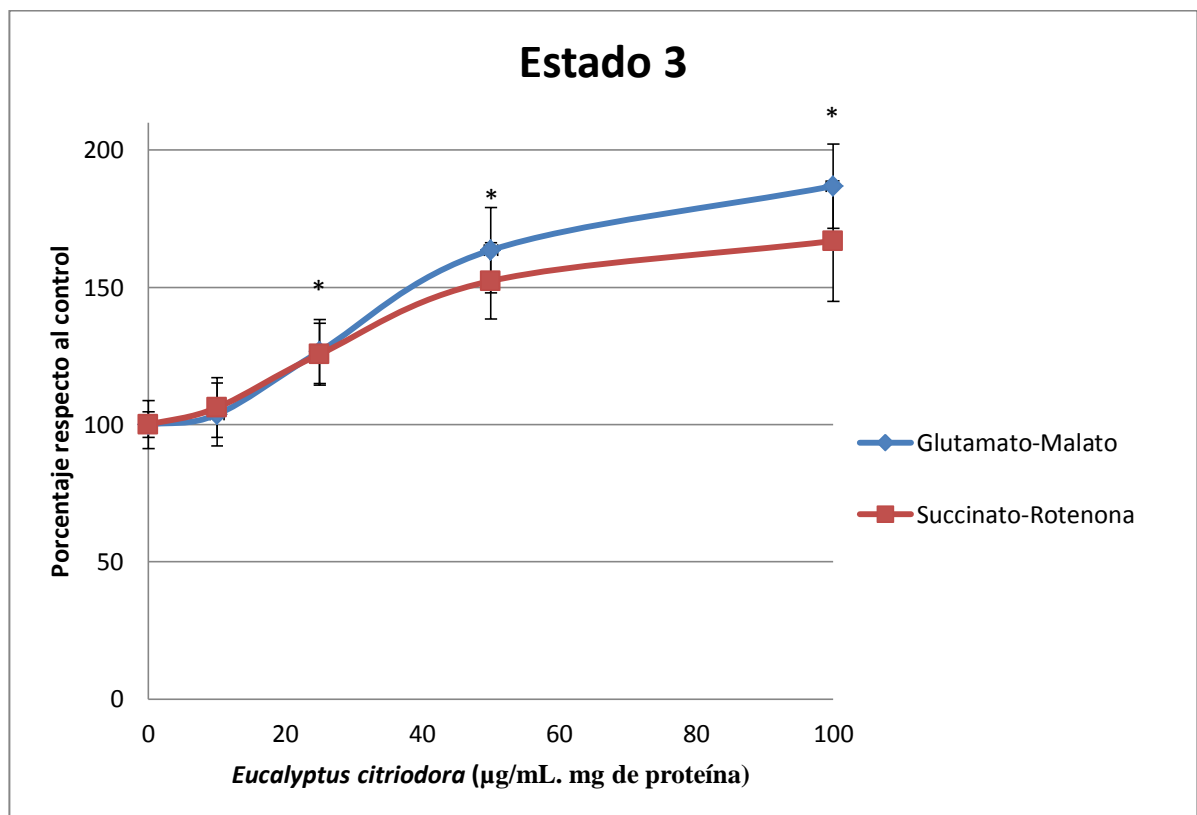


Figura 11 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP (0.6mM) (estado 3) con Glutamato-Malato (5mM-2,5mM) respectivamente y Succinato (3mM), 100% de actividad corresponde a $41,25 \pm 6,13$, y $32 \pm 7,28$ nmol de O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína respectivamente * significativamente ($p \leq 0.05$).

En la Figura 12 se muestran los resultados para el consumo de oxígeno en ausencia de ADP (estado 4). Se observa que la adición del aceite esencial causa un aumento dosis dependiente en el estado 4 para ambos sustratos con un porcentaje de un (325%) para Glutamato-Malato y un (255%) para Succinato, al igual que en el estado tres los porcentajes se calcularon con respecto al control, cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar de tres experimento independientes por triplicado cada uno, * significativamente ($p \leq 0.05$).

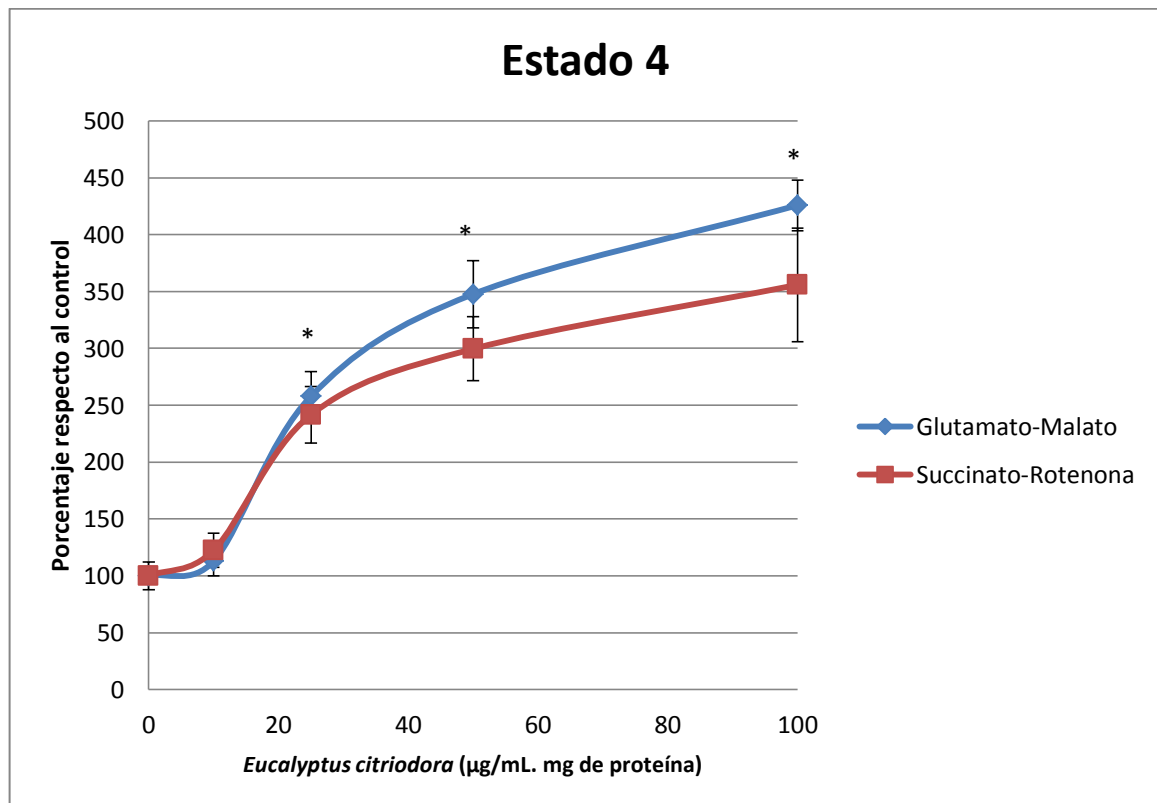


Figura 12 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP (0.6mM) (estado 4) con Glutamato-Malato (5mM-2,5mM)

respectivamente y Succinato (3mM), 100% de actividad corresponde a $30,56 \pm 9,15$ y $21,83 \pm 10,35$ nmol de O_2 consumido por $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína respectivamente * significativamente ($p \leq 0.05$).

El aceite genera un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno dosis dependiente para los dos sustratos, tanto en el estado 3 como en el estado 4, siendo mayor el aumento para este último, en ambos sustratos se vieron resultados estadísticamente significativos a partir de la concentración de $25 \mu\text{g/mL}$.mg de proteína, el estado 4 que se reporta aquí obedece a un estado 4 aproximado debido a que no se observaban claras diferencias entre las velocidades del estado 3 y del estado 4, sugiriendo una posible actividad desacopladora de la fosforilación oxidativa por parte del aceite. El estado 4 fue medido a los 18 minutos después de desencadenada la respiración mitocondrial al agregar el ADP.

Como se mencionó anteriormente, el aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* genera un aumento en la tasa de consumo de oxígeno tanto para el estado 3 como para el estado 4 con los dos sustratos suministrados, al generarse este aumento del consumo de oxígeno para el estado 4, genera que el coeficiente de control respiratorio disminuya considerablemente. Tal como se muestra en la figura 13 el CCR decae sustancialmente a medida que se aumenta la concentración de aceite, siendo mayor la caída cuando se utiliza el sustrato Succinato (alrededor del 32%) y una disminución del 45% cuando se estudia complejo I con Glutamato-Malato, cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar de tres experimento independientes por triplicado cada uno, * significativamente ($p \leq 0.05$).

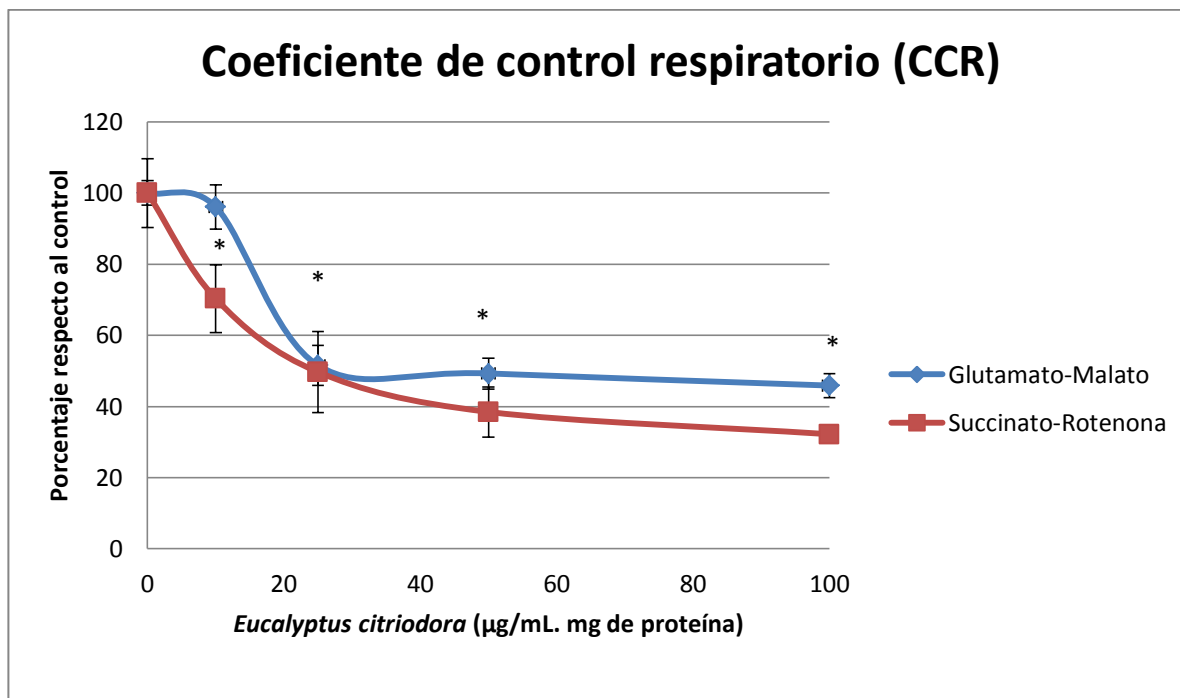


Figura 13 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre el coeficiente de control respiratorio (CCR) con Glutamato-Malato y succinato- Rotenona, 100% de actividad corresponde a $3,26 \pm 0,61$ y $3,37 \pm 0,71$ respectivamente. Cada valor representa el valor promedio \pm desviación estándar de tres experimento independientes por triplicado cada uno, * significativamente ($p \leq 0.05$).

De estos resultados se observa que el aceite induce efectos similares, independientemente el sustrato usado, alterando el proceso de respiración mitocondrial. Para evaluar si estas alteraciones son consecuencia de efectos directos sobre los complejos de la cadena respiratoria, se estudió el efecto del aceite sobre cada una de las enzimas de la cadena respiratoria, resultados que se mostrarán más adelante.

5.2. Análisis de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial.

Se estudiaron cada uno de los complejos mitocondriales en mitocondrias fragmentadas, esto con el fin de elucidar el efecto del aceite esencial, sobre cada

una de las enzimas de la cadena respiratoria, para esto se utilizó únicamente la concentración de aceite de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.mg de proteína. Con el estudio con mitocondrias fragmentadas podemos evaluar el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria de forma independiente de la formación de potencial de membrana, la actividad de fosforilación, u otros procesos dependientes de la integridad de la membrana externa. Además, facilita la identificación de los sitios donde pueda presentarse inhibición o activación de la cadena respiratoria.

A continuación se describen los efectos generados por el aceite esencial sobre cada una de las enzimas mitocondriales.

5.2.1. NADH oxidasa

La evaluación de la actividad del aceite esencial sobre la NADH oxidasa se muestra en la Figura 14. La adición de esta concentración de aceite, no provocó ningunavariación estadísticamente significativa en la actividad de esta enzima.

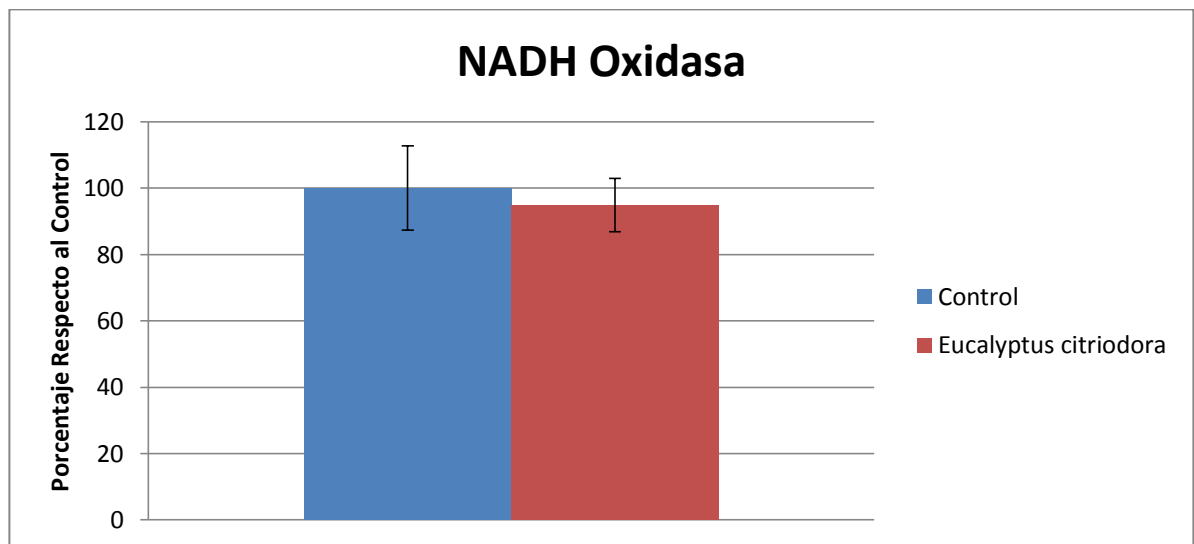


Figura 14 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre NADH Oxidasa, Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), El 100% corresponde a $24,601 \pm 13,72$ nmol de O_2 consumido/min .mg de proteína

5.2.2. NADH deshidrogenasa

Tras la adición del aceite esencial en la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$.mg de proteína no se evidenció ningún efecto inhibitor o activador de esta enzima mitocondrial, tal como lo muestra la figura 15.

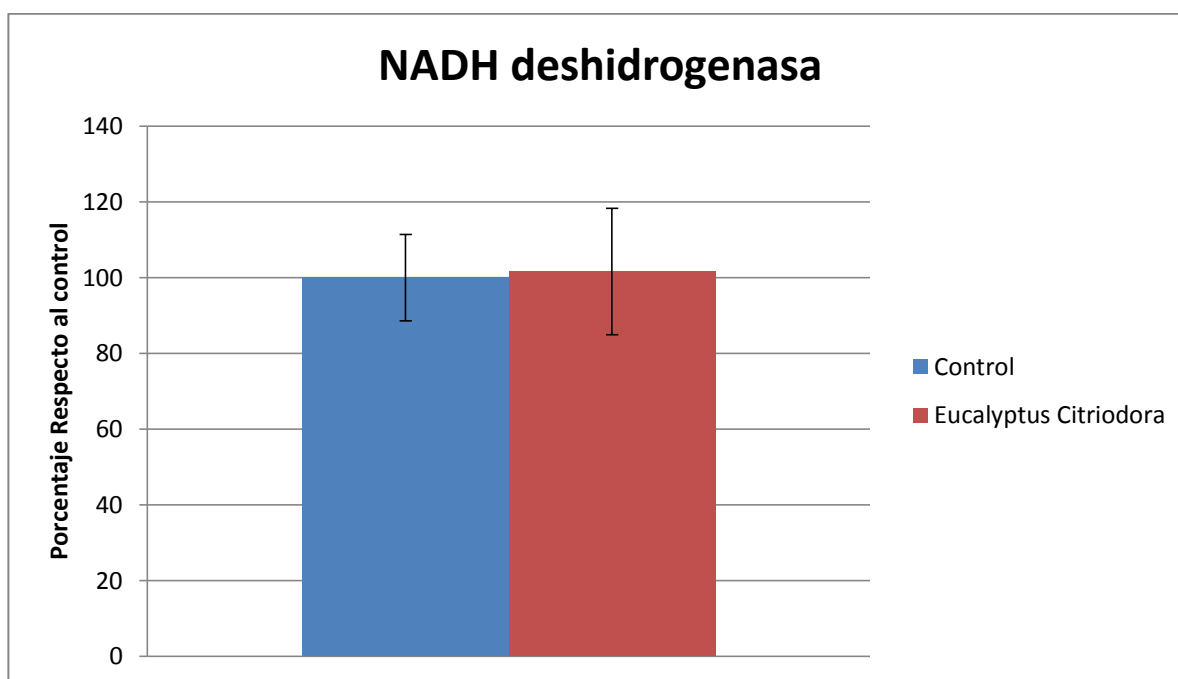


Figura 15 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre NADH Deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), el 100% corresponde a $0,78 \pm 0,16$ nmol de ferrocianuro reducido $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína

5.2.3. NADH citocromo c reductasa

La adición del aceite esencial no produjo ninguna inhibición ni activación de esta enzima, tal como se ve en la figura 16, Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), y el 100% corresponde a $0,13 \pm 0,048$ pmol de citocromo c reducido por $\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína

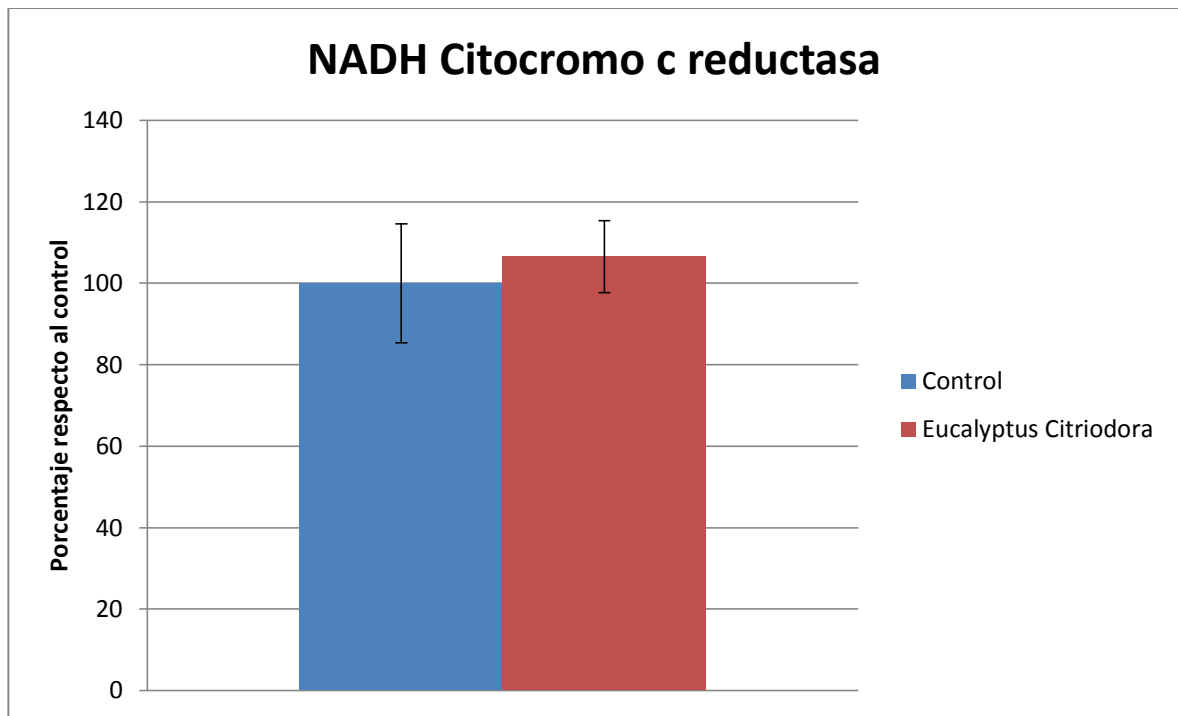


Figura 16 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre NADH Citocromo c Reductasa, Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), y el 100% corresponde a $0,13 \pm 0,048$ pmol de citocromo c reducido por min.mg proteína

5.2.4. Succinatooxidasa.

Al estudiar el efecto del aceite esencial sobre esta enzima mitocondrial no se observa ningún efecto inhibitor o activador que sea estadísticamente significativo, tal como se ven la figura 17, Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), y el 100% corresponde a $11,217 \pm 3,49$ nmol de O_2 consumido/min .mg de proteína

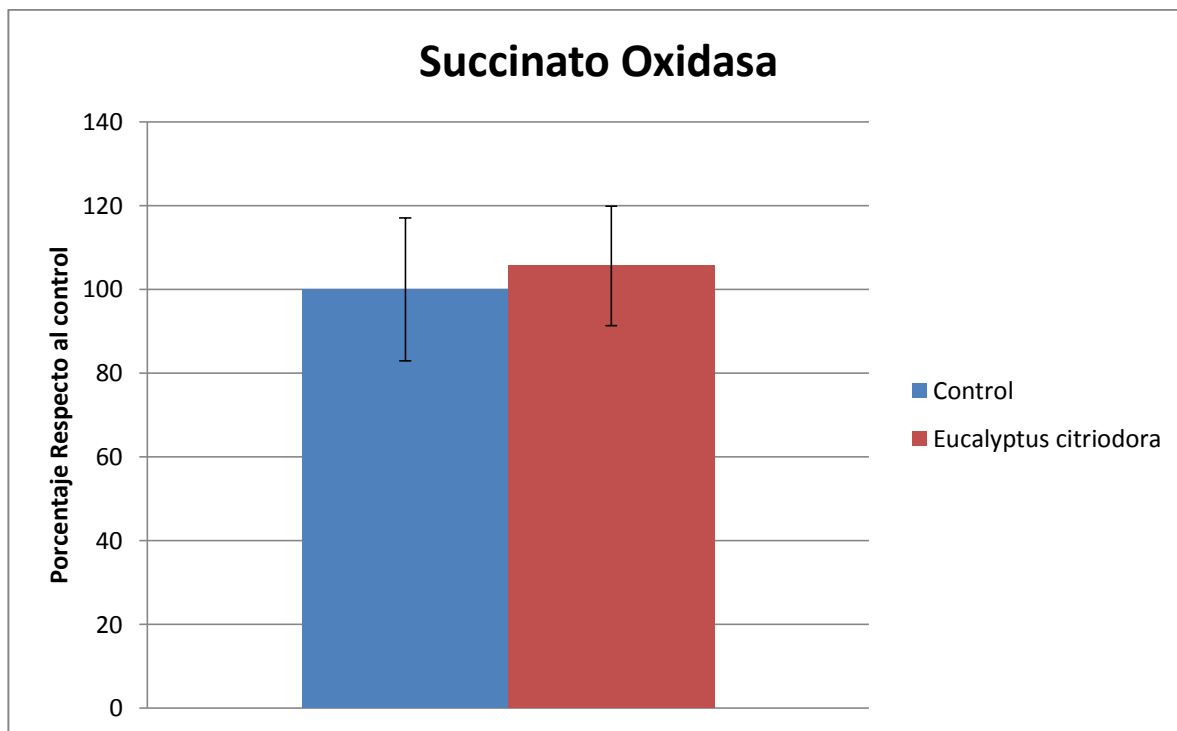


Figura 17 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre Succinato oxidasa, Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), y el 100% corresponde a $11,217 \pm 3,49$ nmol de O_2 consumido/min .mg de proteína

5.2.5. Succinatodeshidrogenasa.

Al igual que con la enzima Succinato oxidasa, al estudiar el efecto del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre la enzima Succinato Deshidrogenasa no se observa un efecto estadísticamente significativo, tal como se observa en la figura 18, cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.* significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), y el 100% corresponde a $0,216 \pm 0,06$ pmol de DCIP reducido por min/mg de proteína.

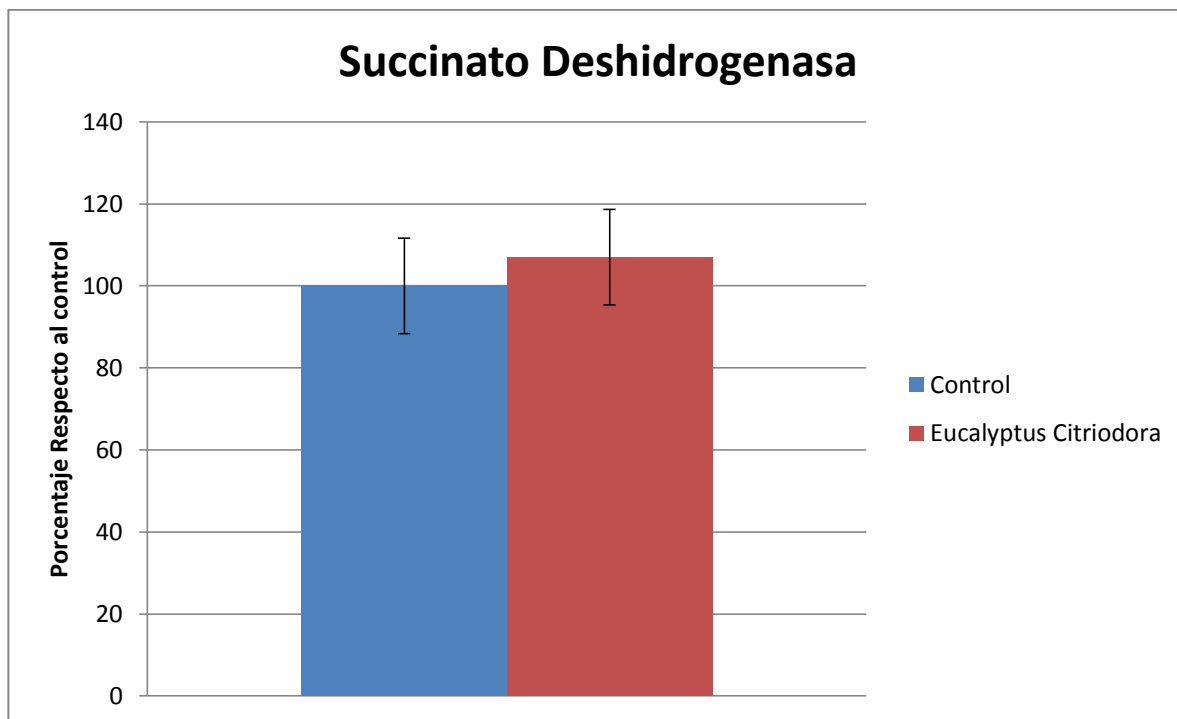


Figura 18 Efecto del aceite esencia de *Eucalyptuscitriodora* sobre Succinato Deshidrogenasa, cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.* significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), y el 100% corresponde a $0,216 \pm 0,06$ pmol de DCIP reducido por min/mg de proteína.

5.2.6. Succinato citocromo c reductasa

La adición del aceite esencial para mirar el efecto sobre la enzima succinato citocromo c reductasa no ocasionó ningún efecto estadísticamente significativo, como se ve en la figura 19, Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.* significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), el 100% corresponde a $0,112 \pm 0,022$ pmol de citocromo c reducido por min . mg de proteína mitocondrial.

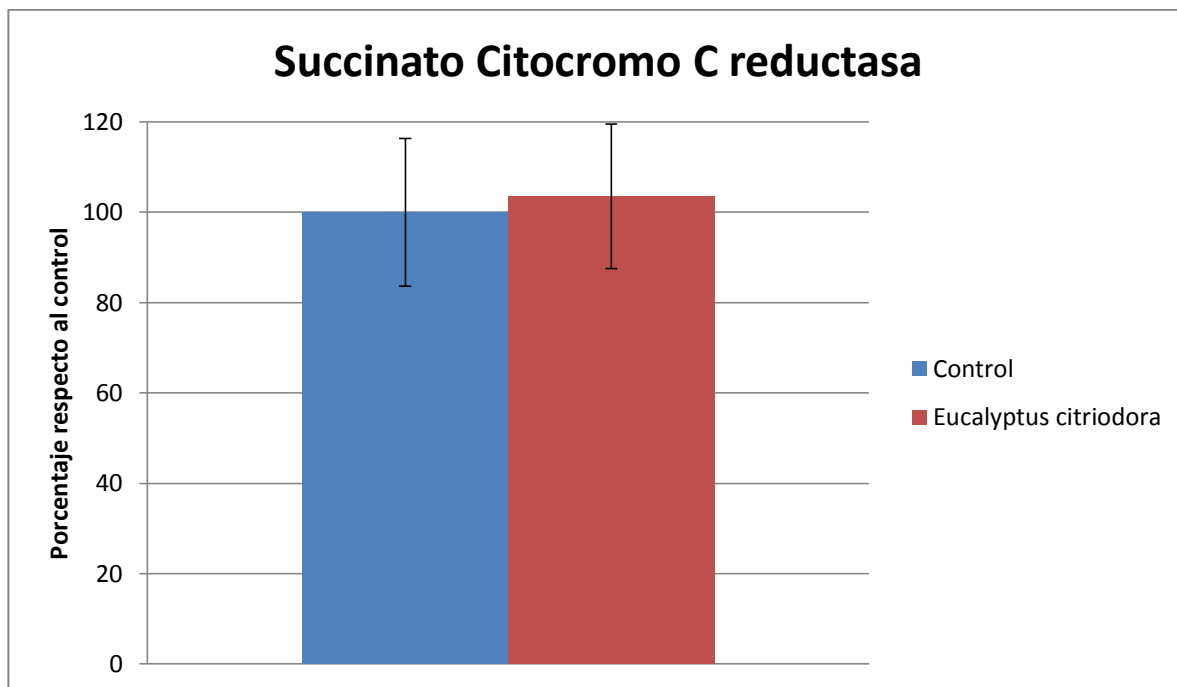


Figura 19 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre Succinato Citocromo c Reductasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.* significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), el 100% corresponde a $0,112 \pm 0,022$ pmol de citocromo c reducido por min . mg de proteína mitocondrial.

5.2.7. Citocromo c oxidasa.

La evaluación de la actividad del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre Citocromo c Oxidasa se muestra en la figura 20, se evidencia un efectivo activador sobre esta enzima mitocondrial causada por el aceite esencial después de su incubación por 2 min con la proteína mitocondrial. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.* significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), el 100% 100% corresponde a $0,061 \pm 0,014$ pmol de citocromo c oxidado por min mg de proteína

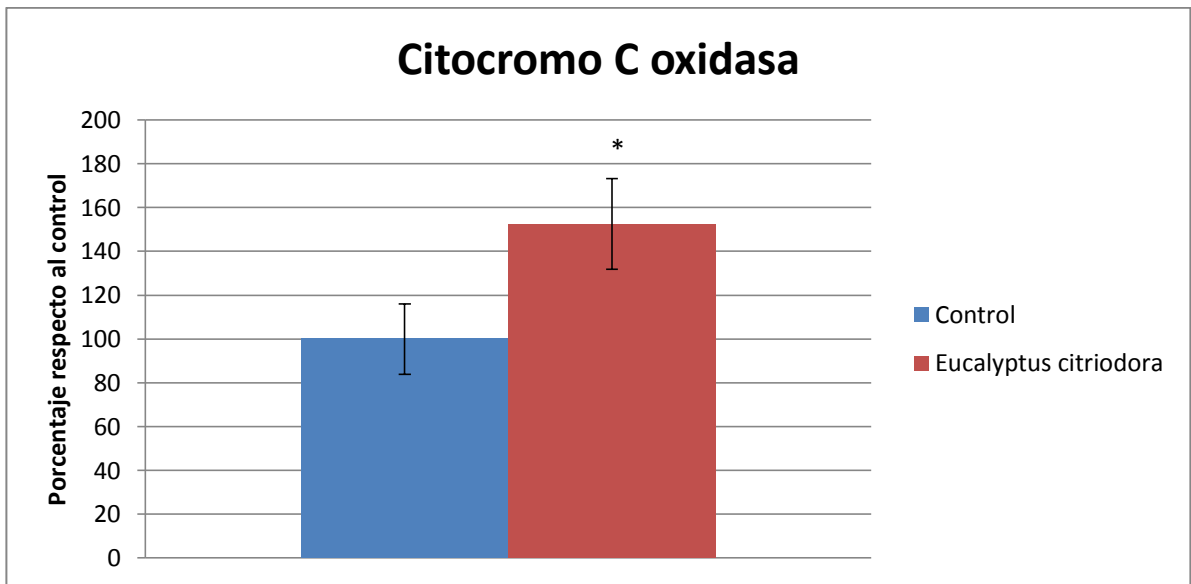


Figura 20 Efecto del aceite esencial *Eucalyptuscitriodora* sobre Citocromo c Oxidasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.* significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), el 100% corresponde a $0,061 \pm 0,014$ pmol de citocromo c oxidado por min mg de proteína

Los resultados observados sobre las actividades de las enzimas de la cadena respiratoria sugieren que el aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3, podría estar relacionada con el aumento de la actividad de la citocromo c oxidasa, sin embargo, no explicaría el aumento de la velocidad en el estado 4, lo que lleva a pensar que además del efecto sobre la citocromo c oxidasa, el aceite puede comportarse como un ionoforo o un agente desacoplador de la síntesis de ATP.

Para descartar efectos adicionales sobre la ATPasa, se evaluó también el efecto del aceite sobre este complejo proteico, cuyos resultados se describen a continuación.

5.2.8. Actividad ATPasa con mitocondria integra.

Para el análisis de la enzima ATPasa se hicieron dos estudios por separado para estudiar dicha enzima, en el primer ensayo se trabajó con mitocondrias integras cuantificando el fosfato liberado tal como se mencionó en la parte experimental, y en segundo lugar se realizaron ensayos determinando igualmente la cantidad de fosfatos liberado por esta vez con mitocondrias fragmentadas.

La actividad presentada por el aceite esencial sobre la ATPasa con mitocondria integra se muestra en la figura 21, dicha actividad se expresa respecto al control, además se hicieron ensayos con el desacoplador FCCP. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.* significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), ATPasa mitocondria integra 100% de actividad corresponde a $8,01 \pm 0,83 \mu\text{mol}$ de Pi hidrolizado

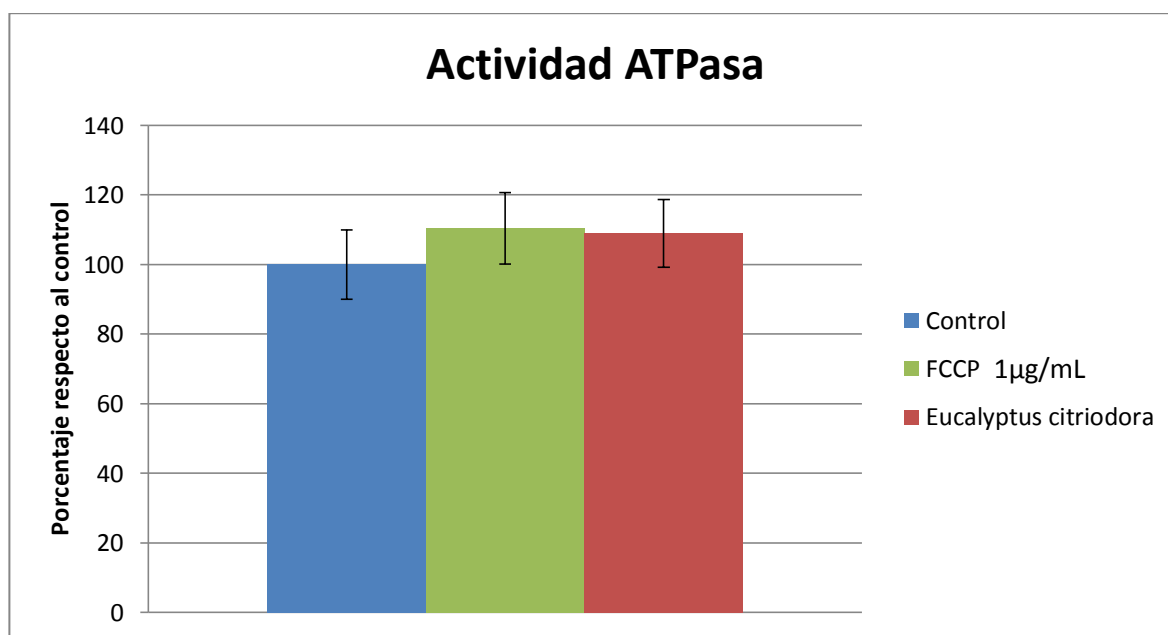


Figura 21 Efecto del aceite esencial de *Eucalyptuscitriodora* sobre la actividad ATPasa en mitocondrias integras. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.* significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), ATPasa mitocondria integra 100% de actividad corresponde a $8,01 \pm 0,83 \mu\text{mol}$ de Pi hidrolizado

5.2.9. Actividad ATPasa con mitocondria fragmentada

La actividad presentada por el aceite esencial sobre la ATPasa en mitocondria fragmentada se muestra en la figura 22, dicha actividad se expresa respecto al control. 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 $7,91 \pm 0,63$ μmol de Pi hidrolizado.

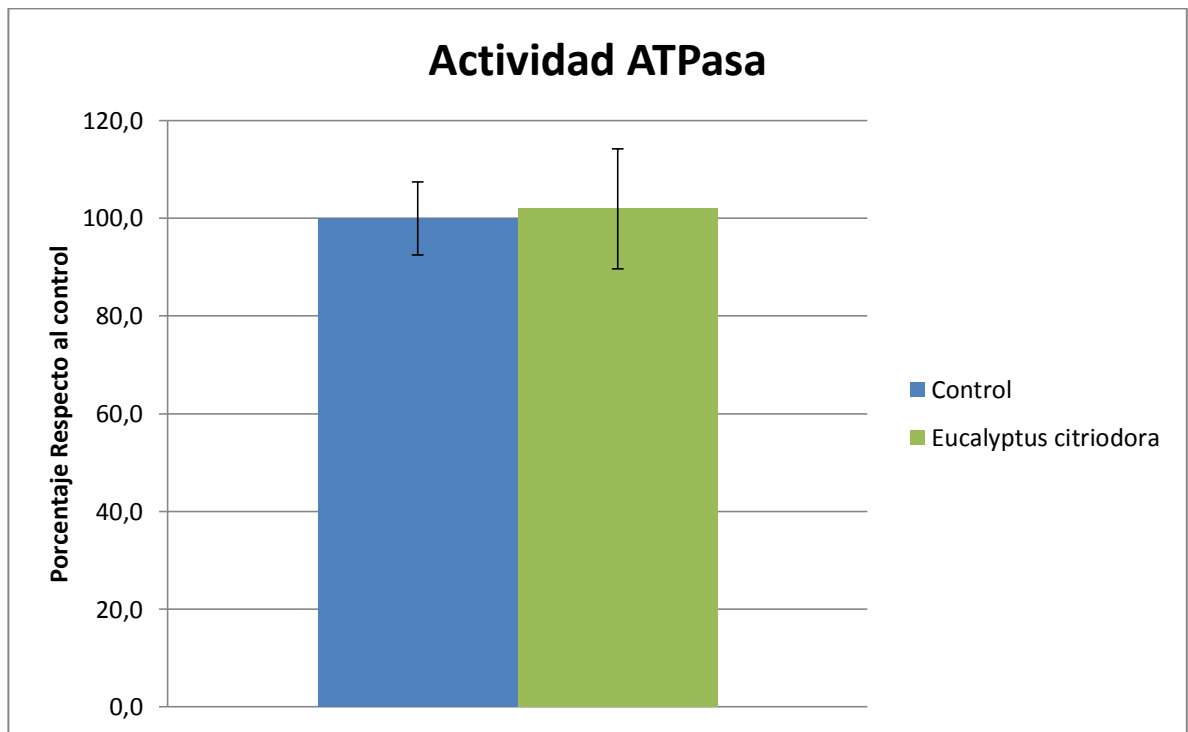


Figura 22 Efecto del aceite esencial de Eucalyptuscitriodora sobre la actividad ATPasa en mitocondrias fragmentadas. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.* significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$), actividad ATPasa mitocondria fragmentada 100% de actividad corresponde a $7,91 \pm 0,63$ μmol de Pi hidrolizado.

El análisis en conjunto de los resultados obtenidos de mitocondria integra, sugiere que el aceite esencial de *Eucalyptus citriodor* provoca un desacople de la fosforilación oxidativa dosis dependiente de la concentración de aceite suministrado, esto soportado en el aumento de la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 y en estado 4 haciendo que el coeficiente de control respiratorio (CCR) disminuya considerablemente, se presentaron diferencias estadísticamente significativas a partir de la concentración de 25 µg/mL para cada uno de los dos sustratos oxidables suministrados en la evaluación del complejo I y II.

Los resultados mostrados por la adición del aceite esencial a mitocondria fragmentada muestran que no hay ningún efecto inhibitor ni estimulante para las enzimas mitocondriales, NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa, NADH citocromo c reductasa, Succinato Oxidasa, Succinato citocromo c reductasa y ATPasa.

Pero por el contrario en el análisis de resultados de la enzima Citocromo C oxidasa se observa un estímulo por parte del aceite hacia esta enzima, lo cual se ve reflejado en la velocidad en la que oxida el citocromo c en comparación con el control.

Con estos resultados se infiere que gracias al aumento en la actividad de la citocromo c oxidasa se requiere de un aumento en el flujo de electrones a través de ellas, generando un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Azzone et al., 1985).

Cabe aclarar que para establecer todos los efectos del aceite sobre la mitocondria es necesario hacer más pruebas, es necesario realizar experimentos donde se estudie el potencial de membrana formado por la mitocondria en presencia del aceite, así como el estudio del hinchamiento mitocondrial para descartar la

formación o no de un poro transitorio de permeabilidad mitocondrial, con estos resultados se podría complementar muy bien este estudio con los resultados aquí obtenidos.

Su acción estimulante sobre la citocromo c oxidasa postulan al aceite esencial en el tratamiento de un gran número de patologías como lo son Ataxia, Enfermedad de Alper, Enfermedad de Leber, Miopatias, Rabdomiólisis, Enfermedad de Leigh, donde se ha demostrado que los pacientes que padecen de estas patologías presentan una disminución en la actividad de la citocromo c oxidasa.

Por otro lado, se puede sugerir que gracias al efecto del aceite sobre el complejo IV, algunos de sus metabolitos o mezcla de ellos, sean evaluados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, gracias a los avances en la farmacología mitocondrial a las enfermedades neurodegenerativas recientemente se han hecho estudios sobre la activación de complejo IV y su acción sobre la enfermedad de alzheimer, tal como lo muestra Atmna et al 2010 (Atamna & Kumar, 2010).

Con el desarrollo de este proyecto se buscaba encontrar diferencias significativas en la acción del aceite esencial sobre la cadena respiratoria mitocondrial y sus enzimas a diferentes concentraciones, y así sumar a la lista de actividades biológicas del aceite otras posibles actividades que puede presentar farmacológicamente hablando, además con este proyecto se abre campo a un estudio más profundo del aceite junto con sus metabolitos sobre la cadena respiratoria, para así poder establecer, a cuál de sus metabolitos mayoritarios se debe su actividad, o a lo mejor un metabolito presente una mayor actividad desacopladora que el propio aceite, además se podrían establecer diferencias en el mecanismo de acción entre el enantiomero R y S de un mismo metabolito, ya que a pesar de que estos metabolitos tienen las mismas propiedades químicas se

caracterizan por tener diferentes actividades farmacocinéticas y farmacodinámicas debido a la ubicación espacial de sus grupos funcionales.

6. CONCLUSIONES.

- ✓ Se observaron diferencias significativas en el efecto causado por el aceite esencial sobre la respiración mitocondrial a partir de concentraciones de 25µg/ml de aceite para ambos sustratos utilizados, siendo el efecto dosis dependiente.

- ✓ Se observó un desacople de la fosforilación oxidativa.

- ✓ La adición del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* causó un aumento de los parámetros propios de la respiración mitocondrial y una disminución del CCR.

- ✓ La adición del aceite esencial provoca un aumento en la actividad de la enzima Citocromo C oxidasa ocasionando así un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno.

7. RECOMENDACIONES.

- Realizar pruebas donde estudie el efecto del aceite de acción sobre el potencial de membrana en la mitocondria, permitiendo esclarecer el efecto del aceite sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

- Realizar ensayos con los metabolitos mayoritarios del aceite esencial y mezclas racémicas de estos para establecer si el efecto del aceite se debe principalmente a alguno de sus metabolitos mayoritarios.

- Realizar estudios a nivel celular.

8. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS.

Los resultados de este proyecto fueron divulgados en el I Congreso Internacional de Productos Fitofarmacéuticos 2013, celebrado en la ciudad de Bogotá del 10 al 12 de octubre de 2013. (Ver anexos)

BIBLIOGRAFÍA.

- Arakaki, N., Kita, T., Shibata, H., & Higuti, T. (2007). Cell-surface H⁺-ATP synthase as a potential molecular target for anti-obesity drugs. *FEBS letters*, 581(18), 3405–9. doi:10.1016/j.febslet.2007.06.041
- Aranha, O., Zhu, L., Alhasan, S., Wood, D. P., Kuo, T. H., & Sarkar, F. H. (2002). Role of mitochondria in ciprofloxacin induced apoptosis in bladder cancer cells. *The Journal of Urology*, 167(3), 1288–1294. Retrieved from [http://www.jurology.com/article/S0022-5347\(05\)65283-4/abstract](http://www.jurology.com/article/S0022-5347(05)65283-4/abstract)
- Arti, M., Ankur, R., Seema, R., Amarjeet, D., & Ashok, K. (2012). Review Article MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORES : ANOTHER VIEW, 3(5), 106–108.
- Atamna, H., & Kumar, R. (2010). Protective role of methylene blue in Alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 20 Suppl 2, S439–52. doi:10.3233/JAD-2010-100414
- Azzone, G. F., Zoratti, M., Petronilli, V., & Pietrobon, D. (1985). The stoichiometry of H⁺ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling. *Journal of inorganic biochemistry*, 23(3-4), 349–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2410567>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(2), 446–75. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Ballot, C., Kluza, J., Lancel, S., Martoriati, A., Hassoun, S. M., Mortier, L., Vienne, J.-C., et al. (2010). Inhibition of mitochondrial respiration mediates apoptosis induced by the anti-tumoral alkaloid lamellarin D. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 15(7), 769–81. doi:10.1007/s10495-010-0471-2
- Barbi de Moura, M., Vincent, G., Fayewicz, S. L., Bateman, N. W., Hood, B. L., Sun, M., Suhan, J., et al. (2012). Mitochondrial respiration--an important therapeutic target in melanoma. *PloS one*, 7(8), e40690. doi:10.1371/journal.pone.0040690
- Batandier, C., Fontaine, E., Kériel, C., & Lerverve, X. M. (2002). Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *Journal of*

cellular and molecular medicine, 6(2), 175–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12169203>

- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12), 2166–2174. doi:10.1016/j.foreco.2008.08.008
- Batish, D. R., Singh, H. P., Setia, N., Kaur, S., & Kohli, R. K. (2006). Chemical composition and inhibitory activity of essential oil from decaying leaves of *Eucalyptus citriodora*. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 61(1-2), 52–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16610217>
- Belay, G., Tariku, Y., Kebede, T., & Hymete, A. (2011). Ethnopharmacological investigations of essential oils isolated from five Ethiopian medicinal plants against eleven pathogenic bacterial strains, 1(5), 133–143.
- Berdanier, C. D. (2005). Introduction to Mitochondria. *taylor & Francis group*, 3–20.
- Bianchi, K., Rimessi, A., Prandini, A., Szabadkai, G., & Rizzuto, R. (2004). Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochimica et biophysica acta*, 1742(1-3), 119–31. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.015
- Boveris, B. A., & Chance, B. (1973). The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide, 134, 707–716.
- Boya, P., Roumier, T., Andreau, K., Gonzalez-Polo, R.-A., Zamzami, N., Castedo, M., & Kroemer, G. (2003). Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), 575–581. doi:10.1016/S0006-291X(03)00630-2
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Celsi, F., Pizzo, P., Brini, M., Leo, S., Fotino, C., Pinton, P., & Rizzuto, R. (2009). Mitochondria, calcium and cell death: a deadly triad in neurodegeneration. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(5), 335–44. doi:10.1016/j.bbabbio.2009.02.021
- Chen, J., Li, Y., Lavigne, J. a, Trush, M. a, & Yager, J. D. (1999). Increased mitochondrial superoxide production in rat liver mitochondria, rat hepatocytes, and HepG2 cells following ethinyl estradiol treatment. *Toxicological sciences* :

an official journal of the Society of Toxicology, 51(2), 224–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10543024>

- Cocco, T., Cutecchia, G., Montedoro, G., & Lorusso, M. (2002). The antihypertensive drug carvedilol inhibits the activity of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 34(4), 251–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12392188>
- Contreras, L., Drago, I., Zampese, E., & Pozzan, T. (2010). Mitochondria: the calcium connection. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7), 607–18. doi:10.1016/j.bbabi.2010.05.005
- Cooper, C. E., & Brown, G. C. (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40(5), 533–9. doi:10.1007/s10863-008-9166-6
- Cunha-Oliveira, T., Silva, L., Silva, A. M., Moreno, A. J., Oliveira, C. R., & Santos, M. S. (2013). Mitochondrial complex I dysfunction induced by cocaine and cocaine plus morphine in brain and liver mitochondria. *Toxicology letters*, 219(3), 298–306. doi:10.1016/j.toxlet.2013.03.025
- Desagher, S., & Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology*, 10(9), 369–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10932094>
- Desler, C., & Rasmussen, L. J. (2013). Mitochondria In Biology and Medicine - 2012. *Mitochondrion*. doi:10.1016/j.mito.2013.05.010
- Dinor O. Voss, A. P. C. and M. B. (1961). The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 4(1), 48–61. Retrieved from <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
- Eckert, G. P., Lipka, U., & Muller, W. E. (2013). Omega-3 fatty acids in neurodegenerative diseases: focus on mitochondria. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 88(1), 105–14. doi:10.1016/j.plefa.2012.05.006
- Emelyanov, V. V. (2003). Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. *European Journal of Biochemistry*, 270(8), 1599–1618. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03499.x

- Evelin rojas, Z. S. de M. (2009). AISLAMIENTO DEL COMPLEJO F1FO ATP SINTETASA DE ASCARIS SUUM MEDINTE CN-PAGE Y SDS-PAGE. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*, 3(3), 325–336.
- F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. I. (2008). Biological effects of essential oils.
- Fernández-Vizarra, E., Ferrín, G., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Zeviani, M., & Enríquez, J. A. (2010). Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. *Mitochondrion*, 10(3), 253–62. doi:10.1016/j.mito.2009.12.148
- Galkin, M. a, & Vinogradov, a D. (1999). Energy-dependent transformation of the catalytic activities of the mitochondrial F0 x F1-ATP synthase. *FEBS letters*, 448(1), 123–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217423>
- Gechev, T., Petrov, V., & Minkov, I. (n.d.). Programmed Cell Death. *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher plants* (pp. 65–73).
- Glinka, Y. Y., & Youdim, M. B. (1995). Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *European journal of pharmacology*, 292(3-4), 329–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7796873>
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1309–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721092>
- Grivennikova, V. G., & Vinogradov, A. D. (2006). Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochimica et biophysica acta*, 1757(5-6), 553–61. doi:10.1016/j.bbabi.2006.03.013
- Group, T. & F. (2009). *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling in Mitochondria* (pp. 55–79).
- Hase, P., Digaskar, S., Ravikanth, K., Dandale, M., & Maini, S. (2013). Management of subclinical mastitis with mastilep gel and herbal spray (AV / AMS / 15), 2(4), 64–67.
- Hirst, J., King, M. S., & Pryde, K. R. (2008). The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 5), 976–80. doi:10.1042/BST0360976
- Holtzman, D., & Magruder, C. S. (1977). Effects of oligomycin on respiration in developing rat brain mitochondria. *Brain research*, 120(2), 373–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/832131>

- li, S. R. D. I., & Illinois, I. N. D. R. H. B.-. (1940). Colorimetric Determination of Phosphate Preparation of Reagents, 665–668.
- Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1807(6), 735–45. doi:10.1016/j.bbabbio.2011.03.010
- Jaafari, A., Tilaoui, M., Mouse, H. A., Aboufatima, R., Lepoivre, M., & Ziad, A. (2012). Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes : relationship to cell cycle analysis, 22(3), 534–540.
- Jensen, P., Wilson, M. T., Aasa, R., & Malmstrom, B. G. (1984). Cyanide inhibition of cytochrome c oxidase, 224, 829–837.
- Jeyaraju, D. V, Cisbani, G., & Pellegrini, L. (2009). Calcium regulation of mitochondria motility and morphology. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(11), 1363–73. doi:10.1016/j.bbabbio.2008.12.005
- Jordán, J., Ceña, V., & Prehn, J. H. M. (2003). Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *Journal of physiology and biochemistry*, 59(2), 129–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14649878>
- Krieger, C., & Duchen, M. R. (2002). Mitochondria , Ca²⁺ and neurodegenerative disease. *European journal of pharmacology*, 447, 177–188.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev*, 87, 99–163. doi:10.1152/physrev.00013.2006.
- Lagoa, R., Graziani, I., Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., & Gutierrez-Merino, C. (2011). Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1807(12), 1562–72. doi:10.1016/j.bbabbio.2011.09.022
- Leavesley, H. B., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J. L., & Isom, G. E. (2008). Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 101(1), 101–11. doi:10.1093/toxsci/kfm254
- Lemieux, H., Semsroth, S., Antretter, H., Höfer, D., & Gnaiger, E. (2011). Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation

in the failing human heart. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(12), 1729–38. doi:10.1016/j.biocel.2011.08.008

- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M. L., Formiggini, G., Parenti Castelli, G., & Bovina, C. (1995). Underevaluation of complex I activity by the direct assay of NADH-coenzyme Q reductase in rat liver mitochondria. *FEBS letters*, 366(2-3), 119–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7789527>
- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*, 80(5), 780–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3191002&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Maria, N., Farias, P., & Souza, E. L. De. (2006). Atividade antifúngica de poleos essenciais sobre espécies de candida. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(2), 197–201.
- Mason, T. L., Poyton, R., & Wharton, D. C. (1973). Cytochrome c Pxidase from Bakers' Yeast. *The Journal of biological chemistry*, 248(4), 1346–1354.
- Mesner, P. W., & Kaufmann, S. H. (1999). *The Role of Proteases in Neuronal Apoptosis* (pp. 69–93).
- Milakovic, T., & Johnson, G. V. W. (2005). Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *The Journal of biological chemistry*, 280(35), 30773–82. doi:10.1074/jbc.M504749200
- Mishra, A. K., & Dubey, N. K. (1994). Evaluation of some essential oils for their stored food commodities . Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Applied and enviromental microbiology*, 60(4), 1101–1105.
- Modi, H. R., & Katyare, S. S. (2009). Effect of treatment with cadmium on structure-function relationships in rat liver mitochondria: studies on oxidative energy metabolism and lipid/phospholipids profiles. *The Journal of membrane biology*, 232(1-3), 47–57. doi:10.1007/s00232-009-9217-x
- Moreno-sa, R., Silveira, L. H., & Marti, M. (1999). Inhibition and Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, 57(98), 743–752.

- Motamayel, F. A., Hassanpour, S., & Alikhani, M. Y. (2013). Antibacterial effect of eucalyptus (*globulus Labill*) and garlic (*Allium sativum*) extracts on oral Cariogenic bacteria, *1*(May), 12–17.
- Nakamura, M. J., Monteiro, S. S., Bizarri, C. H. B., Siani, A. C., & Ramos, M. F. S. (2010). Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. *Biochemical Systematics and Ecology*, *38*(6), 1170–1175. doi:10.1016/j.bse.2010.11.003
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource technology*, *101*(1), 372–8. doi:10.1016/j.biortech.2009.07.048
- Powell, C. S., & Jackson, R. M. (2003). Mitochondrial complex I, aconitase, and succinate dehydrogenase during hypoxia-reoxygenation: modulation of enzyme activities by MnSOD. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, *285*(1), L189–98. doi:10.1152/ajplung.00253.2002
- Puchowicz, M. a, Varnes, M. E., Cohen, B. H., Friedman, N. R., Kerr, D. S., & Hoppel, C. L. (2004). Oxidative phosphorylation analysis: assessing the integrated functional activity of human skeletal muscle mitochondria--case studies. *Mitochondrion*, *4*(5-6), 377–85. doi:10.1016/j.mito.2004.07.004
- Rasola, A., & Bernardi, P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell calcium*, *50*(3), 222–33. doi:10.1016/j.ceca.2011.04.007
- Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M., & Matsuyama, S. (1998). Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1366*(1-2), 127–137. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714773>
- Riederer, P., & Mandel, M. Y. S. (2007). *Profiling in Parkinson ' s Disease* : (pp. 62–76).
- Romana Fato, Christina Bergamini, et al. (2010). production of reactive oxygen species. *Biochim biophys acta*, *1787*(5), 384–392. doi:10.1016/j.bbabi.2008.11.003.Differential
- Rousset, S., Alves-Guerra, M.-C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.-M., Bouillaud, F., & Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, *53 Suppl 1*(February), S130–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749278>

- S. Luqman, G.R. Dwivedi, M.P. Darokar, A.Kalra, S. P. . K. (2008). Antimicrobial activity of Eucalyptus citriodora essential. *International Journal Of Essential Oil Therapeutics*, 2, 69–75.
- Saavedra, O. M., Nahúm, E., Vázquez, J., Roberto, M., Guapillo, B., Manuel, G., Reyes, C., et al. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades. *Rev.Med UV*, (272).
- Scatena, R., Bottoni, P., Botta, G., Martorana, G. E., & Giardina, B. (2007). The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic. *American journal of physiology. Cell physiology*, 293(1), C12–21. doi:10.1152/ajpcell.00314.2006
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L., & Matos, F. J. a. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2-3), 277–283. doi:10.1016/j.jep.2003.09.007
- Sims, N. R., & Muyderman, H. (2010). Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et biophysica acta*, 1802(1), 80–91. doi:10.1016/j.bbadis.2009.09.003
- Singh, H. P., Batish, D. R., Kaur, S., Kohli, R. K., & Arora, K. (2006). Phytotoxicity of the volatile monoterpene citronellal against some weeds. *Zeitschrift fur Naturforschung Teil C Biochemie Biophysik Biologie Virologie*, 61(5-6), 334–340. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16869489>
- Singh, H. P., Kaur, S., Negi, K., Kumari, S., Saini, V., Batish, D. R., & Kohli, R. K. (2012). Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of Eucalyptus citriodora (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 237–241. doi:10.1016/j.lwt.2012.03.019
- Soluble, O. F. (1960). Partial Resolution Oxidative of the Enzymes Phosphorylation Catalyzing, 235(11), 3322–3329.
- Somlo, M. (1965). Induction des lactico-cytochrome c reductases (d-et l-) de la levure aerobie par les lactates (d- et l-). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 97(2), 183–201. doi:10.1016/0304-4165(65)90083-8
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in

- vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93–103.
doi:10.1016/j.chroma.2003.10.058
- Su, C.-L., Huang, L. L. H., Huang, L.-M., Lee, J.-C., Lin, C.-N., & Won, S.-J. (2006). Caspase-8 acts as a key upstream executor of mitochondria during justicidin A-induced apoptosis in human hepatoma cells. *FEBS letters*, 580(13), 3185–91. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.085
- Szewczyk, A., Kajma, A., Malinska, D., Wrzosek, A., Bednarczyk, P., Zabłocka, B., & Dołowy, K. (2010). Pharmacology of mitochondrial potassium channels: dark side of the field. *FEBS letters*, 584(10), 2063–9. doi:10.1016/j.febslet.2010.02.048
- Thoomas P. Singer. (1974). Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and a-Glycerophosphate Dehydrogenases. *Methods of biochemical Analysis*, 22, 123–175.
- To, M.-S., Aromataris, E. C., Castro, J., Roberts, M. L., Barritt, G. J., & Rychkov, G. Y. (2010). Mitochondrial uncoupler FCCP activates proton conductance but does not block store-operated Ca(2+) current in liver cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 495(2), 152–8. doi:10.1016/j.abb.2010.01.004
- Tornero, D. (2012). La mitocondria como diana farmacológica en los procesos neurodegenerativos, 21.
- Turrens, J. F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience reports*, 17(1), 3–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9171915>
- Van den Bogert, C., Holtrop, M., De Vries, H., & Kroon, a M. (1985). Specific inhibition of mitochondrial protein synthesis influences the amount of complex I in mitochondria of rat liver and *Neurospora crassa* directly. *FEBS letters*, 192(2), 225–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3934002>
- Vasington, F. D., & Greenawalt, J. W. (1968). Osmotically lysed rat liver mitochondria. Biochemical and ultrastructural properties in relation to massive ion accumulation. *The Journal of cell biology*, 39(3), 661–75. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2107558&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Ventura, B., Genova, M. L., Bovina, C., Formiggini, G., & Lenaz, G. (2002). Control of oxidative phosphorylation by Complex I in rat liver mitochondria: implications for aging. *Biochimica et biophysica acta*, 1553(3), 249–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997134>

- Victoria, F. N., Radatz, C. S., Sachini, M., Jacob, R. G., Alves, D., Savegnago, L., Perin, G., et al. (2012). Further analysis of the antimicrobial activity of α -phenylseleno citronellal and α -phenylseleno citronellol. *Food Control*, 23(1), 95–99. doi:10.1016/j.foodcont.2011.06.017
- Vinogradov, a D., & Grivennikova, V. G. (2005). Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry. Biokhimiia*, 70(2), 120–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15807648>
- Weissig, V., Cheng, S.-M., & D'Souza, G. G. M. (2004). Mitochondrial pharmaceuticals. *Mitochondrion*, 3(4), 229–44. doi:10.1016/j.mito.2003.11.002
- Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., & Karuppayil, S. M. (2011). Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 18(13), 1181–90. doi:10.1016/j.phymed.2011.03.008
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., Yaniv, Y., Nuss, H. B., Wang, S., & Sollott, S. J. (2009). Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research*, 83(2), 213–225. doi:10.1093/cvr/cvp151



EL COLEGIO NACIONAL DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS DE COLOMBIA

CERTIFICA QUE:

LUIS CARLOS VESGA GAMBOA

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:

ASISTENTE

Bogotá, octubre 12 de 2013

Jazmin Prieto Maldonado
Presidente del Congreso

Juan Carlos Soto C.
Junta Directiva Nacional

ORGANIZA



Delegación Nacional de Químicos Farmacéuticos de Colombia

APDYAN





1er. CONGRESO INTERNACIONAL DE
PRODUCTOS FITOFARMACÉUTICOS

Fitoterapéuticos, ingredientes naturales, fitocosméticos y suplementos dietarios
CIENCIA, INNOVACIÓN Y TECNOLOGÍA

EL COLEGIO NACIONAL DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS DE COLOMBIA

CERTIFICA QUE:

LUIS CARLOS VESGA GAMBOA

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

Estudio del mecanismo de acción del aceite esencial de Eucalyptus citriodora sobre el metabolismo energético mitocondrial

Bogotá, octubre 12 de 2013

Jazmín Prieto Maldonado
Presidente del Congreso

Juan Carlos Soto C.
Junta Directiva Nacional

ORGANIZA



Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos de Colombia

APOYAN



