



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**Optimización de insecticidas de uso doméstico:
Activos alternativos a los Piretroides y
Sinergistas en la formulación**

Autor:

Dña. Beatriz Cháfer Dolz

Directores:

Dr. D. José Pedro Cerón Carrasco

Dr. D. Víctor Casaña Giner

Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado

Murcia, 25 de septiembre de 2024



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. José Pedro Cerón Carrasco, el Dr. D. Víctor Casaña Giner y la Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado como Directores¹ de la Tesis Doctoral titulada “Optimización de insecticidas de uso doméstico: Activos alternativos a los Piretroides y Sinergistas en la formulación”, realizada por Dña. Beatriz Chafer Dolz en el Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, **autorizan su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, modificado por el RD 576/2023

Dr. D. José Pedro Cerón Carrasco

Dr. D. Víctor Casaña Giner

Dra. Dña. Estrella Núñez Delicado

¹Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar y firmar todos.

UCAM



EIDUCAM
Escuela Internacional
de Doctorado

Agradecimientos

En primer lugar, quiero hacer una mención a la Universidad Católica de Murcia por facilitar a las empresas la oportunidad de realizar un doctorado industrial poniendo en valor la investigación del sector productivo nacional, así como el desarrollo profesional de su personal cualificado. Mi agradecimiento especial a Estrella que desde el primer día que iniciamos el contacto entre empresa y universidad me tendió su mano para guiarme en un camino desconocido para mí, poniendo todos los recursos necesarios a mi disposición y dedicándome su valioso tiempo siempre que lo he necesitado. Para mí no has sido sólo mi directora de tesis, sino un ejemplo a seguir como científica.

En la UCAM he conocido a grandes profesionales y mejores personas como Baldo, que ha contribuido al desarrollo de esta tesis aportando su experiencia y conocimiento siempre con una sonrisa. Gracias por tu esfuerzo y compromiso.

Siguiendo con grandes personas, tengo que nombrar a mi director de tesis José Pedro que me ha guiado y apoyado en los momentos difíciles. Tu aportación científica a esta tesis ha sido crucial y nos abre las puertas a seguir ampliando líneas de investigación. Gracias de corazón por tu implicación y apoyo.

Sin duda, el desarrollo de esta tesis no habría sido posible sin el soporte de Francisco Aragón S.L.U. y su firme apuesta por la investigación científica como valor fundamental para el crecimiento de la empresa dentro del sector químico. Por ello, no puedo dejar de mencionar a José y Luís Vilanova por su trabajo y empeño en seguir creciendo y por la confianza incondicional que habéis mostrado en mí durante estos años. También os estaré siempre agradecida por haber puesto en mi camino a Víctor, porque no sólo me ha dado la oportunidad de crecer profesionalmente, sino que su bondad y motivación me han permitido disfrutar de mi trabajo. Por todo esto, gracias Víctor por ser mi director de tesis y alentarme a seguir creciendo cada día sin ponerle límites al conocimiento.

Dentro de la gran familia de FA, debo agradecer al equipo humano de I+D todo el cariño recibido en estos años y, en especial al equipo biológico por su dedicación y contribución en el desarrollo experimental de esta tesis. Ana Rosa, Raquel, Antonio y Puri os agradezco de corazón todo el conocimiento que habéis compartido conmigo. No puedo olvidarme de una gran bióloga con la que se inició la cría de insectos en FA. Gracias Míriam por escucharme y

apoyarme cuando lo he necesitado, me siento muy orgullosa de tenerte como amiga.

Me falta dar las gracias a los ejes principales que marcan mi vida y me llenan el corazón de alegría:

A mis padres, por su apoyo incondicional y por ayudarme con entrega plena a conseguir mis metas. Me siento muy dichosa de teneros como padres.

A mis hijos, por ser el motor que mueve mi vida. Espero poder daros ejemplo para que consigáis todo lo que os propongáis en la vida, con esfuerzo y voluntad.

Y, por último, tengo que nombrar a la persona que me animó a emprender este nuevo reto y gracias a la cual cierro un capítulo nuevo en mi vida profesional.

Chema, es un orgullo compartir mi vida contigo y verte conseguir todo lo que te propones dando ejemplo de tenacidad, perseverancia y dedicación a tu familia.

Gracias por ser mi compañero y apoyarme siempre, dándome fuerza, confianza y amor.

*"Nada en la vida debe ser temido, solo comprendido. Ahora es el
momento de comprender más, para temer menos."
Marie Curie.*

Resumen

Esta tesis doctoral se centra en el desarrollo de nuevas estrategias para la identificación de sustancias activas contra la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) con potencial insecticida o sinérgico, como parte de un enfoque industrial. La investigación se enfoca en la aplicación de técnicas avanzadas de cribado virtual (*Virtual Screening*, *VS*) y modelado molecular para identificar alternativas a los piretroides, que son los principales insecticidas neurotóxicos actualmente utilizados. El trabajo se contextualiza dentro del marco regulatorio establecido por el Reglamento de Productos Biocidas (BPR) de la Unión Europea, que exige la búsqueda de soluciones más seguras y efectivas para el control de plagas. El estudio se fundamenta en el análisis de los principales mecanismos de acción de insecticidas actuales, específicamente los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) y la acetilcolinesterasa (AChE), que son dianas críticas para la acción biocida. A partir de bases de datos como DrugBank, que contiene moléculas bioactivas con perfiles farmacológicos conocidos, se ha realizado un cribado exhaustivo mediante métodos computacionales para identificar compuestos con alta afinidad por estas dianas. Se han empleado técnicas de *docking* molecular, utilizando herramientas como Glide y METADOCK 2.0, para predecir la interacción de los compuestos seleccionados con las estructuras biológicas de Na_v y AChE, lo que ha permitido priorizar las moléculas más prometedoras. La validación de las predicciones computacionales se ha llevado a cabo mediante ensayos *in vivo* en *Periplaneta americana*, utilizando una metodología experimental que evalúa tanto la eficacia insecticida como el potencial sinérgico de los compuestos. Los resultados experimentales han demostrado la eficacia de algunas moléculas propuestas como sinérgicos, lo que ha llevado a la solicitud de una patente sobre inhibidores de alfa-glucosidasa con actividad sinérgica insecticida.

En conclusión, la tesis propone una metodología de cribado virtual que permite reducir significativamente los tiempos y costes asociados a la investigación de nuevos insecticidas, facilitando la identificación de compuestos que cumplan con los estrictos requisitos regulatorios actuales. Además, sugiere futuras líneas de investigación, como la integración de modelos multiobjetivo y la exploración de nuevas bases de datos de moléculas, para optimizar la búsqueda de compuestos bioactivos que puedan mejorar las formulaciones insecticidas comerciales.

Palabras clave: Cribado virtual, Docking molecular, Insecticidas, Terpenoides, Piretroides, Periplaneta americana, Sinergia insecticida.

Abstract

This doctoral thesis focuses on the development of new strategies for identifying active substances against the American cockroach (*Periplaneta americana*) with insecticidal or synergistic potential within an industrial framework. The research deals with the application of refined virtual screening (VS) techniques and molecular modeling to identify alternatives to pyrethroids, which are the main neurotoxic insecticides currently in use. The conducted work aims to fulfill the regulatory framework established by the European Union's Biocidal Products Regulation (BPR), which requires the search for safer and more effective pest control solutions. The selected strategy is based on the analysis of the main mechanisms of action of current insecticides, specifically voltage-gated sodium channels (Na_v) and acetylcholinesterase (AChE), which are critical targets for biocidal action. Using databases such as DrugBank, which contains bioactive molecules with known pharmacological profiles, a comprehensive screening has been performed by using computational methods to identify compounds with high affinity for these targets. Molecular docking techniques, such as Glide and METADOCK 2.0, have been implemented to predict the interaction of selected compounds with the biological structures of Na_v and AChE, enabling the prioritization of the most promising molecules. The validation of computational predictions has been carried out through *in vivo* assays in *Periplaneta americana*, using an experimental methodology that evaluates both the insecticidal efficacy and the synergistic potential of the compounds. The experimental results have demonstrated the efficacy of some proposed molecules as synergists, which has led to the filing of a patent on alpha-glucosidase inhibitors with synergistic insecticidal activity.

In conclusion, this thesis proposes a virtual screening methodology that significantly reduces the time and costs associated with the research of new insecticides, facilitating the identification of compounds that meet current strict regulatory requirements. Furthermore, it suggests future lines of research, such as the integration of multi-objective models and the exploration of new molecular databases, to optimize the search for bioactive compounds that could enhance commercial insecticide formulations.

Keywords: Virtual screening, Molecular docking, Insecticides, Terpenoids, Pyrethroids, Periplaneta americana, Insecticide synergy.

Índice

Índice de tablas	xiii
Índice de figuras	xvi
Lista de abreviaturas	xx
Estructura de la tesis	1
1 Introducción	3
1.1 Motivación	3
1.2 Desarrollo de insecticidas de uso doméstico: aplicación en rastreros	8
1.2.1 Los insecticidas de uso doméstico	9
1.2.2 Actividad insecticida en rastreros: los piretroides	21
1.3 Herramientas computacionales de modelado molecular	30
2 Objetivos	35
3 Materiales y Métodos	37
3.1 Virtual screening (VS) para el descubrimiento de biocidas	38
3.2 Metodología computacional propuesta	45
3.3 Determinación toxicológica <i>in vivo</i> sobre <i>Periplaneta americana</i>	56
3.4 Propiedades fisicoquímicas	62
3.4.1 Determinación de la tensión superficial de un líquido	62
3.4.2 Determinación de la densidad de un líquido	69
4 Resultados y Discusión	73
4.1 Validación experimental: Terpenoides y Piretroides	74
4.1.1 Análisis de toxicidad de disolventes	76
4.1.2 Análisis de inhibidores: Terpenoides y Piretroides	80
4.1.3 Cálculo de interacciones: VSSC, AChE y Terpenoides/- Piretroides	90
4.2 Nuevos inhibidores para VSSC	93

4.2.1	Validación de los métodos de cribado virtual para VSSC	94
4.2.2	Aplicación VS a Na_v PaS	95
4.2.3	Ensayos <i>in vivo</i> a actuar sobre Na_v PaS	104
4.3	Nuevos inhibidores para AChE	115
4.3.1	Predicción de la estructura terciaria de AChE	116
4.3.2	Aplicación de VS a AChE de <i>Periplaneta americana</i> . .	117
4.3.3	Ensayos <i>in vivo</i> a actuar sobre AChE de <i>Periplaneta americana</i>	130
5	Conclusiones y Líneas Futuras	137
5.1	Conclusiones	137
5.2	Vías futuras	141
5.3	Publicaciones científicas derivadas de los resultados de la tesis .	143
	Bibliografía	145

Índice de tablas

1.1	Clasificación de los modos de acción de insecticidas.	14
1.2	Insecticidas que actúan sobre canales iónicos.	26
1.3	Propiedades fisicoquímicas de los piretroides.	29
1.4	Efectos toxicológicos de los piretroides en aves, peces y abejas. .	30
3.1	Parámetros metaheurísticos utilizados para METADOCK 2.0. .	54
3.2	Disolventes y tensioactivos para la preparación de productos de ensayo.	57
3.3	Tensión superficial del agua a distintas temperaturas.	69
4.1	Toxicidad de solventes en aplicación tópica sobre <i>P. americana</i> . .	77
4.2	Parámetros fisicoquímicos relevantes de solventes.	78
4.3	Dosis de inhibición en AChE de los compuestos estudiados. . . .	80
4.4	Características fisicoquímicas de los piretroides y piretrinas. . .	81
4.5	Características fisicoquímicas de los terpenoides.	82
4.6	Dosis de terpenoides en el ensayo de aplicación tópica sobre <i>P.</i> <i>americana</i>	84
4.7	Dosis de piretroides y piretrinas en el ensayo de aplicación tópica sobre <i>P. americana</i>	85
4.8	Mortalidad a las 24 horas tras la aplicación del producto de ensayo.	86
4.9	Mortalidad a las 24 horas de Praletrina en etildiglicol y DMF a distintas dosis sobre <i>P. americana</i>	90
4.10	Energías de enlace de terpenoides y piretroides/piretrinas en Na_v y AChE de <i>P. americana</i>	91
4.11	Parámetros seleccionados por HYPERDOCK para los experi- mentos de METADOCK.	98
4.12	Compuestos mejor clasificados por Glide y METADOCK 2.0 con refinamiento MMGBSA.	102
4.13	Ingredientes activos, disolventes y emulsionantes para pruebas <i>in vivo</i>	105
4.14	Composición de soluciones de prueba para modelos de cucarachas.	106

4.15	Ingredientes utilizados en el ensayo <i>in vivo</i> de aplicación tópica.	110
4.16	Composición de soluciones de moléculas inhibidoras de alfa-glucosidasa.	111
4.17	Resultados de tiempos de volteo a 24 h y reducción respecto al control sin Praletrina.	113
4.18	Comparación de tiempos de volteo a 24 h de Miglitol y Acarbosa en disolventes con Praletrina al 0,05 %.	114
4.19	Configuraciones de METADOCK 2.0 etiquetadas de M1 a M4. .	121
4.20	Compuestos mejor clasificados por Schrödinger y METADOCK 2.0 con energía libre de unión refinada.	128
4.21	Identificación de moléculas de estudio propuestas por el modelo de AChE.	130
4.22	Composición de soluciones para el estudio de sinergia.	131
4.23	Composición de soluciones para el estudio de actividad insecticida en <i>P. americana</i>	132
4.24	Tiempos de volteo a 24 h de las moléculas de estudio y sus dosis en <i>P. americana</i>	134

Índice de figuras

1.1	Volumen de ventas anuales de insecticidas en España (2019-2023).	18
1.2	Marcas en grupos empresariales en España.	19
1.3	Distribución de ventas de insecticidas por segmentos en España (2023).	19
1.4	Volumen de ventas del segmento de voladores (2023).	20
1.5	Volumen de ventas del segmento de rastreros (2023).	20
1.6	Inhibición de acetilcolinesterasa por organofosforados y carbamatos.	24
1.7	Mecanismo del canal de sodio activado por voltaje.	25
1.8	Estructura molecular de la Piretrina I y II.	27
1.9	Ejemplos de moléculas de piretroides comerciales.	28
3.1	Desarrollo para la aprobación y comercialización de una sustancia biocida en Europa.	39
3.2	Estructura experimental del canal Na_v de <i>P. americana</i> con bloqueadores de poros TTX.	48
3.3	Superposición de los modelos generados para la diana AChE. . .	51
3.4	Estrategia de virtual screening para el canal de sodio en <i>P. americana</i>	52
3.5	Proceso de aplicación tópica en el tórax ventral de <i>P. americana</i> . .	58
3.6	Estructura molecular de los terpenoides del estudio experimental. .	60
3.7	Estructura molecular de los piretroides utilizados en el ensayo de validación.	61
3.8	Estructura molecular de las piretrinas utilizadas en el ensayo de validación.	62
3.9	Configuración del equipo de medida para el <i>Pendant drop method</i> . .	63
3.10	Derivación del ajuste Young-Laplace en una gota colgante. . . .	64
3.11	Ejemplo de ajuste de líneas a la forma de la gota en el <i>Pendant drop method</i>	67
4.1	Distribución de agua y etanol en la zona ventral de <i>P. americana</i> . .	79

4.2	Mortalidad a las 24 h del Eucaliptol según la dosis de aplicación.	87
4.3	KD en minutos de las sustancias de estudio a distintas dosis. . .	88
4.4	Toxicidad, medida por tiempo de volteo, del Eucaliptol a distintas dosis.	88
4.5	KD en minutos de piretroides y piretrinas a distintas dosis. . . .	89
4.6	Estructura Na_v PaS de <i>P. americana</i> con sodio, TTX y piretroides.	92
4.7	Comparación del inhibidor experimental de terpenoides en Na_v PaS con TTX.	92
4.8	Comparación de terpenoides y piretroides para AChE en <i>P. americana</i>	93
4.9	Superposición de estructuras de TTX y poses predichas para piretroides en Na_v PaS.	96
4.10	Resultados de METADOCK 2.0 y re-evaluación con MMGBSA para Na_v PaS.	100
4.11	Resultados <i>in vivo</i> tras la aplicación de mezclas: KD, porcentaje de cucarachas volteadas y mortalidad a 24 horas.	108
4.12	Estructura molecular de inhibidores de alfa-glucosidasa propuestos para ensayo <i>in vivo</i>	110
4.13	Tiempo de KD en minutos para las soluciones de inhibidores de alfa-glucosidasa.	112
4.14	Comparación del tiempo de KD de Miglitol y Acarbosa en DMF y DMSO con 0,05 % Praletrina.	114
4.15	Diagrama de dispersión de puntuaciones de afinidad de unión de compuestos contra dos estructuras receptoras.	118
4.16	Compensaciones entre tiempo de ejecución y precisión para diferentes metaheurísticas en el cribado de compuestos de DrugBank.	123
4.17	Comparativa de METADOCK 2.0 y Schrödinger Glide con visualización de poses de acoplamiento.	125
4.18	Diagrama de dispersión de diferencias en re-puntuación MMGBSA para poses de acoplamiento de METADOCK 2.0.	127
4.19	Tiempo de volteo (KD) en minutos para las moléculas de la Tabla 4.21 con praletrina.	133
4.20	Comparación de tiempos de volteo (KD) en minutos para Tetra-caina y Quinina con permetrina y praletrina.	134
4.21	Estructura molecular candidatos ACHE.	135
4.22	Porcentaje de la población total de cucarachas que han muerto después de 24 horas, para las soluciones de estudio de la Tabla 4.21.	135

Lista de abreviaturas

AChE: Enzima acetilcolinesterasa

VSSC: Canales de sodio dependientes de voltaje

BPR: Reglamento de Productos Biocidas

UE: Unión Europea

VS: Cribado virtual

DB: DrugBank

FA: Francisco Aragón S.L.U.

Nav: sodio dependiente de voltaje

Kv: potasio dependiente de voltaje

OMS: Organización Mundial de la Salud

TP: Tipo de producto

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

OP: Organofosforado

TEPP: Tetraetilpirofosfato

MC: Metilcarbamato

MdA: Modo de acción

IRAC: Comité de Acción contra la Resistencia a Insecticidas

GABA: ácido y aminobutírico

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina

CoA: Coenzima A

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

PDB: Protein Data Bank

TTX: Tetrodotoxina

STX: Saxitoxina

DT: Tiempo de degradación

MD: Dinámica molecular

DFT: Teoría del funcional de la densidad

MP2: Teoría del segundo orden de Møller-Plesse

QSAR: Relación Cuantitativa Estructura-Actividad

ECHA: Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

cryo-EM: Criomicroscopía electrónica

IA: Inteligencia artificial

CASP: Evaluación Crítica de la Predicción de la Estructura de Proteínas

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

HTVS: Detección virtual de alto rendimiento

SP: Precisión estándar

XP: Precisión extra

CPU: Unidad central de procesamiento

GA: Algoritmos Genéticos

GS: Búsqueda Greedy

SS: Búsqueda Scatter

MMGBSA: Mecánica Molecular de Superficie Generalizada de Born

SFT: Tensión superficial

IFT: Tensión interfacial

MMB: 3-Metoxi-3-Metil-1-Butanol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMF: Dimetilformamida

DPM: Dipropilen glicol mono metil eter

TPM: Tripropilen glicol mono metil eter

IC50: Concentración inhibitoria media

KD: Volteo

NavPaS: Estructura del canal de Nav de Periplaneta americana

RMSD: Desviación cuadrática media

GPU: Unidad de Procesamientos Gráficos

IQR: Rango intercuartílico

Estructura de la tesis

Con el objetivo de orientar al lector, se describe brevemente el contenido de esta tesis doctoral desglosada en los siguientes capítulos:

- *Capítulo 1: Introducción.* El objetivo de este capítulo es el de ilustrar al lector sobre la motivación de esta tesis en el contexto industrial, así como las soluciones que ofrecen las nuevas tecnologías. Asimismo se trata de contextualizar al lector sobre los insecticidas de uso doméstico dentro del marco regulatorio actual y la situación del mercado de biocidas en Europa y su evolución histórica. También se describen los mecanismos de acción de los insecticidas conocidos y se detallan las características y funcionamiento de los piretroides, utilizados en la actualidad para insectos rastreros. También se introduce al lector en las herramientas computacionales existentes en el modelado computacional y la importancia de su utilización en esta tesis.
- *Capítulo 2: Objetivos.* En este capítulo se enumeran los objetivos a alcanzar en esta tesis doctoral.
- *Capítulo 3: Materiales y Métodos.* En este capítulo se describen los métodos computacionales utilizados para predecir la interacción proteína-ligando sobre el VSSC y la AChE de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*). También se describe la metodología experimental *in vivo* sobre *Periplaneta americana* para determinar la eficacia insecticida y la sinergia con piretroides, así como la determinación de algunos parámetros fisicoquímicos de caracterización de los líquidos de estudio.

- *Capítulo 4: Resultados y Discusión.* En este capítulo se presentan los resultados obtenidos y su discusión distribuidos en tres secciones.

Una primera sección (4.1) en la que se utilizan algunas sustancias de terpenoides sintéticos con inhibición sobre AChE descrita en la literatura científica y sustancias piretroides utilizadas comercialmente como moduladores de voltaje en el canal de sodio, con el objetivo de validar los métodos experimentales para cucaracha americana. Se obtienen resultados de toxicidad de las sustancias mediante técnicas *in vivo* y se comparan con las energías de enlace en las estructuras moleculares de AChE y VSSC, obtenidas mediante técnicas *in silico*.

Una segunda sección (4.2) en la que se presentan los resultados de una selección *in silico* e *in vivo* de la base de datos de medicamentos (DrugBank) para detectar nuevos sinergistas potenciales de VSSC contra la cucaracha americana (*Periplaneta americana*), reduciendo así la dosis de sustancias piretroides utilizadas en los insecticidas comerciales. Se presentan los resultados de VS implementados en Glide y METADOCK 2.0, perfeccionados posteriormente mediante un refinamiento de los datos. Las sustancias más prometedoras se ensayan con un método *in vivo* desarrollado para cucaracha americana (*Periplaneta americana*).

Y, una tercera sección (4.3), en la que se presentan los resultados de una selección *in silico* e *in vivo* de la base de datos de Medicamentos (DrugBank) para detectar nuevos sinergistas potenciales de AChE contra la cucaracha americana (*Periplaneta americana*), reduciendo así la dosis de sustancias piretroides utilizadas en los insecticidas comerciales. Se presentan los resultados de modelado molecular de la estructura de la proteína utilizando Alphafold como modelo de inteligencia artificial fren-

te al modelo de homología tradicional. Las sustancias más prometedoras se ensayan con el método *in vivo* desarrollado para cucaracha americana (*Periplaneta americana*).

- *Capítulo 5: Conclusiones y Líneas Futuras.* Por último, se concluye esta tesis doctoral además de las posibles vías futuras.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Motivación

Los insecticidas son las principales herramientas para eliminar las plagas causadas por insectos en cultivos, ganado, mascotas y seres humanos. La mayoría de los insecticidas utilizados para combatir estas plagas son venenos que actúan sobre el sistema nervioso central de los insectos (neurotóxicos), inhibiendo enzimas relevantes como la acetilcolinesterasa (AChE) y los canales de sodio dependientes de voltaje [1]. Entre ellos destacan los piretroides, la familia de moléculas más utilizada en las formulaciones de insecticidas comerciales para uso doméstico. Sus características estructurales y propiedades físicas les confieren una elevada eficacia y selectividad hacia determinadas especies de insectos [2], actuando, principalmente sobre los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v), usualmente definidos como VSSC por sus siglas

en inglés (*Voltage-Sensitive Sodium Channels*) [3].

Sin embargo, la entrada en vigor del Reglamento de Productos Biocidas (*Biocidal Products Regulation, BPR*) de la Unión Europea (UE) el 1 de septiembre de 2013 supuso la creación de un marco regulatorio integral para el mercado de biocidas en Europa. Este reglamento tiene como objetivo principal garantizar una protección reforzada para la salud humana y el medio ambiente. Su función es regular estrictamente la comercialización y el uso de productos biocidas, que son utilizados para salvaguardar a las personas, animales, materiales y artículos contra organismos nocivos, como plagas y bacterias, mediante la acción de sustancias activas contenidas en dichos productos [4].

Desde la implementación del BPR, todas las sustancias activas empleadas en productos biocidas deben ser aprobadas, y específicamente, los insecticidas comercializados deben ser autorizados y contener únicamente sustancias activas que hayan recibido dicha aprobación. Durante el proceso de aprobación, se lleva a cabo una evaluación exhaustiva de los riesgos toxicológicos asociados a cada sustancia, tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Este riguroso escrutinio ha resultado en la eliminación de varias sustancias piretroides previamente utilizadas en formulaciones de insecticidas domésticos, tales como *Empertrina*, *Esbiotrina* y *D-Aletrina* [5]. Esta situación plantea la necesidad urgente de la industria de biocidas de desarrollar nuevas sustancias activas alternativas a los piretroides.

En este contexto, en los últimos años ha aumentado significativamente el interés en la UE por los bioinsecticidas, que se basan en aceites esenciales de plantas o mezclas de terpenoides sintéticos. Este tipo de formulaciones ha sido

utilizado durante más de una década en Estados Unidos, donde la regulación permitió la aplicación de ciertos aceites esenciales básicos, reduciendo los tiempos y costes de autorización en comparación con los biocidas convencionales [6]. Diversos estudios de toxicidad han demostrado la eficacia de los bioinsecticidas en diferentes especies de insectos [7]. Las distintas estructuras químicas de los terpenoides presentes en los aceites esenciales sugieren que estos compuestos pueden afectar simultáneamente múltiples sitios activos y mecanismos de acción, incluyendo la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE)[8].

Sin embargo, la adaptación al nuevo marco establecido por el BPR requiere una búsqueda exhaustiva de alternativas de compuestos insecticidas. El cribado virtual (*Virtual Screening, VS*) es una técnica computacional que permite la identificación de nuevos compuestos bioactivos mediante el análisis y la comparación de grandes bibliotecas de moléculas [9]. Esta técnica se ha convertido en una herramienta esencial en el diseño de nuevos insecticidas, ya que permite predecir la actividad biológica y toxicidad potencial de las moléculas antes de su síntesis y pruebas experimentales. Utilizando métodos de cribado virtual, se pueden identificar compuestos que tengan perfiles de actividad deseados y que sean compatibles con los estrictos requisitos de seguridad y eficacia impuestos por el BPR. La integración de VS en el desarrollo de nuevos insecticidas puede acelerar el proceso de descubrimiento a la vez que reduce significativamente los costos y recursos necesarios, facilitando la adaptación de la industria a las nuevas regulaciones y promoviendo la innovación en la creación de productos más seguros y efectivos.

Existen diferentes métodos de VS que se han utilizado en la literatura. Por ejemplo, los métodos de *docking* [10, 11, 12] permiten modelar la interacción

entre dos sustancias, típicamente una molécula pequeña (conocida como ligando) y una proteína objetivo (receptor), para predecir la afinidad y el modo de unión de las moléculas. A pesar de que estos métodos son especialmente útiles para identificar compuestos que puedan unirse de manera eficaz a sitios activos específicos de enzimas o proteínas, como la AChE o el VSSC. Para predecir el acoplamiento de la molécula en el sitio activo existen varias aplicaciones que realizan simulaciones en la superficie de la proteína, como es el caso de AutoDock [10], Glide [13], BUDE [14] o DOCK [15], que realizan una búsqueda en una sitio de unión específico. Herramientas alternativas como BINDSURF [11] o METADOCK [16] [12] realizan el llamado régimen de “acoplamiento ciego” (*Blind Docking*), es decir, una búsqueda no condicionada en toda la superficie de la proteína dividiéndola de forma arbitraria en regiones (o puntos) independientes.

Los métodos de dinámica molecular, sin embargo, proporcionan una visión más detallada de las interacciones moleculares al simular el comportamiento de las moléculas en el tiempo bajo condiciones fisiológicas [17, 18]. Estos métodos permiten estudiar la estabilidad y conformación de los complejos molécula-proteína, proporcionando información valiosa sobre los mecanismos de acción y posibles efectos adversos. Además, las técnicas de VS basadas en *machine learning* y *deep learning* han emergido recientemente, utilizando grandes conjuntos de datos y algoritmos avanzados para predecir la actividad biológica de nuevas moléculas con alta precisión. En este escenario, cabe destacar AlphaFold [19, 20], un método basado en redes neuronales profundas que permite predecir la estructura tridimensional de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos con una precisión sin precedentes. Esta capacidad de

predecir estructuras proteicas facilita enormemente la identificación de nuevos sitios activos y potenciales dianas moleculares para el diseño de insecticidas más eficaces y seguros.

Sin lugar a dudas, la combinación de estos enfoques permite un cribado más eficiente y exhaustivo, facilitando la identificación de compuestos candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos insecticidas. Con la ayuda de estas técnicas computacionales, es posible explorar grandes bases de datos de sustancias químicas que, hasta el momento, no se han utilizado con fines insecticidas. Por ejemplo, la base de datos de medicamentos (DrugBank) [21] puede ser analizada para determinar la interacción de sus compuestos con los VSSC o como inhibidores de AChE. El VS de extensas bases de datos permite reducir significativamente los ensayos *in vivo* necesarios para determinar la eficacia insecticida o sinergista de las sustancias, lo cual minimiza considerablemente los tiempos y costes de investigación, aumentando de esta manera las probabilidades de éxito en la identificación de nuevos insecticidas efectivos y seguros.

En esta tesis doctoral se investiga la aplicación de métodos emergentes de VS y modelado molecular para identificar sustancias alternativas a los piretroides. Estas sustancias pueden ser potenciales candidatas para reemplazar los piretroides existentes (búsqueda de nuevos insecticidas) o para complementarlos (búsqueda de nuevos sinergistas), cumpliendo con la normativa BPR. Teniendo en cuenta esta premisa, el enfoque principal de la tesis se centra en el modelo insecticida de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*). La motivación es su gran resistencia y capacidad de adaptación, lo que la convierte en una de las principales especies de cucarachas domésticas en América del Norte

y Europa consideradas invasoras [22]. La eliminación efectiva de esta especie no solo mejora la higiene y la salud pública, sino que también previene la propagación de enfermedades a través de productos agrícolas y reduce los daños estructurales en edificios, subrayando así la importancia crítica de desarrollar nuevos insecticidas y sinergistas para su control [23].

Finalmente, cabe destacar que esta tesis doctoral se enmarca dentro del Doctorado Industrial de la empresa Francisco Aragón S.L.U. (en adelante FA), líder nacional en la fabricación y comercialización de productos insecticidas para el hogar. Esta colaboración refleja el compromiso de FA con la investigación y la innovación, buscando ofrecer productos sostenibles que mejoren su competitividad en el mercado global de insecticidas. Las instalaciones de FA, ubicadas en Molina de Segura (Murcia), cuentan con el equipamiento necesario para la cría de insectos rastreros y la evaluación de la eficacia y sinergia en cucarachas, utilizando ensayos *in vivo* de aplicación tópica.

1.2 Desarrollo de insecticidas de uso doméstico: aplicación en rastreros

Este apartado se centra en la evolución histórica de los insecticidas de uso doméstico dentro del marco regulatorio actual y la situación del mercado de insecticidas en Europa, así como la posición que ocupa FA dentro del mercado nacional. Se describen los distintos mecanismos de acción de los insecticidas conocidos y se detallan las características y funcionamiento de los piretroides, utilizados en la actualidad para el caso particular de insectos rastreros.

1.2.1 Los insecticidas de uso doméstico

Un biocida es una sustancia activa que se utiliza para proteger la salud humana y el medio ambiente del efecto dañino de determinados organismos como plagas de insectos, algas, hongos y bacterias. Los biocidas tienen multitud de aplicaciones en sectores industriales y domésticos muy variados, desde productos desinfectantes utilizados en el hogar, conservantes de tintas o líquidos industriales, hasta productos rodenticidas usados para el control de roedores; y productos insecticidas para el control de plagas de insectos domésticos.

El aumento continuo de la población mundial está provocando importantes cambios en los ecosistemas, el clima y el comportamiento humano, lo que favorece el desarrollo de plagas urbanas. Debido a la rápida expansión urbana, los suburbios de nuestras ciudades se están convirtiendo en hábitats naturales de garrapatas, roedores y otras plagas. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su publicación sobre la importancia de las plagas urbanas en la salud pública [22], realiza una exhaustiva revisión de las enfermedades transmitidas por insectos como cucarachas, ácaros del polvo, chinches, pulgas, hormigas, moscas, pájaros, piojos, garrapatas, mosquitos y roedores.

Esta tesis se basa en el estudio de insecticidas para el tratamiento de estas plagas urbanas, en concreto, las relacionadas con las cucarachas. Los productos insecticidas de uso doméstico se usan habitualmente para erradicar estas plagas, lo que provoca la exposición de las personas y el medio ambiente a sustancias biocidas. Estos productos son aplicados en los hogares por usuarios no profesionales que pueden leer o no, la etiqueta de un producto, lo que

suele desembocar en dosis de aplicación elevadas que aumentan la resistencia al insecticida en muchos casos, así como la exposición innecesaria de estos residuos biocidas, que ha motivado la actualización de la legislación. El 1 de septiembre de 2013 entra en vigor el Reglamento (UE) n.º 528/2012, también conocido como Reglamento de Biocidas (BPR), con el objetivo de mejorar el funcionamiento del mercado de biocidas en la UE y garantizar un alto nivel de protección para las personas y el medio ambiente. Tal como se indica en el anexo V de BPR, los biocidas están divididos en 22 tipos de productos basados en su uso y se clasifican en cuatro grandes grupos.

- Grupo 1.– Desinfectantes: compuestos destinados a eliminar microorganismos o patógenos perjudiciales para la salud.
- Grupo 2.– Conservantes: compuestos destinados a prevenir el crecimiento de microorganismos y algas, considerados nocivos, en productos que no sean alimentos, piensos, productos cosméticos o medicinales, ni productos sanitarios.
- Grupo 3.– Plaguicidas: compuestos destinados al control de plagas de animales por medios distintos de repulsión o atracción, así como los que actúan mediante estos dos métodos, incluidos los que se utilizan para la higiene veterinaria o humana, ya sea directamente sobre la piel o indirectamente en el entorno de las personas o animales. Dentro de este grupo, clasificados como tipo de producto (TP) 18, se incluyen insecticidas, acaricidas y productos para controlar otros artrópodos por medios distintos de la repulsión o la atracción.
- Grupo 4.– Otros biocidas: compuestos antiincrustantes y líquidos para embalsamamiento y taxidermia.

Según esta clasificación, los insecticidas son un tipo específico de plaguicida diseñado para el control de insectos y pueden actuar sobre el sistema nervioso, el metabolismo o la reproducción de los insectos, lo que resulta en su eliminación o control efectivo. El uso de insecticidas para controlar plagas de insectos se remonta a hace miles de años. A lo largo de la historia, las civilizaciones han desarrollado diferentes métodos y compuestos para combatir las plagas y proteger así los cultivos. Por ejemplo, se ha documentado la utilización de azufre inorgánico como arma química desde el año 1000 a.C., arsénico desde el 900 d.C. y, más tarde, arseniato de plomo, criolita y ácido bórico [24]. Posteriormente, la botánica introdujo compuestos químicos extraídos de plantas con un importante potencial insecticida y elevada selectividad, sin embargo, su disponibilidad era limitada y, por lo general, demasiado caros y fotolábiles para lograr un gran impacto. Los más destacados fueron piretro y nicotina. A finales del siglo XIX y principios del XX se descubrieron otros compuestos como el DDT (diclorodifeniltricloroetano) y los OP (organofosforados), lo que condujo en 10 años al TEPP (tetraetilpirofosfato) y al paratión, así como al reconocimiento de que muchos OP tenían propiedades únicas y útiles para la protección de las plantas. En la década de los 40 también se originaron los insecticidas de MC (metilcarbamato). En las décadas siguientes, el DDT fue uno de los insecticidas más utilizados en la Segunda Guerra Mundial, por su eficacia para controlar insectos transmisores de enfermedades como la malaria y el tifus. Sin embargo, con el tiempo, se descubrieron sus efectos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente, lo que llevó a su prohibición en muchos países [25].

En 1924, Laforge y Barthel [26], consiguieron definir las estructuras correc-

tas de las piretrinas I y II contenidas en los extractos naturales de piretro y poco después se identificó la configuración absoluta de su fracción ácida por Crombie y Harper en 1954 [27] para la piretrina I y por Inouye y Ohno en 1955 [28] para la piretrina II. Finalmente, la configuración absoluta de la fracción alcohólica fue encontrada por Katsuda en 1958 [29]. Desde entonces, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de moléculas insecticidas a partir de modificaciones estructurales de las piretrinas naturales. Estos derivados, denominados piretroides sintéticos se han utilizado, no sólo para el control de plagas de insectos domésticos, sino también para uso agrícola siendo más eficaces, económicos y estables que las piretrinas naturales originales.

Hasta finales de la década de los 50 se consideraba que los plaguicidas representaban pocos o ningún riesgo a largo plazo para la salud y el medio ambiente. Sin embargo, el rápido aumento del uso de insecticidas orgánicos durante las décadas de 1940 y 1950, despertó la preocupación pública por su seguridad. Desde entonces, se ha avanzado en el desarrollo de insecticidas más selectivos y de baja toxicidad, así como en el uso de enfoques integrados de control de plagas que combinan métodos biológicos, culturales y químicos. De hecho, el número de compuestos sintéticos preparados por producto comercial ha aumentado de 2.000 productos químicos hace 50 años a más de 20.000 en la actualidad [25]. Sin embargo, el proceso de descubrimiento de moléculas insecticidas se ha ralentizado en la última década debido principalmente a los riesgos que su uso implica. La investigación de insecticidas no solo ayudan a combatir las plagas, sino que son la base de la toxicología ambiental al aportar conocimiento sobre la selectividad de los compuestos activos en los insectos diana. Debido a esta necesidad de generar insecticidas más seguros,

se ha profundizado más en la investigación fundamental para comprender los mecanismos moleculares.

Los principios activos utilizados para el desarrollo de insecticidas pueden clasificarse atendiendo a su modo de acción (MdA), tal como indica la IRAC (*Insecticide Resistance Action Committee*) España en su actualización de enero del año 2022. Esta clasificación, que se muestra en la Tabla 1.1, incluye los grupos y las materias activas utilizadas en nuestro país según las funciones fisiológicas a las que afectan, para comprender mejor la sintomatología, la rapidez de acción y otras propiedades de los insecticidas. De todos los grupos que aparecen enumerados en esta clasificación existen evidencias científicas que los relacionan con un mecanismo de acción específico.

La mayoría de los insecticidas actuales presentan actividad neurotóxica, ya que el sistema nervioso tiene, al menos, 11 dianas o modos de acción definidos para ello. La primera generación de insecticidas neurotóxicos se inicia con el descubrimiento del antes citado DDT, descubierto en 1948 por Müller, quien recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por demostrar su actividad como insecticida usado en el control de la malaria y la fiebre amarilla, entre otros [30]. Los piretroides, que continúan utilizándose en la actualidad, actúan del mismo modo que el DDT sobre el canal de sodio dependiente de voltaje (Na_v), interrumpiendo el paso de iones sodio a través de la membrana celular [31]. Con el tiempo, la resistencia generada por los insectos ha propiciado la búsqueda de nuevos mecanismos de acción relacionados con el sistema nervioso central. Los receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA) desempeñan un papel central en la neurotransmisión inhibitoria rápida en los insectos. La Abamectina y sus análogos surgieron como antagonistas de GABA en el canal

Tabla 1.1: Clasificación de los modos de acción (MdA) de las sustancias insecticidas conocidas, de acuerdo a su respuesta fisiológica demostrada en insectos.

Función fisiológica	Grupo	MdA	Sustancias
Sistema nervioso y muscular	1	Inhibidores de AChE	Carbamatos y Organofosforados
	3	Moduladores del canal de Na^+	Piretroides y Piretrinas
	4	Moduladores competitivos del receptor nicotínico de acetilcolina	Neonicotinoides, Sulfoxiaminas y Butenolides
	5	Moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina, sitio I	Spinosines
	6	Moduladores alostéricos del canal de Cl^- dependiente de glutamato	Avermectinas y Milbemicinas
	22	Bloqueantes del canal de Na_v	Oxadiazinas y Semicarbazonas
	28	Moduladores del receptor de rianodina	Diamidas
	29	Moduladores de los órganos cordotonaes, sin punto de acción definido	Flonicamid
Regulación del crecimiento y desarrollo	7	Miméticos de la hormona juvenil	Fenoxicarb y Piriproxifen
	10	Inhibidores del crecimiento de ácaros	Clofentezín, Hexitiazox y Etoxazol
	15	Inhibidores de la biosíntesis de quitina	Benzoilureas
	16	Inhibidores de la biosíntesis de quitina tipo 1	Buprofezín
	18	Agonistas del receptor de ecdisoma (hormona de la muda)	
	23	Inhibidores de la enzima acetil CoA carboxilasa	Derivados de los ácidos tetrónico y tetrámico
Sistema digestivo	11	Disruptores microbianos de las membranas digestivas de insectos	
	31	Baculovirus	
Sistema respiratorio	20	Inhibidores del transporte de electrones en el complejo mitocondrial III	Acequinocil y Bifenazato
	21	Inhibidores del transporte de electrones en el complejo mitocondrial I	Fenazaquín, Fenpiroximato, Piridabén, Tebufenpirad
	24	Inhibidores del transporte de electrones en el complejo mitocondrial VI	Fosfuros
	25	Inhibidores del transporte de electrones en el complejo mitocondrial II	Derivados del beta-Cetonitrilo
Desconocido o no específico	UN	Compuestos	Azaridactín y Azufre
	UNE	Extractos y aceites	Aceites crudos, mezcla de terpenoides y sales potásicas de ácidos grasos vegetales
	UNF	Hongos entomopatógenos	
	UNM	Disruptores mecánicos	

de cloruro [32]. Otro de los mecanismos neuroactivos más significativos es la acción sobre el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) que es esencial para la comunicación entre células nerviosas y musculares [1]. Así surgieron los compuestos de cloronicotinilo o nicotinoides sintéticos que actúan en el insecto en el mismo lugar que la nicotina, pero con mucha mayor eficacia y seguridad. La acetilcolinesterasa (AChE) es la enzima responsable de hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis nerviosa. Si esta hidrólisis no tiene lugar, se produce una acumulación de acetilcolina que provoca la acción repetida de las neuronas y, en consecuencia, la muerte por agotamiento [33]. Los organofosforados y metilcarbamatos actúan según este modo de acción y han sido muy utilizados en el control de plagas agrícolas durante años.

Además de los antes citados, se han estudiado otros mecanismos neuroactivos, como el receptor de glutamato en la unión neuromuscular de los insectos y el receptor de octopamina pero, los compuestos resultantes se han descartado debido a su toxicología adversa. Más allá de los neurotóxicos, se han desarrollado otros compuestos con mecanismo de acción diferentes. Es el caso de los compuestos que alteran la respiración, como la rotenona cuyo objetivo es la NADH-ubiquinona oxidorreductasa. Sin embargo, este mecanismo de acción presenta alta toxicidad a los peces y a otras especies no objetivo. Existen otros tipos de insecticidas que actúan como reguladores del crecimiento y están inspirados en hormonas juveniles naturales de insectos. Entre los más utilizados en mercados especializados se encuentran el fenoxicarb y piriproxifen aunque su acción es lenta ya que requiere de una serie de etapas sensibles en el ciclo de vida del insecto. Las feromonas y otros atrayentes desempeñan un papel importante en el seguimiento y la manipulación del comportamiento de los insectos a

niveles extremadamente bajos sin residuos químicos tóxicos; son componentes importantes de los programas de control de plagas que generalmente también requieren un insecticida químico.[25].

La toxicidad no selectiva de las sustancias desarrolladas a partir de la investigación de estos mecanismos moleculares en insectos, ha propiciado el uso masivo de unos pocos insecticidas altamente eficaces para el control de plagas. Esto conduce, a menudo, a una resistencia a los insecticidas, por lo que los fabricantes se ven obligados a invertir en investigación para descubrir nuevas sustancias biocidas que actúen eficazmente sobre los insectos o que desarrollen un efecto sinérgico con los insecticidas actuales, potenciando la sensibilidad sobre el insecto objetivo. Por otra parte, los consumidores buscan, cada vez más, soluciones específicas y efectivas en función de la plaga de insecto a tratar. Sin embargo, la creciente preocupación por el medio ambiente hace que, cada vez más, el consumidor busque productos con un mínimo impacto ambiental.

La UE establece las normas para la comercialización y el uso de productos biocidas en el territorio de la UE a través de BPR. Esto incluye productos destinados a su uso en áreas industriales, domésticas, de salud pública y veterinarias. Antes de que un producto biocida pueda ser comercializado y utilizado, debe obtener una autorización previa. El proceso de autorización implica una evaluación exhaustiva de los riesgos y beneficios del producto, así como de su eficacia para controlar los organismos objetivo y los efectos sobre la salud humana y el medio ambiente. Cada tipo de producto (TP) definido en este Reglamento se clasifica en una categoría y se somete a requisitos específicos de autorización. Solo se permite la comercialización de productos que contengan sustancias activas aprobadas y que cumplan con los criterios

de seguridad y eficacia establecidos. Además, a partir del 1 de septiembre de 2015, un biocida compuesto por una sustancia relevante, o que la contenga o genere, no podrá comercializarse en la UE si el proveedor de la sustancia o del producto no está incluido en la lista correspondiente al tipo de producto al cual pertenece. En el listado del artículo 95 de BPR se incluyen las sustancias activas que han superado los estudios toxicológicos, ecotoxicológicos y ambientales requeridos para ello. De esta manera, las combinaciones de sustancias activas efectivas para cada familia de insectos se reducen considerablemente y la ventaja competitiva de las empresas del sector es prácticamente nula. Los fabricantes y comercializadores de productos biocidas tienen la responsabilidad de garantizar el uso seguro de estos productos. Esto incluye proporcionar instrucciones claras de uso, precauciones de seguridad y etiquetado adecuado en el envase del producto.

El BPR promueve el intercambio de información y la cooperación entre los Estados miembros de la UE y establece un proceso de reconocimiento mutuo para la autorización de productos biocidas en los diferentes países de la UE. Los Estados miembros tienen la responsabilidad de garantizar la vigilancia y el cumplimiento de las disposiciones del BPR mediante la inspección de productos en el mercado, el control de calidad y la toma de medidas correctivas en caso de incumplimiento.

El mercado internacional de insecticidas está muy consolidado, con productores especializados que poseen la mayoría de la cuota de mercado: Syngenta AG, Bayer Crop Science, FMC Corporation, ADAMA Agricultural Solutions Ltd. y BASF SE son las principales compañías. El alto coste asociado al desarrollo de moléculas insecticidas es una barrera en el mercado y es probable que

las grandes empresas hagan esfuerzos para que el mercado esté más consolidado en el futuro. A nivel nacional, en el mercado español, FA realizó un estudio con datos recogidos del portal de ventas Nielsen de productos insecticidas. Los resultados del estudio reflejaron un crecimiento ininterrumpido de las ventas de productos insecticidas en el mercado español, tal como se puede observar en el gráfico de la Figura 1.1.

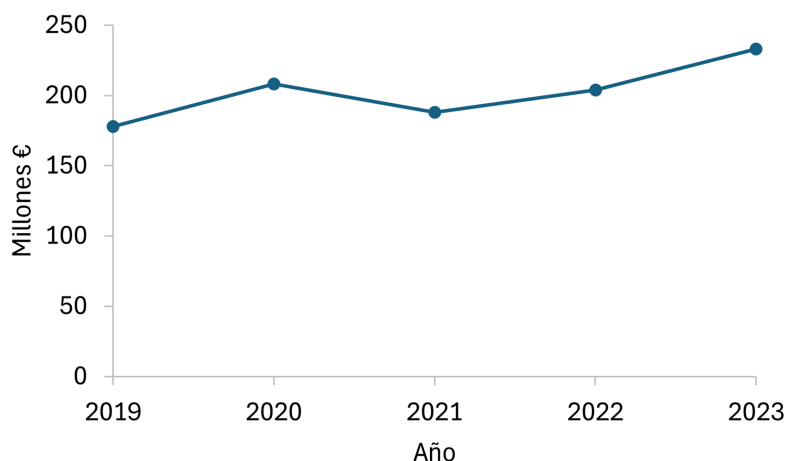


Figura 1.1: Volumen de ventas anuales (millones de €) de productos insecticidas en España en el periodo 2019-2023.

Analizando la cuota de mercado español por marca, FA dentro del grupo empresarial Smart Control Corp, lidera el mercado con una cuota del 43% en volumen de ventas. El resto de los grupos empresariales presentes en España son scJohnson, Henkel y Zelnova, las marcas de sus productos insecticidas se describen en la Figura 1.2.



Figura 1.2: Marcas incluidas en los grupos empresariales presentes en España.

La distribución de ventas de insecticidas en 2023 en España por segmentos (Figura 1.3) indica que el conjunto de insectos voladores presenta el mayor peso, con más del 60 % de las ventas nacionales, seguido por los insectos rastreros.

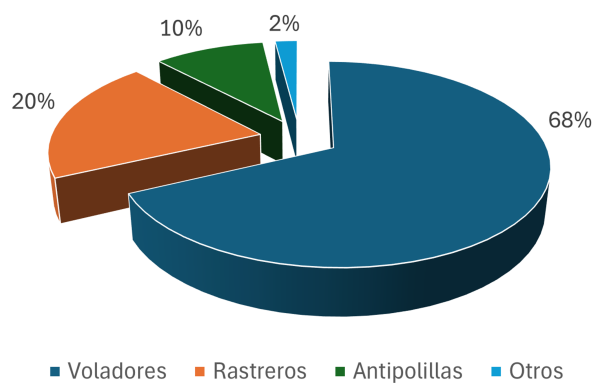


Figura 1.3: Distribución de ventas de insecticidas en 2023 en España por segmentos.

Cabe destacar la amplia gama de tipos de aplicaciones para insectos voladores (aerosoles, difusores eléctricos, velas, espirales, etc.), donde la volatilidad del producto es importante para alcanzar tamaños de gota muy reducidos que consigan impactar sobre insectos de pequeño tamaño en continuo movimiento.

El aerosol fue el formato con mayor volumen de ventas en 2019 para el segmento de voladores, seguido del difusor eléctrico (Figura 1.4).

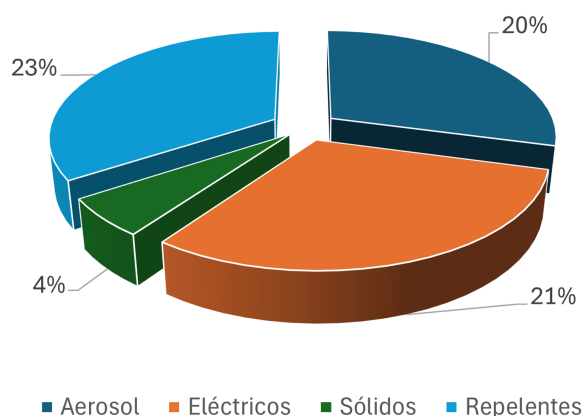


Figura 1.4: Volumen de ventas en 2023 para el segmento de voladores.

En el caso de los productos destinados a insectos rastreros, las aplicaciones más comunes son el aerosol, el líquido en *spray* y el producto en forma de trampas que contienen un cebo insecticida y actúa por ingestión. Al igual que en voladores, el formato en aerosol ocupó el mayor volumen de ventas en 2023, seguido de las trampas (Figura 1.5).

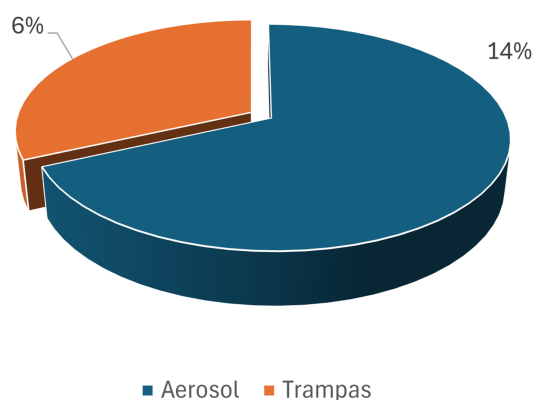


Figura 1.5: Volumen de ventas en 2023 para el segmento de rastreros.

La presencia relevante de FA en el mercado español de insecticidas motiva la inversión en investigación para el descubrimiento de nuevas sustancias activas que puedan suponer una alternativa a los insecticidas comerciales actuales, o bien que potencien la sensibilidad de las sustancias permitidas hasta la fecha, reduciendo así la resistencia generada por muchos de los piretroides utilizados en formulaciones de uso doméstico. Asimismo, el desarrollo de alternativas insecticidas con menor impacto en el medio ambiente y la salud humana permite consolidar a FA como una empresa española líder en la fabricación y comercialización de insecticidas, comprometida con el desarrollo sostenible.

1.2.2 Actividad insecticida en rastreros: los piretroides

Para desarrollar un insecticida de uso doméstico es clave conocer el modo de aplicación, el insecto diana y sus mecanismos biológicos asociados. En esta tesis se ha tomado como insecto diana a la cucaracha americana *Periplaneta americana*, debido a su creciente presencia en áreas urbanas y residenciales de España y resto de Europa. Las hembras de esta especie depositan los huevos en forma de cápsulas, llamadas ootecas, en lugares ocultos al tránsito de personas y en ausencia de luz. Las condiciones de temperatura y humedad de la época estival en la costa mediterránea propicia su rápida reproducción en estas zonas, generando malestar entre la población. Como ya se ha tratado en la sección anterior, el modo de aplicación más utilizado en el mercado es el aerosol aplicado directamente sobre el insecto (vía tópica) o bien, aplicado sobre una superficie de paso actuando también por vía tópica. Considerando la investigación generada hasta la fecha de los mecanismos de acción de sustancias

insecticidas y la eficacia insecticida de los productos comerciales más utilizados en los últimos años, se profundiza en el conocimiento del mecanismo biológico de inhibición de AChE, así como en la actividad biológica de los canales iónicos. De esta manera, se pretende valorar la viabilidad de utilizar estos MdA para desarrollar sus estructuras moleculares en la cucaracha americana y desarrollar sustancias insecticidas no conocidas.

La AChE pertenece a la clase de proteínas caracterizadas por el pliegue hidrolasa, que es compartido por varias enzimas hidrolíticas de diferentes orígenes y funciones. El sitio activo de la AChE contiene dos subsitios, el esterático que corresponde al sitio catalítico y el aniónico, que corresponde al sitio de unión de colina, respectivamente. También hay otro sitio de unión aniónico periférico para la acetilcolina y otros ligandos cuaternarios. El modo de acción de la AChE se asemeja a otras serinas hidrolasas, implicando la formación de un intermedio acil-enzima [32]. Con la ayuda de las técnicas de simulación y modelado computacional se han realizado numerosos estudios para determinar la estructura y función de la acetilcolinesterasa en varios organismos. En este sentido, una fuente de información esencial es la ampliamente utilizada colección depositada en la Protein Data Bank (PDB), una librería que pone a disposición pública innumerables biomoléculas y complejos para la investigación tanto estructural como computacional. Cabe destacar que ya en 2016 había 178 estructuras de AChE disponibles, muchas de las cuales incluían inhibidores de importancia médica y farmacológica [34]. Las técnicas computacionales también han servido para predecir la potencia inhibidora de compuestos OP y carbamatos, como en el trabajo de Lee *et al.* [35], donde se utilizaron métodos de tipo de Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (3D-QSAR) y se

incluyeron insecticidas comerciales para la validación de la predicción. Los insecticidas OP y carbamatos fueron desarrollados como inhibidores de AChE. Los OP son compuestos que contienen fósforo y derivan de los ácidos fosfórico, fosfónico y fosfínico. Su mecanismo de acción es la fosfilación del residuo catalítico de serina de la AChE, tal como se describe en la Figura 1.6. Al inhibir la AChE provocan una respuesta rápida sobre el insecto que comienza con un movimiento descoordinado y termina en la muerte en un periodo de 24 a 48 horas según la dosis de aplicación. Una de sus principales ventajas es que se degradan rápidamente mediante hidrólisis por lo que no se acumulan en el medio ambiente como ocurría con los organoclorados. Sin embargo, el problema de los OP es que atacan irreversiblemente al residuo catalítico de serina de la AChE tanto para invertebrados como para vertebrados, lo que los convierte en altamente tóxicos para humanos [36].

En el caso de los carbamatos, se inhibe la AChE mediante la carbamilación de la serina catalítica tal como se muestra en la Figura 1.6. Al ser más rápida la descarbamilación que la defosfilación, la dosis necesaria para causar efectos tóxicos en humanos es mayor para los carbamatos que para los OP por lo que se consideran menos peligrosos para la salud humana. Se descomponen en semanas o meses, por lo que no se acumulan significativamente en el medio ambiente. Cabe también destacar que son más estables químicamente y más hidrófobos y tienen presiones de vapor más bajas. Por todo esto, se utilizan como insecticidas de contacto para el tratamiento de plagas en cultivos y se han convertido en una alternativa a los OP como inhibidores de la AChE [36].

Además de la ya mencionada AChE, otras de las dianas más importantes en el desarrollo de nuevos insecticidas son los llamados canales iónicos.

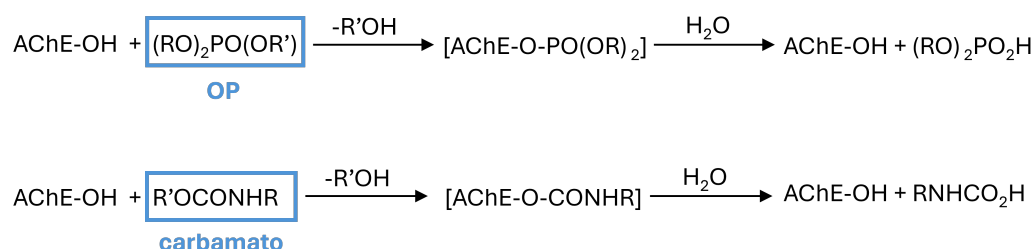


Figura 1.6: Proceso de inhibición de acetilcolinesterasa para compuestos organofosforados y carbamatos.

Estas biomoléculas son proteínas que regulan el paso de los iones a través de la membrana plasmática y se difunden de acuerdo a su potencial electroquímico. Son estructuralmente muy diversos pero tienen en común que actúan como puertas que se abren o cierran en respuesta a un estímulo. Pueden ser selectivos para un ión específico, como los canales de sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}); o no selectivos, como los receptores nicotínicos [37]. En el caso de los canales selectivos de Na^+ y K^+ , en la mayoría de los casos la apertura y cierre se genera por un potencial de membrana a causa de la propagación de un estímulo nervioso. La apertura de los canales de sodio activados por voltaje (Na_V) se produce rápidamente, y como consecuencia provoca la despolarización de la membrana, tal como se puede apreciar en la Figura 1.7. Esto desencadena posteriormente la apertura de los canales de K^+ activados por voltaje (K_V) que luego repolarizan la membrana garantizando el retorno al potencial de reposo [38].

En las últimas décadas, los estudios computacionales han avanzado en la determinación de la estructura atómica tridimensional de varios canales iónicos, lo cual ha permitido comprender mejor la permeabilidad iónica y la selectividad de los iones en canales de membranas biológicas a nivel molecular.

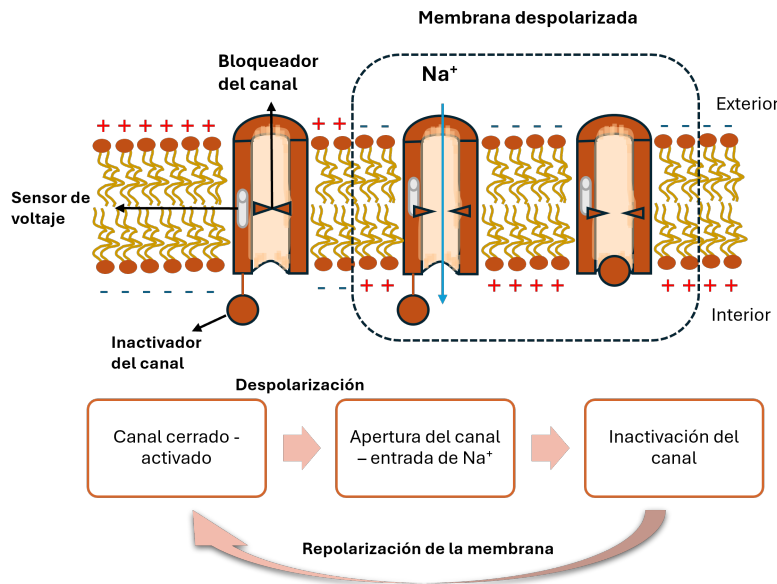


Figura 1.7: Mecanismo para el funcionamiento del canal de sodio activado por voltaje.

Los modelos computacionales desarrollados han permitido predecir los sitios de unión de los distintos insecticidas conocidos, como en el trabajo de O'Reilly *et al.* [39], donde se desarrolló un modelo de homología del VSSC de la mosca doméstica para predecir la ubicación de los sitios de unión de los insecticidas fenvalerato (piretroide sintético) y DDT (organoclorado de primera generación). En el caso de la cucaracha americana, Shen *et al.* determinaron una estructura de alta resolución para el canal de sodio mediante microscopía electrónica [40]. Posteriormente en su publicación de 2018 [41] proporcionaron las bases para determinar la acción de moléculas pequeñas en el canal, dividiendo su mecanismo de acción en dos categorías: bloqueantes físicos que obstruyen el canal, como tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX); y modificadores que alteran la activación del canal al interferir con el sitio de detección de voltaje. Los insecticidas que han demostrado su acción sobre canales iónicos se resumen

en la Tabla 1.2. De todos ellos, los más utilizados en la actualidad en las formulaciones comerciales de productos para uso doméstico son los piretroides.

Tabla 1.2: Tipos de insecticidas que actúan sobre canales iónicos.

Tipo de insecticida	Canal iónico
Piretroides	Na^+
DDT y análogos	Na^+
N-Alkylamides	Na^+
Dihydropyrazoles	Na^+
Diacylhydrazines	K^+
Azadirachtin	K^+
Ryanodine	Ca^{+2}

Los piretroides son una clase de insecticidas neurotóxicos muy importantes y surgen como análogos sintéticos de los ésteres naturales del ácido crisantémico (piretrinas I) y del ácido pirétrico (piretrinas II) (Figura 1.8). El primer piretroide, la Aletrina (Figura 1.9) fue descubierto por Schechter y LaForge en 1949, como resultado de la simplificación de la fracción dieno de la Piretrina I, y fue comercializada por Sumitomo Chemical Co. en 1953, gracias a la investigación realizada por Matsui que estableció las bases para el desarrollo de novedosos piretroides desarrollados posteriormente por los químicos de esta compañía. Estas investigaciones llevaron a Matsuo hasta la síntesis de la Praletrina en 1981, consiguiendo un piretroide de alta actividad biocida contra insectos domésticos y la estructura más similar a la Piretrina I natural [42]. La Tetrametrina fue sintetizada por Ueda en 1964 a partir de la Piretrina I hasta conseguir el éster de N-hidroximetil ftalimida, que resultó ser uno de los insecticidas más potentes utilizados para combatir plagas domésticas. Siguiendo los trabajos de la síntesis de Tetrametrina, Itaya rediseñó la estructura de

la fracción alcohólica de la Piretrina sintetizando la Imiprotrina en 1977 (Figura 1.9). Este piretroide sintético demostró una elevada actividad biocida contra cucarachas [43]. También Itaya, en 1968, sintetizó varios derivados a partir del *m*-cresol hasta conseguir finalmente la Fenotrina, que resultó mostrar una elevada actividad como insecticida y su toxicidad en mamíferos era menor que las Piretrinas naturales [44]. La incorporación del alcohol -ciano-3-fenoxibencílico ha dado lugar a varios piretroides comerciales como Cifenotrina, Cipermetrina o Deltametrina (Figura 1.9).

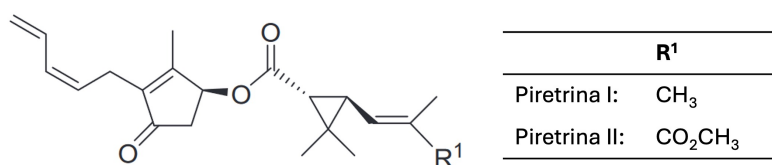


Figura 1.8: Estructura molecular de la Piretrina I y II. Fuente: Referencia [42]

Los piretroides se clasifican en dos grupos (tipo I y II) según su toxicidad y propiedades físicas. Los de tipo I tienen una estructura básica de éster carboxílico de ciclopropano, entre ellos se encuentra la Aletrina, Permetrina, Fenotrina y Tetrametrina. Los piretroides tipo II incorporan un grupo ciano a su estructura, como la Cipermetrina y la Cifenotrina. Los piretroides tienen una alta quiralidad ya que presentan de uno a tres átomos de carbono asimétricos (centros quirales). Todos tienen al menos cuatro estereoisómeros y de dos a cuatro pares de diastereoisómeros o enantiómeros. Además de la adición del grupo ciano, también se han realizado variaciones en la identidad y posición de los grupos químicos halogenados e hidrofóbicos y de su disposición estereoquímica [2]. Estas alteraciones de la estructura básica de un piretroide basada en la estructura original de la Piretrina, puede aumentar el potencial biocida pero

a la vez puede afectar a la fotoestabilidad o a la selectividad de la molécula sobre el insecto diana.

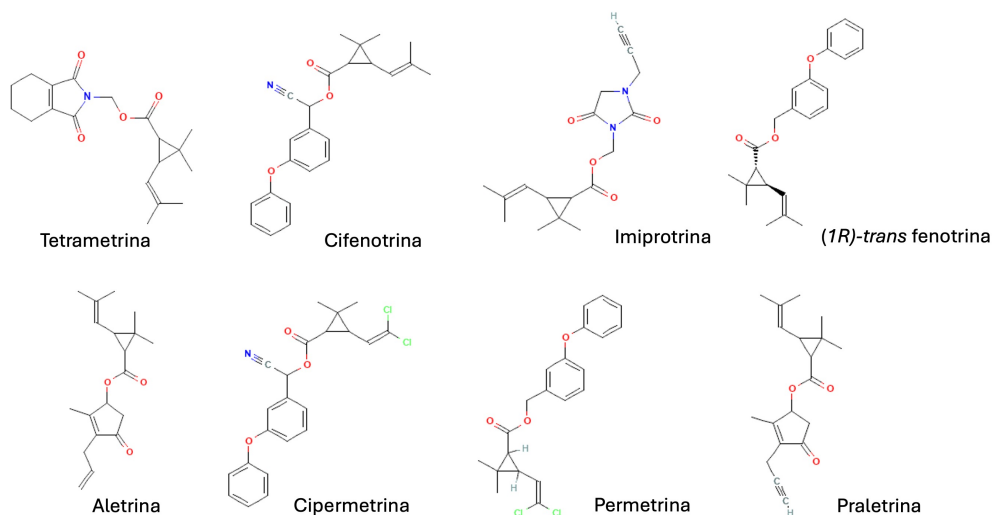


Figura 1.9: Ejemplos de moléculas de algunos piretroides comerciales. Fuente: *PubChem Open chemistry database* [45]

Las propiedades físico químicas son similares entre los distintos piretroides, tal como se muestra en la Figura 1.3. Todos ellos tienen una masa molar (M) superior a los 300 g/mol, el logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) entre 4 y 7 indica que son altamente hidrófobos, y la solubilidad en agua es muy baja para todos ellos (Tabla 1.3). La persistencia, medida como el tiempo de degradación para el 50 % de la sustancia (DT_{50}), es muy baja ya que se hidrolizan fácilmente en presencia de luz [46]. Los insecticidas piretroides se utilizan por su elevada actividad insecticida y su bajo nivel de toxicidad en mamíferos, aves y plantas en comparación con los insecticidas organoclorados y organofosforados.

Tabla 1.3: Propiedades fisicoquímicas de los piretroides. Fuente: Referencia [46].

Piretroide	Tipo	Fórmula molecular	M (g/mol)	log Kow	Solubilidad en agua a 20°C (µg/L)	DT ₅₀ (días)
Aletrina	I	$C_{19}H_{26}O_3$	302,4	4,96	0,1	–
Imiprotrina	I	$C_{17}H_{22}N_2O_4$	318,4	2,43	93.500	–
Permetrina	I	$C_{21}H_{20}O_3Cl_2$	391,3	6,1	200	13
Fenotrina	I	$C_{23}H_{26}O_3$	350,5	6,01	9,7	–
Praletrina	I	$C_{19}H_{24}O_3$	300,4	4,49	8.030	-
Tetrametrina	I	$C_{19}H_{25}NO_4$	331,4	4,6	1.830	3
Trasflutrina	I	$C_{15}H_{12}Cl_2F_4O_2$	371,2	5,46	57	7
Cipermetrina	II	$C_{22}H_{19}NO_3Cl_2$	416,3	5,3	9	60
Deltametrina	II	$C_{22}H_{19}NO_3Br_2$	505,2	4,6	0,2	13

En la Tabla 1.4 se muestran los efectos agudos de algunos piretroides y sus formulaciones en organismos no objetivo. Los insectos tienen canales de sodio más sensibles, sus cuerpos son pequeños en comparación con el de los mamíferos y con temperaturas corporales más bajas, lo que se traduce en una menor absorción a través de la piel en mamíferos y una mayor metabolización a compuestos no tóxicos. Sin embargo, la exposición a concentraciones elevadas de piretroides podría afectar al sistema nervioso central e inducir toxicidad reproductiva debido a la alteración endocrina.

A pesar de la capacidad de metabolización de los piretroides que poseen los seres humanos, existen estudios que demuestran que estos pueden bioacumularse en poblaciones de mamíferos donde el uso de estos insecticidas se realiza de manera habitual para el control de plagas agrícolas o domésticas, como el estudio de Corcellas *et al.* [47] donde se analizan los niveles de piretroides en leche materna humana en distintas zonas de Colombia, Brasil y España.

Tabla 1.4: Efectos toxicológicos de los piretroides sobre aves, peces y abejas. Fuente: Referencia [2].

Piretroide	Aves $\text{mg}_{\text{piretroide}}/\text{kg}_{\text{peso ave}}$	Peces	Abejas
Aletrina	2030	Tóxico	-
Permetrina	>13500	Muy tóxico	Muy tóxico
Fenotrina	>2500	Tóxico	Tóxico
Tetrametrina	>1000	Tóxico	Tóxico
Cipermetrina	-	Extremadamente tóxico	Tóxico
Deltametrina	>4640	Tóxico	Muy tóxico

1.3 Herramientas computacionales de modelado molecular

El modelado molecular es una disciplina fundamental en la investigación científica y el desarrollo tecnológico en campos como la química, la biología, la farmacología y la nanotecnología [48]. Se basa en la utilización de técnicas computacionales para simular y analizar la estructura y el comportamiento de moléculas y sistemas moleculares a nivel atómico. Las herramientas de modelado molecular permiten visualizar [49], predecir [20] y entender las propiedades y funciones de las moléculas [50], lo que resulta indispensable para una amplia gama de aplicaciones. Entre estas aplicaciones podemos destacar las siguientes:

- a. **Diseño de nuevos fármacos:** Permite diseñar y optimizar nuevos compuestos farmacéuticos mediante la predicción de sus mecanismos de acción frente a dianas biológicas, como enzimas, receptores y proteínas [51]. Este enfoque ha demostrado ser crucial para el desarrollo de medicamentos

más eficaces y selectivos.

- b. **Descripción de la estructura y función de proteínas:** Facilita el estudio de la estructura tridimensional de proteínas y la comprensión del mecanismo biológico en el que participan, lo que es crucial para entender procesos en tejidos vivos y desarrollar terapias dirigidas [52, 53].
- c. **Diseño de materiales:** Permite simular y optimizar la estructura y las propiedades de materiales a nivel molecular, lo que es útil para crear materiales avanzados con propiedades específicas para aplicaciones en electrónica, catálisis, y materiales biomiméticos, entre otros [54, 55].
- d. **Predicción de propiedades químicas:** Permite predecir propiedades físicas y químicas de moléculas y materiales, como la solubilidad, la reactividad química, y las propiedades termodinámicas, lo que puede ayudar a la optimización de procesos químicos y la síntesis de materiales con propiedades mejoradas [56, 57].

Existen diversas herramientas y técnicas de modelado molecular, cada una con sus propias características y aplicaciones específicas. Estas técnicas son esenciales para abordar problemas complejos en diferentes áreas científicas. La dinámica molecular (MD) es una técnica que simula la evolución temporal de un sistema molecular mediante la integración numérica de las ecuaciones de movimiento de las partículas, generalmente utilizando el algoritmo de Verlet o variantes de éste [17]. Esta técnica permite estudiar la dinámica y la termodinámica de sistemas moleculares complejos, proporcionando información detallada sobre el comportamiento de las moléculas a nivel atómico. Aplicaciones típicas de la dinámica molecular incluyen el estudio de procesos de difusión,

plegamiento de proteínas e interacciones intermoleculares [18, 58].

Existen además los métodos de mecánica cuántica, una teoría más compleja que abre la puerta al estudio del comportamiento electrónico de sistemas moleculares. Este nivel de teoría permite así estudiar reacciones químicas, propiedades ópticas y electrónicas de moléculas y materiales [59]. Métodos como la teoría del funcional de la densidad (DFT) y la teoría del segundo orden de Møller-Plesset (MP2) son comúnmente utilizados para este propósito [60]. Estos enfoques proporcionan una comprensión profunda de los mecanismos de reacción y las propiedades de los materiales a nivel cuántico [61].

Otra técnica ampliamente utilizada es el *docking* molecular, que predice la conformación y la afinidad de unión entre dos moléculas, como fármacos y proteínas, utilizando algoritmos de búsqueda para encontrar la orientación y geometría óptimas de interacción entre ellas [12, 15, 62]. Este método es fundamental en el diseño de fármacos, ya que permite identificar posibles ligandos que se unan con alta afinidad a una diana biológica específica, facilitando el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos [63]. El modelado de proteínas es otro campo importante, que incluye técnicas como la modelización por homología y el plegamiento de proteínas. La modelización por homología permite predecir la estructura tridimensional de una proteína basándose en la secuencia de aminoácidos y la estructura de proteínas homólogas conocidas [64]. Además, técnicas avanzadas como AlphaFold han revolucionado este campo al proporcionar predicciones de estructura con precisión casi experimental [52].

Los métodos de simulación Montecarlo son técnicas estocásticas que utilizan el muestreo aleatorio para explorar el espacio de configuraciones de un sistema.

Uno de los métodos más utilizados es el muestreo de Metrópolis, que permite obtener un muestreo eficiente y rápido utilizando criterios como el factor de Boltzmann para guiar el recorrido aleatorio [65]. Estos métodos son especialmente útiles para estudiar sistemas donde las configuraciones energéticas son complejas y no lineales.

La metadinámica es una técnica avanzada desarrollada para superar barreras de energía y simular eventos raros. Introduce potenciales Gaussianos repulsivos en el sistema a intervalos regulares para ayudar a escapar de mínimos locales de energía, proporcionando una reconstrucción más precisa de la energía libre del sistema [66, 67]. Esta técnica es particularmente útil para estudiar procesos lentos y difíciles de simular con métodos tradicionales, como cambios conformacionales en proteínas y reacciones químicas complejas.

Además, los métodos QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) son vitales en el modelado molecular. QSAR utiliza modelos matemáticos y estadísticos para predecir la actividad biológica y las propiedades fisicoquímicas de compuestos químicos basándose en su estructura molecular [68]. Estos métodos son ampliamente utilizados en el diseño de fármacos, la evaluación de toxicidad y la optimización de compuestos químicos, proporcionando una herramienta poderosa para predecir la actividad biológica de nuevas moléculas antes de su síntesis experimental [69].

Cada una de estas técnicas aporta herramientas poderosas para la investigación y el desarrollo en diversas áreas de las ciencias de la vida y la ingeniería, proporcionando una comprensión más profunda y detallada de los sistemas moleculares y sus comportamientos.

Capítulo 2

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es descubrir el potencial insecticida y sinérgico de sustancias químicas recogidas en la base de datos de medicamentos (DrugBank), mediante la predicción de su interacción en dos de los mecanismos de acción más relevantes para los insecticidas rastreros de uso doméstico, como son VSSC y AChE.

Los objetivos parciales de esta tesis doctoral se enumeran a continuación:

- O1.- Caracterizar la actividad biocida de las principales sustancias insecticidas convencionales (piretroides) frente a sustancias alternativas (terpenoides), mediante un método *in vivo* de aplicación tópica sobre la cucaracha *Periplaneta americana*.
- O2.- Desarrollar un modelo computacional capaz de predecir la interacción de una sustancia en el sitio activo de VSSC de la cucaracha *Periplaneta americana*.

- O3.- Desarrollar un modelo computacional capaz de predecir la interacción de una sustancia en el sitio activo de la AChE de la cucaracha *Periplaneta americana*.
- O4.- Generar predicciones de interacción con los modelos de VSSC y AChE a partir de la base de datos de medicamentos (DrugBank).
- O5.- Comparar los resultados obtenidos en los modelos computacionales con los datos experimentales *in vivo* obtenidos mediante aplicación tópica de las sustancias más prometedoras y que están disponibles comercialmente.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

En este capítulo se describen de manera detallada los materiales y métodos, tanto computacionales como experimentales, utilizados en el desarrollo de esta tesis. En primer lugar, se explica en qué consiste el proceso de VS y se presenta la metodología computacional desarrollada a lo largo de la investigación. Esto incluye la selección de las dianas biológicas de la cucaracha americana, la biblioteca de compuestos explorada, el procedimiento de preparación de las estructuras de las dianas y la estrategia de VS aplicada. También se describe el procedimiento utilizado en la realización de los ensayos *in vivo*, así como los parámetros de toxicidad empleados para determinar la eficacia insecticida y sinérgica de los compuestos seleccionados *in silico*. Finalmente, se incluyen los procedimientos experimentales y los métodos de cálculo de las determinaciones fisicoquímicas realizadas durante la investigación, con el fin de evaluar el comportamiento del líquido de ensayo a través de la cutícula de la cucaracha.

3.1 Virtual screening (VS) para el descubrimiento de biocidas

El VS [70] es un método computacional que se utiliza para identificar rápidamente compuestos químicos potencialmente activos frente a una diana biológica específica, como puede ser una enzima, un receptor o una proteína asociada a una enfermedad. En lugar de realizar ensayos experimentales (asociados a un alto coste en tiempo y dinero) de manera directa sobre una gran cantidad de compuestos químicos, el VS utiliza herramientas de modelado molecular para realizar simulaciones computacionales de interacción entre compuestos y la diana biológica.

El proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevas sustancias activas biocidas es largo y complejo, abarcando típicamente un periodo de 8 a 13 años desde la idea inicial hasta la comercialización de la sustancia. La Figura 3.1 ilustra el proceso de desarrollo de sustancias activas biocidas, donde miles de compuestos son inicialmente seleccionados y evaluados. A través de diversas etapas, incluyendo la selectividad toxicológica de la sustancia y la identificación de los riesgos para la salud humana y el medioambiente, el número de candidatos se reduce significativamente. De los miles de compuestos evaluados, aproximadamente 250 avanzan a las fases de estudios *in vivo* para determinar la dosis mínima eficaz de la sustancia. Posteriormente, solo unos pocos, alrededor de cinco, llegan a las etapas avanzadas de desarrollo de un dossier de registro que debe incluir los estudios fisicoquímicos y de eficacia que indica BPR. Finalmente, uno o dos compuestos consiguen incluirse en el listado de

sustancias activas biocidas aprobados por la ECHA. En este contexto, el VS juega un papel crucial al permitir la identificación eficiente de compuestos prometedores en las etapas iniciales, optimizando recursos y acelerando el proceso de descubrimiento de sustancias insecticidas.

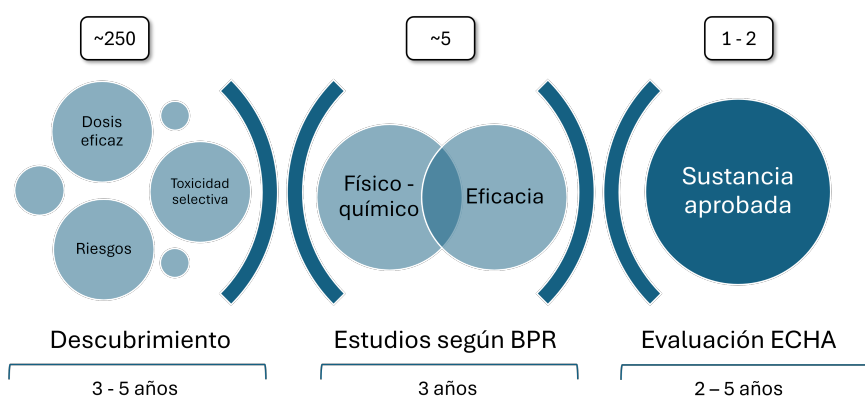


Figura 3.1: Proceso de desarrollo para la aprobación y comercialización de una sustancia activa biocida en Europa.

El proceso del VS se estructura en varias etapas críticas que garantizan la selección de los mejores candidatos para avanzar en el pipeline de desarrollo. En primer lugar, la **preparación de la biblioteca de compuestos** es una etapa fundamental donde se selecciona un conjunto de moléculas que serán evaluadas en el cribado virtual. Esta biblioteca puede componerse de moléculas provenientes de bases de datos públicas, como PubChem, ZINC o Drug Bank (DB), o de colecciones de compuestos de diseño propio desarrolladas específicamente para el estudio en cuestión [21, 71, 72]. Además, debido a la creciente preocupación por la seguridad y sostenibilidad en el desarrollo de nuevos fármacos, se están utilizando cada vez más bases de datos de compuestos naturales, como NPASS y SuperNatural II, que ofrecen una rica fuente de

moléculas con una diversidad estructural significativa y propiedades bioactivas potenciales [73, 74]. Sin lugar a dudas, la diversidad y calidad de la biblioteca de compuestos son cruciales, ya que determinan el rango y la eficacia potencial de los candidatos identificados durante el cribado.

Una vez que se ha preparado la biblioteca de compuestos, la siguiente etapa crucial en el proceso de VS es la **preparación de la estructura de la diana biológica**. Esta fase implica la obtención y optimización de la estructura tridimensional de la proteína diana, que es esencial para la precisión y éxito del docking molecular. La estructura tridimensional de la proteína puede obtenerse mediante diversas técnicas experimentales como la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear (RMN), o a través de técnicas de criomicroscopía electrónica (cryo-EM). Estas metodologías proporcionan datos estructurales con alta resolución que son fundamentales para el análisis detallado de las interacciones proteína-ligando [75]. Existen bases de datos públicas como el *Protein Data Bank* (PDB) donde se almacena la estructura tridimensional de proteínas y ácidos nucleicos determinada mediante técnicas experimentales, como la cristalografía de rayos X y RMN [76]. El PDB contiene una amplia colección de estructuras de proteínas resueltas a diferentes resoluciones y en diversos estados funcionales. Es una herramienta fundamental para la investigación en biología estructural y el modelado de proteínas, ya que proporciona información detallada sobre la conformación y la función de proteínas de interés.

En los casos donde la estructura experimental de la proteína diana no está disponible, se pueden utilizar métodos computacionales de modelado por homología como se ha mencionado anteriormente. Este enfoque se basa en la suposición de que proteínas con secuencias de aminoácidos similares tienen

estructuras tridimensionales similares. Herramientas como SWISS-MODEL y Phyre2 permiten construir modelos tridimensionales de proteínas basándose en estructuras conocidas de proteínas homólogas, ofreciendo una alternativa viable para la obtención de la estructura de la diana [77, 78]. Recientemente, la irrupción de la inteligencia artificial (IA) en el modelado molecular ha generado herramientas como AlphaFold, capaces de predecir la estructura terciaria de las proteínas a partir de sus secuencias de aminoácidos. Estas herramientas han revolucionado el campo de la biología estructural al ofrecer predicciones de estructuras proteicas con una precisión comparable a la de métodos experimentales tradicionales [52]. AlphaFold, desarrollado por DeepMind, utiliza redes neuronales profundas y una ingente cantidad de datos de secuencias y estructuras proteicas disponibles públicamente para entrenar su modelo. El sistema incorpora información evolutiva, principios físicos y datos estructurales conocidos para generar predicciones de la estructura tridimensional de proteínas con alta precisión. En la competición "Critical Assessment of protein Structure Prediction" (CASP), AlphaFold ha demostrado una capacidad sin precedentes para predecir estructuras complejas que anteriormente eran difíciles de resolver [79].

Una vez obtenida la estructura tridimensional de la proteína, es necesario preparar esta estructura para el análisis de docking. Este proceso incluye varios pasos críticos. Primero, se elimina cualquier molécula de agua presente en la estructura cristalográfica, ya que estas pueden interferir con la simulación de *docking*. A continuación, se añaden los átomos de hidrógeno faltantes, lo cual es esencial para una correcta representación de las interacciones de enlace de hidrógeno y otras fuerzas intermoleculares [80]. Adicionalmente, se asignan los

estados de protonación adecuados para los residuos de la proteína, en función del pH fisiológico, utilizando herramientas como PROPKA para prever el estado de ionización de los residuos en el contexto de la estructura completa [81].

Otra consideración importante durante la preparación de la diana es la optimización de la estructura proteica. Esto puede implicar la minimización de energía para aliviar tensiones estéricas o ajustes en las conformaciones de los bucles que no están bien definidos en la estructura cristalográfica. Los métodos de MD pueden ser utilizados para refinar la estructura de la proteína, proporcionando una representación más realista y flexible de la diana biológica en condiciones simuladas de solvencia y temperatura [17].

Finalmente, se define el sitio activo de la proteína donde se realizará el *docking*. Esto implica identificar las regiones de la proteína que son cruciales para la interacción con los ligandos, basándose en información experimental, datos de mutagénesis, o predicciones computacionales. Herramientas como SiteMap pueden ser utilizadas para identificar y caracterizar estos sitios de unión, asegurando que el *docking* se enfoque en las áreas más relevantes para la actividad biológica de los ligandos [82]. La cuidadosa preparación de la estructura de la diana biológica es un paso fundamental en el proceso de VS. Este proceso garantiza que las simulaciones de *docking* sean precisas y relevantes, aumentando las probabilidades de identificar compuestos con alta afinidad y especificidad hacia la diana biológica, y, por ende, con un mayor potencial de eficacia.

La siguiente etapa es el ***docking molecular***, donde se utiliza software especializado para predecir la conformación y la energía de interacción entre cada

compuesto de la biblioteca y la diana biológica de interés. Herramientas como AutoDock, DOCK, Glide o METADOCK son comúnmente empleadas en este paso para evaluar cómo los compuestos se unen al sitio activo de la diana. El *docking* molecular simula las interacciones fisicoquímicas y calcula la afinidad de unión, proporcionando una visión detallada de las posibles configuraciones moleculares y su compatibilidad con la diana [12, 83, 84]. Existen métodos de *docking* basados en la nube como ACHILES, que proporcionan una infraestructura escalable y accesible para realizar simulaciones de *docking* molecular de alta eficiencia. Estos sistemas aprovechan el poder computacional de los recursos en la nube para procesar grandes bibliotecas de compuestos en paralelo, reduciendo significativamente el tiempo requerido para identificar candidatos prometedores. ACHILES [85] y otros servicios similares permiten a los investigadores ejecutar complejas simulaciones sin la necesidad de costosas instalaciones de hardware local, facilitando el acceso a tecnologías avanzadas para laboratorios de todo el mundo [11].

Una vez completado el *docking*, se procede al **filtrado y selección de los compuestos**. Los resultados obtenidos se analizan para identificar aquellos con alta afinidad de unión y buena complementariedad estructural con la diana biológica. Este proceso de filtrado implica la aplicación de varios criterios de selección, tales como la energía de unión, la geometría de la interacción, y la presencia de grupos funcionales relevantes. El objetivo es reducir el número de candidatos a aquellos que muestran las características más prometedoras para avanzar a las siguientes etapas del desarrollo [63, 86]. Cabe destacar que en este sentido, se han utilizado en la bibliografía técnicas de *docking* por consenso, donde diferentes aplicaciones de *docking* se utilizan para llegar a un consenso

entre los resultados obtenidos por cada una de ellas. Esta estrategia busca mejorar la precisión y fiabilidad de las predicciones al combinar múltiples modelos y algoritmos, minimizando así el riesgo de falsos positivos. Por ejemplo, se pueden emplear programas como AutoDock, Glide, METADOCK, en paralelo, y luego integrar sus resultados para seleccionar los compuestos con las puntuaciones más consistentes y favorables. Este enfoque de *docking* por consenso ha demostrado ser eficaz en la identificación de ligandos potenciales con alta probabilidad de éxito en etapas posteriores del desarrollo de fármacos [87]. Además de las técnicas de *docking* por consenso, se han desarrollado métodos de post-procesamiento de los resultados de *docking* que incluyen la re-evaluación de los complejos proteína-ligando mediante simulaciones de MD. Estas simulaciones permiten refinar las configuraciones obtenidas en el *docking* inicial y evaluar la estabilidad de los complejos en un entorno dinámico, proporcionando una visión más realista de la interacción entre el ligando y la diana biológica [88]. La combinación de *docking* molecular y simulaciones de dinámica molecular constituye un enfoque robusto para la selección y optimización de compuestos candidatos.

La última etapa del proceso de VS es la **validación experimental**, donde los compuestos seleccionados se someten a ensayos para confirmar su actividad biológica. Estos ensayos pueden incluir pruebas de inhibición enzimática, estudios de unión a receptores, ensayos celulares, y pruebas *in vivo*, dependiendo de la naturaleza de la diana biológica y el contexto del estudio. La validación experimental es crucial para corroborar los resultados computacionales y asegurar que los compuestos identificados poseen la actividad biológica deseada en sistemas biológicos reales [89].

3.2 Metodología computacional propuesta

En esta sección se describe la metodología de VS utilizada en esta tesis para el descubrimiento de nuevos compuestos biocidas contra la cucaracha americana (*Periplaneta americana*). El objetivo principal es identificar compuestos que no solo sean eficaces contra este insecto, sino que también cumplan con los requisitos regulatorios establecidos por las principales agencias gubernamentales, como la FDA (Food and Drug Administration) en los Estados Unidos y la ECHA (European Chemical Agency) en Europa.

El primer paso en nuestra metodología fue la **selección de compuestos** a analizar. Basándonos en más de 20 años de experiencia acumulada en el desarrollo de biocidas por parte de Francisco Aragón, se formuló la hipótesis de que ciertos compuestos ya aprobados y utilizados en otros dominios, como el farmacéutico, podrían tener un potencial biocida no explotado previamente. Esta estrategia, conocida como reposición de fármacos (*drug repurposing*) se ha consolidado como una práctica efectiva en la industria farmacéutica para encontrar nuevas aplicaciones terapéuticas para medicamentos ya aprobados, aprovechando el conocimiento existente sobre su seguridad y eficacia [90]. Para llevar a cabo esta estrategia, nos centramos en la base de datos DrugBank (DB) [21], una de las principales fuentes de moléculas utilizadas en el diseño de fármacos. DB contiene más de 10.000 compuestos, incluidos medicamentos aprobados, nutraceuticos, compuestos experimentales y retirados, lo que la convierte en una base de datos fundamental para el proceso de reposicionamiento de fármacos. La selección de compuestos de esta base de datos ofrece la ventaja de acceder a moléculas con perfiles toxicológicos ya conocidos. Estos

datos previos facilitan además el proceso regulatorio, ya que muchos de estos compuestos ya cuentan con la aprobación de organismos legisladores internacionales, reduciendo así los obstáculos para su uso en nuevos dominios, como el biocida.

Las estructuras moleculares de la DB se curaron utilizando el módulo LigPrep de Schrödinger. Este módulo es fundamental para asegurar la calidad de las estructuras, ya que asigna órdenes de enlace correctos, determina los estados de protonación a un pH fisiológico de 7.0, y optimiza las estructuras utilizando el campo de fuerza OPLS4. Además, LigPrep genera todos los tautómeros posibles de cada compuesto, ampliando así el espectro de conformaciones que podrían interactuar con las dianas biológicas [91].

Una vez seleccionada y preparada computacionalmente la biblioteca de compuestos, el siguiente paso en nuestra metodología fue la **identificación de las dianas o receptores** relevantes que deben ser bloqueados por los compuestos insecticidas o sinergistas para ser efectivos contra la cucaracha americana (*Periplaneta americana*). La selección de estas dianas biológicas es una etapa clave para asegurar que los compuestos identificados a través del cribado virtual tengan una alta probabilidad de interferir en funciones vitales del insecto, conduciendo a su eliminación o a la potenciación de otros insecticidas.

Existen varios modos de acción identificados en el sistema nervioso de la cucaracha americana cruciales para su supervivencia. Entre estos, los insecticidas actuales han demostrado ser particularmente eficaces cuando actúan sobre dos dianas clave: los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) y la enzima

acetilcolinesterasa (AChE). Los canales Na_v son esenciales para la generación y propagación de potenciales de acción en las neuronas, y su bloqueo puede conducir a la parálisis y muerte del insecto [41]. Por otro lado, la acetilcolinesterasa es responsable de la degradación del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis, y su inhibición resulta en una acumulación excesiva de acetilcolina, causando disfunción sináptica y eventual toxicidad [92].

La selección de estas dos dianas como objetivos principales en nuestra estrategia se basa en una combinación de su relevancia biológica, su validación como dianas efectivas en otros insectos, y la disponibilidad de datos estructurales detallados que permiten un modelado molecular preciso. La importancia de los canales Na_v y la AChE en la función neural del insecto, junto con su alta conservación estructural entre especies, hace que estos receptores sean receptores óptimos para la acción de nuevos compuestos insecticidas o sinergistas [3, 8].

Una vez establecidas las dianas, se procedió a su **preparación computacional**. Este proceso implicó la obtención de modelos tridimensionales precisos de las proteínas diana. En el caso del Na_v se utilizó la estructura cristalográfica disponible en la base de datos PDB con el código de acceso 6A95, publicada por Shen et al. [41]. La gran ventaja de utilizar esta estructura PDB en concreto es que proporciona un modelo experimental detallado del canal Na_v de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*). Otra ventaja es que este mismo PDB incluye la posición de la tetrodotoxina (TTX) como ligando cristalográfico, así como la toxina Dc1a que modifica la activación del canal en la esfera del átomo de sodio (ver Figura 3.2).

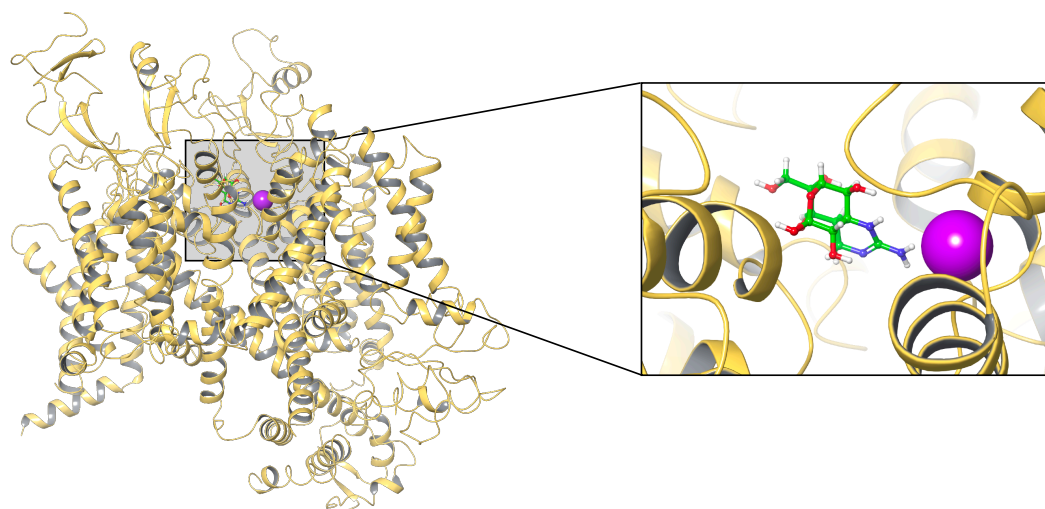


Figura 3.2: Imagen de la estructura experimental del canal Na_v de *P. americana* en presencia de los bloqueadores de poros de guanidinio TTX (Na_v PaS). La proteína se representa en amarillo. La estructura molecular del inhibidor de TTX se representa siguiendo un esquema de colores (carbono en verde, oxígeno, nitrógeno en azul e hidrógeno en blanco) y un átomo de sodio ubicado en el poro central (bola rosa). En el recuadro se amplía la región del sitio de unión.

Los datos estructurales sin procesar del canal Na_v , depositados en el PDB, fueron preparados y refinados utilizando herramientas de la suite de Schroedinger. Inicialmente, se utilizó el módulo Protein Preparation Wizard para añadir todos los átomos de hidrógeno faltantes y corregir los órdenes de enlace [93]. Las cargas de los átomos se asignaron mediante el uso de Epik a un pH de 7.0, lo cual asegura una representación precisa del entorno fisiológico [94]. Para determinar los estados de protonación de los residuos, se empleó PROPKA, una herramienta que proporciona estimaciones confiables de los valores de pKa basadas en la estructura proteica [95]. Finalmente, la estructura fue optimizada mediante minimización de energía utilizando el campo de fuerza OPLS4, lo que resultó en un modelo tridimensional refinado y adecuado para los estudios de *docking* molecular [96].

Para la segunda diana objeto de esta tesis doctoral; esto es la enzima *AChE*, no se disponía de datos cristalográficos específicos para la cucaracha americana. En estos casos, donde la estructura cristalina de la diana no está resuelta, el modelado por homología surge como una alternativa viable. En concreto, se utilizó el conjunto de herramientas de modelado por homología dentro del software Schroedinger [97], se llevó a cabo una búsqueda BLAST para identificar plantillas adecuadas. Todos los parámetros de modelado se mantuvieron en sus configuraciones predeterminadas para asegurar la reproducibilidad de los experimentos. Nuestra búsqueda encontró un homólogo estructural depositado en el PDB con el código de acceso 5X61, que presenta una identidad de secuencia del 73.18 %, una positividad de secuencia del 82.95 % y mínimas diferencias que representan solo el 0.22 % de la alineación de la secuencia. Este homólogo, proveniente de la especie *Anopheles gambiae*, proporcionó la base para la construcción de nuestro modelo de homología. Es importante resaltar que nuestro está de acuerdo con estudios previos disponibles en la bibliografía [92], que abarca tanto análisis experimentales como computacionales de la AChE. La secuencia de la AChE de *P. americana*, denotada por el código de secuencia GenBank ALJ10969.1 y obtenida en formato FASTA, se alineó siguiendo los criterios establecidos en el estudio mencionado, corroborando la selección del código PDB 5X61 como plantilla para nuestro modelo estructural.

Como método alternativo para construir una estructura fiable de AChE para la *Periplaneta americana* se utilizó AlphaFold para predecir la estructura a partir de la secuencia de aminoácidos anteriormente citada. En concreto, se utilizó el sistema ColabFold v1.5.5, que es una implementación de AlphaFold2 optimizada para su uso en Google Colab, permitiendo un acceso más

fácil y eficiente a la predicción de estructuras proteicas. Este sistema combina la potencia del modelo AlphaFold2 con MMseqs2 para la generación de alineamientos de secuencias y plantillas mediante HHsearch [98]. El pipeline utilizado incluyó predicciones tanto para monómeros como para complejos, con opciones de configuración avanzadas que permitieron ajustes específicos, como el uso de modelos relajados por Amber, lo que proporciona un refinamiento adicional a la estructura predicha. ColabFold permitió una predicción rápida y precisa de la estructura 3D de la AChE de *Periplaneta americana*, aprovechando la capacidad de AlphaFold para integrar información evolutiva y restricciones geométricas para predecir la disposición espacial de los aminoácidos. Este enfoque facilitó la derivación de un modelo estructural confiable que sirvió como base para los subsiguientes estudios de *docking* molecular, permitiendo simular con precisión las interacciones de potenciales inhibidores en el sitio activo de la enzima.

La Figura 3.3 ilustra la superposición de los modelos estructurales generados para la diana AChE, comparando el modelo de homología con la estructura predicha por AlphaFold. Esta comparación visual permite validar la consistencia entre ambos enfoques, destacando la precisión del modelo de AlphaFold, que, a pesar de la ausencia de datos cristalográficos experimentales, ofrece una conformación proteica altamente confiable con un valor de desviación cuadrática media (RMSD) de solo 1.32 Å. Esta validación es crucial para justificar la fiabilidad del modelo utilizado en las etapas posteriores de *docking* molecular. Las preparaciones computacionales de las dianas Na_v y AChE, incluyendo la refinación estructural y la predicción basada en inteligencia artificial, aseguraron que las simulaciones de *docking* se llevaran a cabo sobre modelos tridimensio-

nales precisos y biológicamente relevantes. Este rigor en la preparación de los modelos incrementa significativamente las probabilidades de identificar compuestos con alta afinidad y especificidad hacia estas dianas, optimizando el proceso de descubrimiento de nuevos biocidas en esta tesis.



Figura 3.3: Superposición de los modelos generados para la diana AChE mostrados como caricaturas. Esquema de colores: modelo de homología en verde y estructura predicha por AlphaFold en blanco.

Respecto a la estrategia de **docking molecular y el filtrado y selección de compuestos** propuesta en esta tesis doctoral, se implementó un enfoque de consenso para maximizar la precisión y efectividad en la identificación de compuestos con potencial actividad biocida. La Figura 3.4 muestra la estrategia de consenso VS desarrollada, que combina dos estrategias de descubrimiento principales. El primero se basa en el flujo de trabajo Glide centrado en el sitio activo. Todos los ligandos pasaron por las tres etapas del proceso Glide según su configuración estándar [62, 84], es decir, detección virtual de alto rendimiento (HTVS), precisión estándar (SP) y precisión extra (XP). En ese marco, el número de falsos positivos se reduce secuencialmente de más de 10.000 entradas a 1.000 en el paso HTVS. Vale la pena destacar que tanto HTVS

como SP implementan la misma función de puntuación. Sin embargo, HTVS se basa en un refinamiento y muestreo torsional menos exigente que permite un rápido rechazo de compuestos incompatibles con el poro central. El paso SP se utiliza para volver a acoplar los 1000 mejores resultados generados por HTVS. El procedimiento de acoplamiento se completa volviendo a acoplar los 100 compuestos mejor puntuados con un nivel de precisión XP, lo que implementa una función de puntuación más refinada [99]. Se permite un máximo de 10 poses en ese paso final de XP.

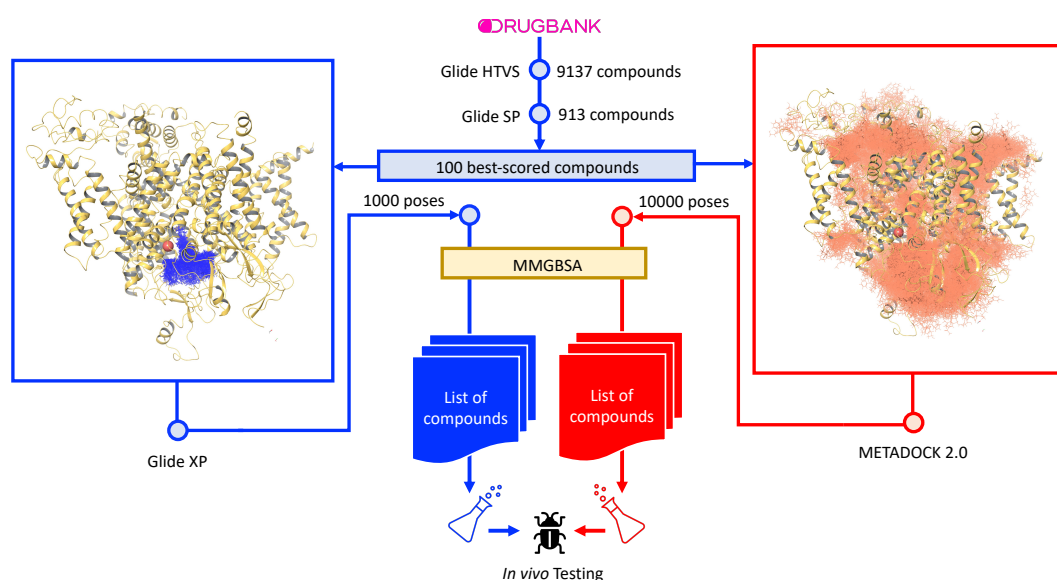


Figura 3.4: Estrategia de virtual screening para el canal de sodio en *Periplaneta americana*.

En el caso de la estructura de la AChE, los sitios de unión se determinaron utilizando la herramienta SiteMap, también implementada en el conjunto de programas Schrödinger. SiteMap es una herramienta diseñada para escanear las superficies de las proteínas para la búsqueda de posibles sitios de unión [100]. Sin embargo, para la estructura del canal de sodio se dispone de los datos

cristalográficos del inhibidor TTX, por lo que se genera un cuadro de cuadrícula de $20 \times 20 \times 20 \text{ \AA}^3$ en la ubicación del inhibidor de TTX cristalizado.

Aunque el protocolo de tres niveles Glide permite una detección rápida de bibliotecas grandes, la búsqueda se restringe principalmente a un sitio de enlace específico. El número de poses generadas también es limitado (es decir, hasta 10 poses por ligando). Ese enfoque mantiene el costo computacional bajo control ya que Glide utiliza exclusivamente recursos de CPU. METADOCK 2.0 se utiliza para mejorar la generación de poses en este último paso de acoplamiento. Este método de acoplamiento es capaz de configurar diferentes mecanismos de búsqueda basados en procedimientos metaheurísticos como Algoritmos Genéticos (GA), Búsqueda Greedy (GS), Búsqueda Scatter (SS), Hill Climbing, solo por mencionar algunos. Los métodos de búsqueda se definen creando instancias de un conjunto de parámetros de configuración (Tabla 3.1) que definen la condición de parada de la metaheurística, el número de individuos en la población inicial, la política de combinación, mutaciones, etc. En consecuencia, esta configuración de parámetros define la efectividad del procedimiento de acoplamiento, por lo que se deben realizar varias optimizaciones de parámetros antes de lanzar la simulación. Este proceso lo lleva a cabo HYPERDOCK [101, 102] que desarrolla una búsqueda sistemática utilizando hiperheurísticas trabajando sobre el esquema metaheurístico, para encontrar un conjunto de parámetros que proporcionen metaheurísticas satisfactorias.

Tabla 3.1: Los diecinueve parámetros metaheurísticos utilizados para METADOCK 2.0.

Parámetros Metaheurísticos		Descripción
<i>ParamIni</i>	<i>INEIni</i>	Número de conformaciones iniciales del ligando.
	<i>IIEFlex</i>	Intensificación de la flexibilidad en las funciones de mejora.
	<i>PEIIni</i>	Porcentaje de las mejores conformaciones que se mejoran en la función Inicializar.
	<i>IIEIni</i>	Intensificación de la mejora en la función Inicializar.
	<i>PBEIni</i>	Porcentaje de las mejores conformaciones a incluir en el conjunto inicial para las siguientes iteraciones.
	<i>PWEIni</i>	Porcentaje de las peores conformaciones a incluir en el conjunto inicial para las siguientes iteraciones.
<i>ParamSel</i>	<i>PBESel</i>	Porcentaje de las mejores conformaciones seleccionadas para combinación.
	<i>PWESel</i>	Porcentaje de las peores conformaciones seleccionadas para combinación.
<i>ParamCom</i>	<i>PBBCom</i>	Porcentaje de mejores conformaciones para ser combinadas.
	<i>PWWCom</i>	Porcentaje de peores conformaciones para ser combinadas.
	<i>PBWCom</i>	Porcentaje de mejores-peores conformaciones para ser combinadas.
<i>ParamMut</i>	<i>PMUCom</i>	Porcentaje de mejores conformaciones de la combinación a ser mutadas.
	<i>IMUCom</i>	Intensificación de la mutación de elementos generados por combinación.
<i>ParamImp</i>	<i>PEIImp</i>	Porcentaje de mejores conformaciones de la combinación a ser mejoradas.
	<i>IIEImp</i>	Intensificación de la mejora de elementos generados por combinación.
<i>ParamInc</i>	<i>PBEInc</i>	Porcentaje de mejores conformaciones a incluir en el conjunto de referencia.
<i>ParamEnd</i>	<i>NIREnd</i>	Número máximo de pasos sin mejora.
	<i>MNIEnd</i>	Número máximo de iteraciones con o sin mejora.

Los individuos de las metaheurísticas son posiciones diferentes del complejo proteína-ligando. Para cada ligando, se genera una población de poses que se distribuye entre los carbonos alfa de la superficie de la proteína. De esta manera se busca sistemáticamente toda la superficie del receptor. Para determinar la bondad de una pose particular, se calcula la función de puntuación METADOCK 2.0. La fase de refinamiento desarrollada por METADOCK 2.0 se alimenta de los 100 compuestos de mayor afinidad generados en las etapas HTVS y SP. Después de la fase de refinamiento, METADOCK 2.0 genera las 10 poses de mayor afinidad.

Estos métodos de acoplamiento generan una serie de compuestos que se

clasifican según su valor de puntuación. Cabe destacar que las funciones de puntuación de los métodos no son equivalentes, por lo que los valores obtenidos por Glide y METADOCK 2.0 no son directamente comparables entre ellos. Para homogeneizar los valores de puntuación, las energías de enlace de los compuestos de Glide y METADOCK 2.0 mejor clasificados se calculan finalmente con el método de mecánica molecular/área de superficie de Born generalizada (MMGBSA) implementado en el módulo Prime [103, 104]. Ese nivel de teoría es más refinado computacionalmente ya que tiene en cuenta las energías antes y después de la unión del ligando, lo que a su vez permite una nueva puntuación más rigurosa [105, 106, 107, 108]. En ese caso, las energías libres de enlace se calculan tal como indica la Ecuación 3.1,

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complex}} - G_{\text{target}} - G_{\text{ligand}} \quad (3.1)$$

donde ΔG_{bind} representa la energía libre de unión de cada ligando, y G_{complex} , G_{target} , y G_{ligand} son las energías libres del complejo, objetivo ($Na_v\text{PaS}$) y ligando (entrada DB), respectivamente. Esa ecuación podría reescribirse como se muestra en la Ecuación 3.2,

$$\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MMGBSA}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{GB}} + \Delta G_{\text{SA}} - T\Delta S \quad (3.2)$$

donde ΔE_{MM} es la energía total en la fase gaseosa (incluidas las contribuciones interna, electrostática y de van der Waals), ΔG_{GB} es la contribución polar a la energía libre de solvatación calculada con el método generalizado de Born (GB), ΔG_{SA} es la función lineal predicha del término libre de solvatación no

polar del área de superficie accesible al solvente (SASA), y $T\Delta S$ es el cambio de entropía conformacional [109]. Estos términos dan como resultado la energía libre de unión de cada ligando dentro del enfoque MMGBSA ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MMGBSA}}$).

3.3 Determinación toxicológica *in vivo* sobre *Periplaneta americana*

Se utiliza cucarachas americanas (*Periplaneta americana*) criadas en el laboratorio biológico de FA a $27,5 \pm 0,5$ °C, 70 ± 5 % de humedad relativa y un fotoperíodo de 12:12 (L:D). Las cucarachas usadas tienen entre 1-2 meses de vida. Estas cucarachas fueron alimentadas, desde la emergencia de la ooteca hasta adultas, con pienso de perro seco y agua. Existen 3 cepas diferentes de *Periplaneta americana* en este laboratorio, la más antigua se recolectó en 2008, cerca de la sede de FA, y de los adultos recolectados, se desarrollaron 4 líneas de cría de este insecto, proveyendo así las tres etapas de su ciclo de vida: huevo, ninfa y adulto. La segunda cepa se compró en 2018 a I2L Laboratorio de investigación Ltd. (Cardiff, U.K.) y se creó una nueva línea de cría. La última cepa también se recolectó cerca de la sede de FA, compuesta por ninfas y adultos de periplaneta americana, y se desarrolló una nueva línea de cría con esta tercera cepa. Los insectos, para su manipulación fueron tratados con gas dióxido de carbono de grado industrial (pureza $>99,5$ %) suministrado por Linde España. Se realizaron diluciones de las moléculas de ensayo utilizando tanto disolventes como emulsionantes y se analizaron varios solventes para determinar su idoneidad en la determinación de la toxicidad sobre cucaracha americana. Todas

estas sustancias utilizadas para la preparación de los productos de ensayo se muestran en la Tabla 3.2.

Con el objetivo de conocer experimentalmente la toxicidad de cualquier sustancia líquida en cucarachas se desarrolló un método de aplicación tópica basado en lo descrito en los estudios de Zhai y Robinson [110], Scott et al [111] y Ladonni [112]. Las cucarachas fueron anestesiadas en su caja de cría para pasarlas a frascos de 700 cc, donde se realizó la selección por sexos y se colocaron en bolsas transparentes de cierre hermético.

Tabla 3.2: Disolventes y tensioactivos utilizados para la preparación de los productos de ensayo.

CAS	Proveedor	Nombre	Uso de la sustancia
7732-18-5	PanReac	Agua	Disolvente
64-17-5	Scharlau	Etanol absoluto	Disolvente
67-64-1	Scharlau	Acetona	Disolvente
67-68-5	Honeywell	Dimetilsulfóxido	Disolvente
68-12-2	ThermoFisher	Dimetilformamida	Disolvente
75-09-2	Labkem	Diclorometano	Disolvente
111-90-0	Dow Chemical	Etildiglicol	Disolvente
123-86-4	Scharlau	Acetato de butilo	Disolvente
141-78-6	Scharlau	Acetato de etilo	Disolvente
9005-64-5	Croda Iberica	Tween 20	Tensioactivo
70559-25-0	Clariant	Emulsogen ts100	Tensioactivo
-	Clariant	Calsogen 4814	Tensioactivo
61788-85-0	Sabo SpA	Sabowax EL-H 40	Tensioactivo

La selección de sexos se hizo en base a los criterios morfológicos de esta especie. Las hembras poseen un par de cercos y los machos poseen además un

par de estilos. Para la aplicación del producto de ensayo, se manipuló cada individuo con las pinzas desde el tórax a la altura del segundo par de patas. Se observó la actividad en los individuos antes de iniciar el ensayo y a continuación, se dosificaron $5\mu\text{L}$ del producto a ensayar de forma individual en la zona ventral del tórax, tal como se observa en la Figura 3.5.

Inmediatamente después, se colocó el individuo en el frasco y se cerró rápidamente, accionando el cronómetro digital para contabilizar el tiempo. Cada frasco se identificó con el número del producto de ensayo, la réplica y el sexo del individuo. Se contabilizó la mortalidad a las 24 horas de la aplicación, de las cucarachas tratadas y de los individuos control.



Figura 3.5: Proceso de aplicación tópica sobre la zona ventral del tórax de *Periplaneta americana*

Para evitar contaminaciones cruzadas, se tomaron las siguientes precauciones durante el ensayo:

- Usar guantes nuevos.
- Usar frascos nuevos o perfectamente limpios.

- Usar tapas con ventilación en los frascos.
- Las cucarachas se introducen en los frascos con cuidado y se cierra la tapa rápidamente.
- Se utilizan individuos control sin tratamiento (igual número de machos y hembras).
- Todos los individuos del ensayo se mantienen en la zona de trabajo bajo las mismas condiciones ambientales.

Para determinar la toxicidad en *Periplaneta americana* se utilizaron como variables respuesta del estudio: por una parte, la mortalidad de los individuos a las 24 horas desde la aplicación de la sustancia y, por otra, el tiempo de volteo conocido como Knockdown (KD) de cada individuo a lo largo del ensayo. El tiempo de observación fue de 3 a 5 horas, en función del ensayo. Para la toma de datos se siguieron los siguientes criterios:

- a. Se anota el tiempo de volteo inicial, es decir la primera vez que la cucaracha voltea y permanece sobre su espalda 3 segundos o más.
- b. Puede ocurrir que se recupere, que se vuelva a poner de pie y vuelva a andar o a moverse y luego vuelva a voltear. En ese caso, se anotan todos los tiempos de volteo sucesivos al volteo inicial que cumplan lo descrito en a., hasta el volteo final.
- c. Algunas sustancias no producirán un volteo literal, en ese caso, se debe anotar el tiempo exacto en el que la cucaracha se queda paralizada.

- d. El parámetro afectado hace referencia al individuo que no es capaz de moverse coordinadamente pero no está muerto, según se indica en la guía BPR, volumen II.

El tratamiento de los datos para obtener el valor promedio y la desviación estándar del tiempo de volteo se calculó con el programa estadístico *Minitab 20*. Para el cálculo de la mortalidad a las 24 horas, expresado en tanto por ciento se realizó el recuento de los individuos volteadas a las 24 horas de la aplicación y se multiplicó por cien, el resultado se dividió entre el total de individuos del estudio.

Durante la fase de validación de la metodología experimental, se utilizaron algunos terpenoides, cuya estructura molecular se muestra en la Figura 3.6. Todos los terpenoides utilizados en este estudio han sido suministrados por Crearomatic Especialidades Aromáticas, S.L.

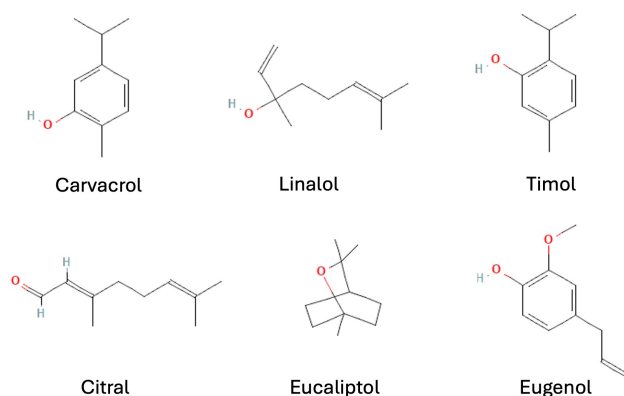


Figura 3.6: Estructura molecular de los terpenoides del estudio experimental.
Fuente: *PubChem Open chemistry database* [45]

Además, se utilizaron sustancias piretroides y piretrinas como control positivo empleado en insecticidas comerciales. Las estructuras moleculares de las sustancias piretroides utilizadas como productos de ensayo se muestran en la Figura 3.7.

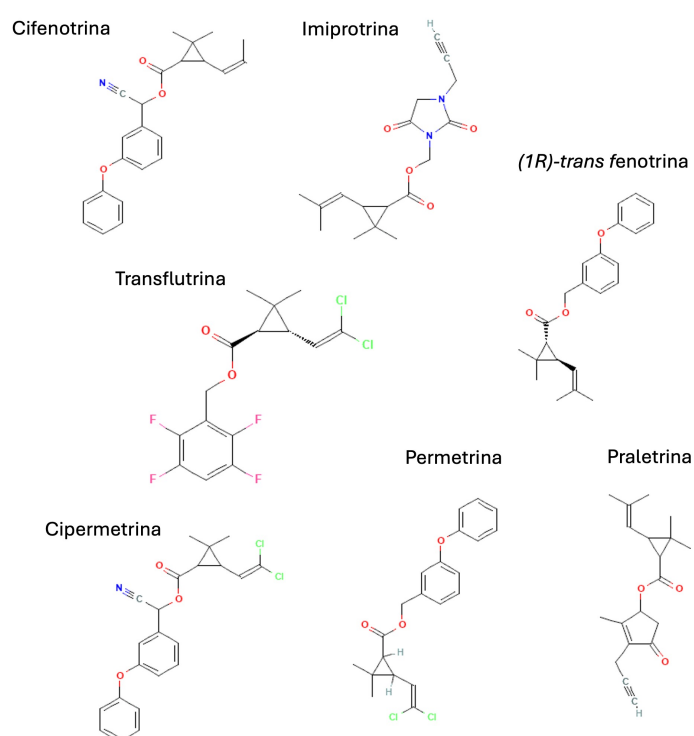


Figura 3.7: Estructura molecular de los piretroides utilizados en el ensayo de validación experimental. Fuente: *PubChem Open chemistry database* [45]

Las piretrinas naturales utilizadas en el estudio están formadas por los 6 ingredientes que se encuentran en los extractos de *Pyrethrum cinerariaefolium*. El extracto de piretro incluye así 6 ésteres activos, tal como indica la Figura 3.8.

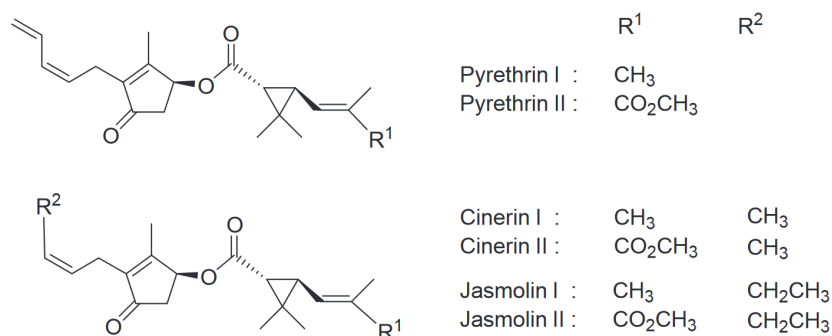


Figura 3.8: Estructura molecular de las piretrinas utilizadas en el ensayo de validación experimental. Fuente: Referencia [42]

3.4 Propiedades fisicoquímicas

3.4.1 Determinación de la tensión superficial de un líquido

La tensión superficial de un líquido con la fase gaseosa (SFT) y la tensión interfacial (IFT) entre dos líquidos inmiscibles se pueden determinar con un sistema óptico de medición de ángulo de contacto y análisis de la forma de la gota, como son los equipos de la serie OCA. En este procedimiento nos centramos en el estudio de la forma de la gota colgante. La configuración del equipo que se muestra en la Figura 3.9 se utilizó para capturar una imagen de una gota líquida que cuelga de una aguja dosificadora y, posteriormente, analizarla con el módulo de software *DataPhysics Instruments*. El proceso de evaluación correspondiente se denomina método de gota colgante (*Pendant drop method*).



Figura 3.9: Configuración esquemática del equipo de medida para el *Pendant drop method*. Fuente: Referencia [113]

El análisis de la forma de caída se basa en la ecuación Young-Laplace. Dicha ecuación (3.3) describe la diferencia de presión (presión de Laplace) entre las áreas dentro y fuera de una superficie/interfaz líquida curvada con los radios principales de curvatura R_{Y_o} .

$$\Delta P = (P_{int} - P_{ext}) = \sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (3.3)$$

Las fuerzas que determinan la forma de la gota colgante son la tensión superficial y la gravitación. La tensión superficial busca minimizar el área de la superficie y que la gota adopte forma esférica. La gravitación, por otro lado, estira la gota con forma esférica y los resultados típicos tienen forma similar a una pera. La gravitación causa una diferencia de presión en todo el eje z de acuerdo con la ley de Pascal (presión hidrostática). Por lo tanto, la presión de Laplace $\Delta P(z)$ a una distancia z de un plano de referencia arbitrario con ΔP de presión de Laplace ΔP_0 se desarrolla en la Ecuación 3.4.

$$\Delta P(z) = \Delta P_0 \pm \Delta \rho g z \quad (3.4)$$

Para una gota colgante, los radios principales de curvatura en el vértice (punto más bajo de la gota) son $R_1 = R_2 = R$. Por lo tanto, es conveniente colocar el plano de referencia en este punto. Para cada punto por debajo de este se cumple $R_2 = x/\sin H$ (véase la Figura 3.10). Los cálculos mencionados conducen a la Ecuación 3.5.

$$\frac{1}{R_1} + \frac{\sin \Phi}{x} = \frac{2}{R} \pm \frac{\Delta \rho g z}{\sigma} \quad (3.5)$$

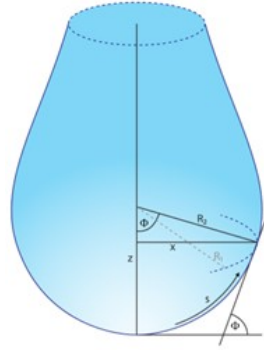


Figura 3.10: Derivación del ajuste Young-Laplace en una gota colgante. Fuente: Referencia [113]

La introducción de una parametrización con un arco de longitud s de la forma de la gota da como resultado tres ecuaciones diferenciales de primer orden (Ecuación 3.6; 3.7; 3.8) con tres valores de contorno, que se pueden resolver mediante procedimientos numéricos (Ecuación 3.9).

$$\frac{d\Phi}{ds} = -\frac{\sin\Phi}{x} + \frac{2}{R} \pm \frac{\Delta\rho gz}{\sigma} \quad (3.6)$$

$$\frac{dx}{ds} = \cos\Phi \quad (3.7)$$

$$\frac{dz}{ds} = \sin\Phi \quad (3.8)$$

$$0 = x(s = 0) = z(s = 0) = \Phi(s = 0) \quad (3.9)$$

El ajuste numérico de la forma grabada por la cámara a la forma teórica de caída permite obtener el valor de tensión superficial. Normalmente se expresa en *dina/cm* que es equivalente al *mN/m*.

Para determinar la tensión superficial de los líquidos de ensayo durante el desarrollo de este estudio se utilizó el equipo OCA-25 Dataphysics con una aguja de dosificación de 0,91 mm. Además, se requiere de un termómetro con resolución 0,1°C para comprobar la temperatura del líquido de ensayo y un baño termostatzado para mantener la temperatura de la muestra a 20±5°C. Para registrar la temperatura y humedad relativa ambiente se utilizó un termohigrómetro. El equipo se verificó antes de su uso con una pieza patrón que es un estándar óptico, fabricado con la máxima precisión en un proceso fotolitográfico controlado para servir como referencia fiable para la precisión de los datos medidos. Los datos de esta pieza patrón se muestran en la Ecuación

3.10.

$$\sigma = [20 \pm 0,02] \text{ mN/m}; \Delta P = 1 \text{ g/cm}^3; g = 9,80665 \text{ m/s}^2 \quad (3.10)$$

Se utilizó agua grado HPLC como líquido de referencia y se realizó como mínimo, dos medidas por cada muestra. En el caso de los líquidos de ensayos, se realizó de 3 a 5 mediciones.

Para proceder a la determinación, previamente se atemperó el líquido de ensayo y seguidamente, se rellenó la aguja y se enfocó la imagen. Se seleccionó el método Pendant Drop en el programa SCA-20. A continuación, se rellenaron los parámetros de dosificado automático, volumen de dosificación entre 3 y $6\mu\text{L}$, velocidad $0,5\mu\text{L/s}$ y altura de la jeringa 0,5cm. Se comprobó que estos parámetros eran válidos en la primera medida de tensión superficial de la muestra, evaluando el tamaño y la forma de la gota. Seguidamente se seleccionaron los parámetros de iluminación, ya que la cantidad de luz necesaria determinará la nitidez de la imagen. A continuación, se generó la hoja de resultados introduciendo los parámetros necesarios para realizar las medidas. Se incluyó el valor promedio de la densidad a 20°C y el valor de temperatura y humedad relativa correspondiente a las condiciones ambientales. Finalmente se inició la grabación y se accionó la dispensación de la gota. Una vez se dispuso de la gota, justo antes de que cayera de la jeringa, se paró la grabación y se colocaron las líneas de referencia para el cálculo según la Figura 3.11.

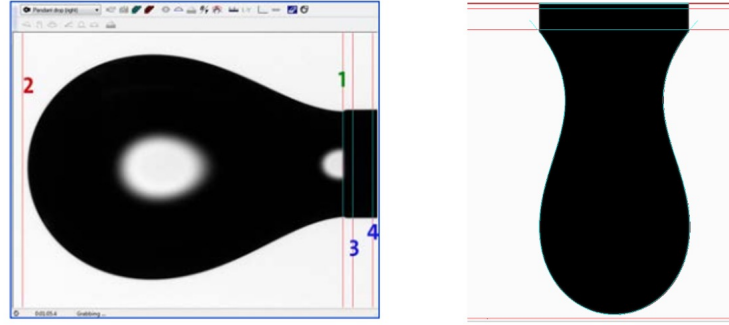


Figura 3.11: Ejemplo de ajuste de las líneas a la forma de la gota para el *Pendant drop method*. Fuente: Referencia [113]

Para obtener el valor de SFT del producto de ensayo es necesario realizar una serie de cálculos a partir de los resultados generados por el equipo de medida. En primer lugar se realizó el cálculo del valor promedio de las dos medidas del agua ($\overline{X}\sigma_g$) tal como indica la Ecuación 3.12. Se calculó también el factor de corrección del valor medido de tensión superficial del agua, aplicando para ello la Ecuación 3.11, donde σ_o es el valor de tensión superficial del agua a la temperatura deseada según lo recogido en la literatura científica y mostrado en la Tabla 3.3 y σ_g es el valor promedio de la tensión superficial obtenido en la medida experimental del agua. Ambos valores deben hacer referencia a la misma temperatura y se han de expresar en las mismas unidades, por lo que es importante tener en cuenta que $1Dina/cm = 10^{-3}N/m = 1mN/m$.

$$\overline{X}\sigma_g = \frac{(SFT_{agua})_1 + (SFT_{agua})_2}{2} \quad (3.11)$$

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \quad (3.12)$$

En caso de necesitar determinar la tensión superficial del agua a una temperatura distinta a la contempladas en la Tabla 3.3 (SFT_x), es necesario realizar una interpolación entre el valor superior (1) e inferior (0) siguiendo la Ecuación 3.13, donde T hace referencia a la temperatura y SFT al valor de tensión superficial.

$$SFT_x = SFT_1 + \frac{T_x - T_o}{T_1 - T_0} * (SFT_1 - SFT_0) \quad (3.13)$$

Para determinar la media aritmética de las distintas medidas del producto de ensayo realizadas ($SFT_{producto\ de\ ensayo}$), se aplicó la Ecuación 3.14 donde n es el número de medidas realizadas y $SFT_{medida\ producto\ de\ ensayo}$ corresponde a cada una de las medidas realizadas. Una vez se obtuvo el factor de corrección (Φ_b) y el $SFT_{promedio\ producto\ de\ ensayo}$, se calculó $SFT_{producto\ de\ ensayo}$ como el producto de ambos.

$$SFT_{promedio\ producto\ de\ ensayo} = \sum_n^{i=1} \frac{SFT_{medida\ producto\ de\ ensayo}}{n} \quad (3.14)$$

En el caso de determinar el ángulo de contacto del líquido sobre una superficie, se selecciona el método *Sessile Drop* en el programa SCA-20. La selección de la línea base se genera de forma automática y el cálculo se realiza siguiendo la ecuación de Laplace.

Tabla 3.3: Tensión superficial del agua a distintas temperaturas. Fuente: Referencia [114]

Temperatura (°C)	Tensión superficial del agua (mN/m)
0	75,64
5	74,90
10	74,22
15	73,49
20	72,75
25	71,97
30	71,18
40	69,56
50	67,91
100	58,85

3.4.2 Determinación de la densidad de un líquido

La densidad de una sustancia a una temperatura específica es la relación entre la masa de la sustancia y el volumen que ocupa a dicha temperatura. En este caso, la densidad se obtuvo mediante un densímetro basado en el principio de oscilación. Un oscilador mecánico, construido en forma de tubo en U que vibra a su frecuencia de resonancia y que depende de su masa. La introducción de una muestra cambia la frecuencia de resonancia. El aparato debe calibrarse con dos líquidos de densidad conocida. Es preferible elegir los líquidos de manera que sus densidades abarquen el intervalo en el que se encuentra el líquido que se investiga. El método es aplicable a líquidos con viscosidad dinámica inferior a $5Pas$.

Para determinar la densidad de los líquidos de ensayo analizados durante este estudio se utilizó un medidor de densidad de cálculo digital Anton Paar, modelo DMA 1001. Como líquido de referencia se utilizó agua de grado HPLC.

Se utilizaron jeringas desechables de 2 mL para la introducción de la muestra líquida.

Se realizó una verificación previa a su uso con aire y con agua HPLC a 20°C antes de iniciar una serie de mediciones. La prueba se realizó a temperatura constante, por lo que fue necesario configurar la temperatura de medida antes de iniciar la determinación. En este estudio se midieron las muestras a 20°C, realizando las medidas por duplicado. Para el cálculo de la densidad relativa fue necesario medir la densidad del agua a la misma temperatura que la muestra de ensayo.

Para iniciar la determinación, se llenó una jeringa de 2 mL con la muestra líquida homogénea y sin burbujas. A continuación, se introdujo la muestra directamente en la celda de medición hasta que la celda estuvo llena. Después de que el termostato hubo equilibrado la temperatura de la muestra en la celda de medición, se obtuvo el valor.

Para obtener el valor de la densidad relativa de la muestra, se dividió el valor de la densidad registrado por el equipo de medida entre la densidad del agua medida a la temperatura correspondiente (20°C), tal como indica la Ecuación 3.15.

$$Densidad\ relativa\ (20^{\circ}C) = \frac{Densidad\ muestra\ 20^{\circ}C}{Densidad\ agua\ 20^{\circ}C} \quad (3.15)$$

Se calculó el valor promedio de las dos medidas realizadas y la desviación estándar asociada siguiendo las Ecuaciones 3.16 y 3.17.

$$\overline{X} = \frac{Densidad\ 1 + Densidad\ 2}{2} \quad (3.16)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(Densidad\ 1 - \overline{X})^2 + (Densidad\ 2 - \overline{X})^2}{2 - 1}} \quad (3.17)$$

Capítulo 4

Resultados y Discusión

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos durante la investigación. El capítulo está dividido en tres apartados, cada uno de los cuales explora diferentes aspectos del trabajo realizado para identificar y validar nuevos compuestos insecticidas y sinérgicos, aplicados a *Periplaneta americana*.

En la primera sección, se describen los experimentos realizados con terpenoides y piretroides como inhibidores conocidos de AChE y VSSC. Se evalúan diversos disolventes para optimizar la preparación de las soluciones de ensayo y se presentan los resultados de toxicidad de los terpenoides y piretroides. Además, se realizó un modelado molecular de las interacciones entre los compuestos y sus receptores, estableciendo umbrales de energía que facilitan la identificación de candidatos con actividad biocida.

En la siguiente sección, se llevó a cabo un cribado *in silico* y ensayos *in vivo* de la base de datos DB para identificar nuevos compuestos con actividad insecticida o sinérgica para los VSSC de *Periplaneta americana*. Tras validar los métodos de cribado, se identificaron varios compuestos con potencial biocida, destacando el Miglitol, que en combinación con Praletrina mostró una alta efectividad sinérgica, logrando una mortalidad del 100 % en las pruebas *in vivo*. La tercera sección explora el uso de metodologías de inteligencia artificial (IA) para la identificación de nuevos inhibidores de AChE en *Periplaneta americana*, superando las limitaciones de la falta de información estructural detallada sobre la enzima. Se llevó a cabo un cribado virtual (VS) sobre las estructuras predichas, identificando una serie de compuestos activos. Entre ellos, la molécula PF-04995274 mostró un gran potencial como sinergista en combinación con Praletrina, reduciendo significativamente los tiempos de KD en ensayos *in vivo*.

4.1 Validación experimental: Terpenoides y Piretroides

Con el objetivo de validar la metodología descrita en el capítulo anterior se utilizan los terpenoides y piretroides como inhibidores reportados en la literatura de la AChE y el VSSC de *Periplaneta americana*, respectivamente. En primer lugar, se presenta el estudio de varios disolventes con diferentes características para la preparación de los productos de ensayo a evaluar. En este estudio se determina por una parte, la toxicidad de los disolventes en *Pe-*

riplaneta americana y por otra, los parámetros fisicoquímicos más relevantes para asegurar la introducción del compuesto de prueba en cada individuo. A continuación, se describen las sustancias terpenoides y piretroides seleccionadas y se presentan los resultados de toxicidad sobre *Periplaneta americana* y las dosis de aplicación utilizadas. Además, se obtiene la dosis mínima letal necesaria de piretroides que permita evaluar la actividad sinérgica de los compuestos de prueba. Finalmente, se llevó a cabo el modelado molecular de las interacciones entre los terpenoides y piretroides con los receptores AChE y VSSC de *Periplaneta americana*. Este análisis persigue un doble objetivo. En primer lugar, se busca validar los sitios de interacción entre los compuestos biocidas y sus receptores, comparando estos resultados con los datos de interacción obtenidos de moléculas cristalográficas previamente identificadas. Esto permitirá confirmar la correspondencia entre las posiciones de unión observadas en las simulaciones y las posiciones experimentales conocidas. En segundo lugar, se pretende establecer un umbral de referencia para la energía de interacción entre los compuestos con actividad biocida y sus receptores. Este umbral servirá como criterio cuantitativo para evaluar la potencial eficacia de los compuestos identificados durante el proceso de VS. De esta forma, se podrá calificar a los compuestos seleccionados en el cribado virtual como candidatos prometedores, en función de su energía de interacción con las dianas biológicas relevantes. Los resultados presentados en este capítulo nos permiten definir aspectos clave para desarrollar la metodología de búsqueda de nuevos compuestos con actividad insecticida y sinérgica sobre la *Periplaneta americana*.

4.1.1 Análisis de toxicidad de disolventes para la *Periplaneta americana*

Para asegurar la eficacia y precisión en los ensayos de toxicidad, es fundamental seleccionar un disolvente adecuado que permita una óptima penetración y distribución del compuesto a través de la cutícula de la cucaracha, sin introducir efectos tóxicos adicionales que puedan sesgar los resultados. En este contexto, se realizó un análisis exhaustivo de la toxicidad asociada a varios disolventes con diferentes propiedades fisicoquímicas, con el objetivo de identificar el vehículo más apropiado para la administración tópica de los compuestos de ensayo. La Tabla 4.1 muestra los resultados obtenidos en términos de mortalidad y afectación de los insectos tras 24 horas de exposición a $5\mu\text{L}$ de cada disolvente. Para cada disolvente se utilizaron seis individuos (3 machos y 3 hembras) de *Periplaneta americana*, todos provenientes del mismo lote de cría, lo que garantiza la consistencia y comparabilidad de los resultados. Este paso es crucial para minimizar la variabilidad experimental y asegurar que cualquier efecto observado se deba exclusivamente al compuesto activo y no al vehículo empleado.

Tras identificar los disolventes que no presentaron toxicidad en las pruebas preliminares, se procedió a evaluar su idoneidad para solubilizar las sustancias de estudio y garantizar una aplicación tópica efectiva. Un factor crucial en este proceso es la capacidad del disolvente para formar una gota visible sobre la cutícula de la cucaracha y permitir su absorción. Para ello, se deben considerar varias propiedades fisicoquímicas clave. En primer lugar, la presión de vapor del disolvente proporciona una indicación de su volatilidad.

Tabla 4.1: Toxicidad de diferentes solventes en aplicación tópica sobre *Periplaneta americana*.

CAS	Disolvente	Afectación 24h (%)	Mortalidad 24h (%)
7732-18-5	Agua	0	0
56539-66-33	3-metoxi-3-metil-1-butanol (MMB)	35,7	21,4
64-17-5	Etanol	0	0
67-64-1	Acetona	0	0
64742-47-8	Disolvente D20/26	0	0
64742-47-8	Disolvente Isopar M	0	14,3
64742-47-8	Disolvente Isopar L	7,1	0
67-68-5	Dimetilsulfóxido (DMSO)	0	0
68-12-2	Dimetilformamida (DMF)	0	0
34590-94-8	Dipropilenglicol monometiléter (DPM)	11,1	11,1
25498-49-1	Tripropilenglicol monometiléter (TPM)	33,3	0
75-09-2	Diclorometano	0	0
57-55-6	Propilenglicol	0	0
142-91-6	Palmitato de isopropilo	0	0
111-90-0	Etildiglicol	0	0
123-86-4	Acetato de butilo	0	0
141-78-6	Acetato de etilo	0	0
120-51-4	Benzoato de bencilo	0	16,7
67774-74-7	Alquilbenceno lineal	0	0
64742-94-5	Disolvente Solvesso 150	50	50
100-51-6	Alcohol bencílico	33,3	83,3

Es imprescindible que el disolvente no se evapore demasiado rápido, ya que esto dificultaría su aplicación y podría comprometer la consistencia del ensayo. Los valores de presión de vapor a 20°C, obtenidos de la información técnica proporcionada por los fabricantes, se presentan en la Tabla 4.2. De acuerdo con estos datos, el diclorometano, que presenta una presión de vapor superior a la de la acetona, fue descartado para su uso en la aplicación tópica debido a su rápida evaporación, que impide una administración controlada del producto

sobre la cutícula.

Tabla 4.2: Valores de algunos parámetros físico químicos relevantes de solventes.

**Datos teóricos suministrados por el proveedor.*

CAS	Proveedor	Nombre	Presión vapor a 20°C (kPa)*	Densidad relativa a 20°C (g/cm ³)	SFT a 20°C (mN/m)
7732-18-5	PanReac	Agua	2,3	$0,9999 \pm 1,20 \times 10^{-4}$	$73 \pm 0,4$
64-17-5	Scharlau	Etanol absoluto	6,0928	$0,7911 \pm 3,22 \times 10^{-5}$	$21,7 \pm 1,7$
67-64-1	Scharlau	Acetona	23,3	$0,7917 \pm 6,67 \times 10^{-5}$	$23,7 \pm 0,8$
67-68-5	Honeywell	DMSO	0,056	$1,1017 \pm 1,02 \times 10^{-3}$	$43,5 \pm 0,5$
68-12-2	ThermoFisher	DMF	$0,49 \times 10^{-5}$	$0,9506 \pm 8,98 \times 10^{-5}$	$37,1 \pm 0,3$
75-09-2	Labkem	Diclorometano	47,5	$1,3279 \pm 9,86 \times 10^{-5}$	$27,2 \pm 0,3$
111-90-0	Dow Chemical	Etildiglicol	0,017 (a 25°C)	$0,9894 \pm 3,42 \times 10^{-4}$	$35,04 \pm 0,7$
123-86-4	Scharlau	Acetato de butilo	1,07	$0,8831 \pm 2,65 \times 10^{-5}$	$24,6 \pm 0,4$

Además, la tensión superficial del disolvente también juega un papel determinante en la permeabilidad del compuesto a través de la cutícula. Una menor tensión superficial sugiere una mayor capacidad del disolvente para penetrar en la cutícula, facilitando así la absorción del compuesto activo. La tensión superficial de los disolventes seleccionados se midió utilizando el método de “*pendant drop*”, descrito en la sección 3.4, mientras que la densidad de los líquidos también fue determinada experimentalmente según los procedimientos mencionados en la misma sección. Estos parámetros son fundamentales para garantizar que el disolvente no solo sea seguro, sino también eficaz en la administración del compuesto activo durante los ensayos toxicológicos.

Para validar el método experimental de determinación de la tensión superficial de los disolventes, se utiliza agua como patrón de referencia ya que se dispone del valor de tensión superficial en trabajos científicos [115]. Los resultados experimentales de SFT obtenidos para cada disolvente (ver Tabla 4.2) se relacionan con el grado de permeabilidad sobre la cucaracha a partir del ángulo

de contacto. Por ello, se calcula el valor experimental del ángulo de contacto mediante el método de “*sessile drop*” descrito en la sección 3.4, para el agua ($90,3 \pm 1,6$), etanol ($14,3 \pm 0,2$) y propilenglicol ($64,6 \pm 1,1$) como ejemplo de disolventes con distinto valor de SFT. Si el ángulo obtenido es mayor de 90° el líquido no moja al sólido, en cambio, si su valor es menor de 90° sí se produce el mojado de la superficie por el líquido. Este fenómeno se aprecia visualmente en la imagen de la Figura 4.1 tomada durante la medición del ángulo de contacto del agua y del etanol sobre la zona ventral de una cucaracha americana.

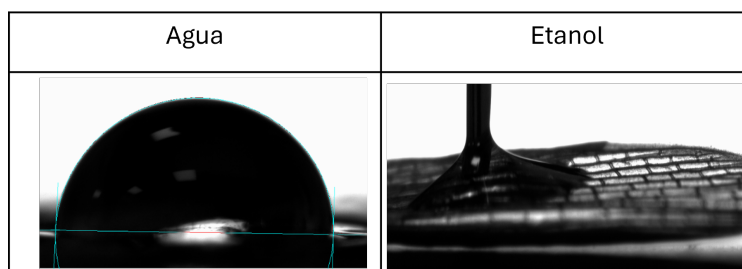


Figura 4.1: Distribución de agua y etanol sobre una sección de la zona ventral de *Periplaneta americana*.

Después de analizar todos los parámetros del estudio, se establece como valor límite de SFT en $60mN/m$ ya que por encima de ese valor el ángulo de contacto supera los 90° sobre la superficie de la cucaracha. Atendiendo a los parámetros descritos, se han seleccionado etanol, etilidiglicol, DMF y DMSO como los disolventes más adecuados para las soluciones de ensayo con los compuestos de prueba.

4.1.2 Análisis de inhibidores de VSSC y AChE de la *Periplaneta americana*: Terpenoides y Piretroides

La revisión de la literatura científica revela que algunos terpenoides están asociados con la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), un objetivo biológico clave en el estudio de biocidas. Además, existen datos experimentales que reportan la concentración inhibitoria necesaria para lograr una inhibición del 50 % de AChE en *Electrophorus*. La concentración inhibitoria media (IC₅₀) para cada terpenoide se presenta en la Tabla 4.3, junto con las referencias bibliográficas correspondientes que sustentan estos valores.

Tabla 4.3: Dosis de inhibición en AChE de los compuestos de estudio.

Molécula	IC ₅₀ (mM; mg/ml)	Fuente	Clasificación	Referencias
Linalol	15,6; 2,4	<i>Electrophorus</i>	Monoterpeno/alcohol	[116]
Timol	4,9; 0,74	<i>Electrophorus</i>	Monoterpeno/fenol	[117]
Eugenol	2,9; 0,48	<i>Electrophorus</i>	Fenilpropanoide	[118]
1,8-Cineol (Eucaliptol)	0,1; 0,015	<i>Electrophorus</i>	Monoterpeno/epoxy	[118]
Carvacrol	0,41; 0,063	<i>Electrophorus</i>	Monoterpeno/fenol	[117]

Además de los terpenoides, como sustancias inhibidoras de AChE, se estudió también el comportamiento de moléculas piretroides que se utilizan comercialmente en formulaciones insecticidas actuando como moduladores de canal Na_v [119].

Algunas características fisicoquímicas de las moléculas nos dan información sobre su comportamiento y acción insecticida. La Tabla 4.4 recoge las propiedades fisicoquímicas de interés para los piretroides y piretrinas utilizados para

la validación experimental, recopiladas a partir de la información suministrada por el fabricante en el certificado de análisis. Como se puede observar en esta Tabla, se trata de moléculas pequeñas, con un peso molecular inferior a 500 g/mol lo cual favorece la administración de la sustancia y su paso a través de la membrana celular [120]. De esta manera, cuanto más pequeña es la molécula más posibilidades ofrece de encajar en los sitios activos más profundos de la estructura biológica considerada como diana para la búsqueda de nuevos biocidas. La presión de vapor se considera importante para determinar la volatilidad de la sustancia, en el caso de los piretroides, presentan valores del orden de 10^{-3} a 10^{-7} a temperatura ambiente por lo que se pueden aplicar de forma tópica a través de la cutícula de la cucaracha. El logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) entre 3 y 7 indica que son altamente hidrófobos, lo que favorece su aplicación en disolventes que atraviesan la membrana celular que tiene naturaleza lipídica.

Tabla 4.4: Características fisicoquímicas de los piretroides y piretrinas. Información suministrada por el proveedor en su certificado de análisis.

Nombre	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Presión de vapor a 25° (Pa)	$\log P_{ow}$
<i>1R-trans</i> fenotrina	$C_{23}H_{26}O_3$	350,5	$4,17 \times 10^{-5}$	6,8
Cifenotrina	$C_{24}H_{25}NO_3$	375,5	$2,9 \times 10^{-7}$	6,3
Permetrina	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	391,3	$4,5 \times 10^{-5}$	6,5
Imiprotrina	$C_{17}H_{22}N_2O_4$	318,4	$1,86 \times 10^{-6}$	2,9
Transflutrina	$C_{15}H_{12}Cl_2F_4O_2$	371,15	9×10^{-4}	5,46
Praetrina	$C_{19}H_{24}O_3$	300,4	$3,57 \times 10^{-4}$	4,5
Cipermetrina	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	416,3	$1,166 \times 10^{-6}$	6,6
Piretrina I	$C_{21}H_{28}O$	328,4	$2,7 \times 10^{-3}$	5,9
Piretrina II	$C_{22}H_{28}O_5$	372,4	$5,3 \times 10^{-5}$	4,3

Las sustancias terpenoides utilizadas en el estudio comparten características fisicoquímicas con los piretroides ya que se trata de moléculas incluso más pequeñas que estos y de naturaleza lipídica, tal como se muestra en la Tabla 4.5 con el dato de peso molecular y $\log K_{ow}$.

La presión de vapor para estas sustancias es mayor que en el caso de los piretroides, sin embargo, está por debajo del valor límite que se ha establecido con los disolventes para determinar la aplicación tópica del líquido de estudio sobre la cucaracha americana (25-30 kPa a temperatura ambiente).

Tabla 4.5: Características fisicoquímicas de los terpenoides. Fuente: *PubChem Open chemistry database* [45]; * [121]

Nombre	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Presión de vapor a 25° (Pa)	$\log P_{ow}$
Linalol	$C_{10}H_{18}O$	154,25	21	2,97
Timol	$C_{10}H_{14}O$	150,22	2,13	3,3
Eugenol	$C_{10}H_{12}O$	164,20	2,94	2,49
Eucaliptol	$C_{10}H_{18}O$	154,25	253,31	2,74
Carvacrol	$C_{10}H_{14}O$	150,22	3,09-6,64*	3,49

Para determinar la toxicidad de estas sustancias mediante aplicación tópica sobre *Periplaneta americana* se utilizaron 5 μ L de producto de ensayo directamente sobre la cucaracha. Para la preparación de las soluciones de ensayo se utilizó como solvente el etildiglicol, ya que las sustancias de estudio presentan buena solubilidad con este disolvente y sus propiedades fisicoquímicas son adecuadas según lo descrito anteriormente.

Los terpenoides que se presentan en estado líquido se han estudiado tanto

puros, aplicando 5µl de la sustancia sobre cada individuo, como a una concentración del 50 % en peso. En el caso del Timol, al tratarse de una sustancia en estado sólido a la temperatura de estudio, no se puede aplicar directamente sobre la cucaracha y se utiliza una disolución más concentrada y otra al 50 % en etildiglicol. Para el Eucaliptol se emplearon distintas dosis desde 1,5µL hasta 5µL. Las dosis aplicadas por individuo de cada una de las sustancias terpenoides estudiadas se recogen en la Tabla 4.6 mientras que las dosis aplicadas de los piretroides se indican en la Tabla 4.7. La pureza y densidad de las sustancias se obtiene del certificado de análisis del lote utilizado para cada sustancia. Las dosis de aplicación se expresan tanto en peso como en volumen.

La aplicación de los terpenoides puros sobre *P. americana* resultó ser letal en todos los individuos de ensayo, sin distinción entre sustancias. Los resultados de mortalidad de los terpenoides para las dosis de estudio, expresados en % de individuos volteados a las 24 horas desde la aplicación del producto de ensayo mediante aplicación tópica, se muestran en la Tabla 4.8.

En el caso del Eucaliptol se ampliaron las dosis de estudio para encontrar la dosis a partir de la cual la eficacia se reduce significativamente ya que la disolución al 50 % en peso muestra resultados de mortalidad a las 24h superiores al 90 %. Los resultados de mortalidad a las 24 horas del Eucaliptol a las distintas dosis aplicadas sobre *P. americana* que se muestran en la Figura 4.2 indican que una dosis de 1,5µL presenta una mortalidad a las 24 horas superior al 60 %, mientras dosis inferiores reducen significativamente su potencial biocida.

Los piretroides y piretrinas han mostrado una mortalidad del 100 % a las 24 horas de la aplicación para las dosis de estudio (Tabla 4.7), con la excepción

de Imiprotina, que a la menor dosis de estudio (0,005 mg) presenta una mortalidad del 83,3 %.

Tabla 4.6: Dosis de aplicación de terpenoides utilizados en el ensayo de aplicación tópica sobre *P. americana* expresadas en unidad de peso y de volumen.

CAS	Sustancia	Pureza (%)	Densidad 20°C (g/ml)	Dosis x individuo (mg)	Dosis x individuo (μl)
470-82-6	1,8 Cineol (Eucaliptol)	98,9	0,925	4,574	5
				3,431	3,75
				3,202	3,5
				2,973	3,25
				2,516	2,75
				2,287	2,5
				1,830	2
				1,372	1,5
5392-40-5	Citral (Neral; Geranial)	96,49 (40,06; 56,43)	0,887	4,279	5
				2,140	2,5
78-70-6	Linalol	98,72	0,861	4,250	5
				2,125	2,5
97-53-0	Eugenol	99,5	1,063	5,288	5
				2,644	2,5
499-75-2	Carvacrol	99,9	0,976	4,875	5
				2,354	2,5
89-83-8	Timol	99,5	-	3,244	3,34
				2,438	2,5

El tiempo que transcurre desde la aplicación de la sustancia hasta el KD nos permite cuantificar el potencial de acción insecticida de la sustancia. Para ello, se representa en la Figura 4.3 el KD de las cucarachas para los terpenoides a las dosis de estudio. En el caso particular del Eucaliptol se han analizado los tiempos de volteo desde 1,5μL hasta 5μL para determinar el potencial de eficacia de la molécula ya que los resultados obtenidos indican que la reducción

del 50 % de la dosis de aplicación de la sustancia tiene una influencia reducida de 1,3 minutos, pasando de 6,37 a 7,68 minutos.

Tabla 4.7: Dosis de aplicación de los piretroides y piretrinas utilizados en el ensayo de aplicación tópica sobre *P. americana* expresadas en unidad de peso y de volumen.

CAS	Sustancia	Pureza (%)	Densidad a 20°C (g/ml)	Dosis por individuo (mg)	Dosis por individuo (μl)
26046-85-5	<i>1R-trans Phenothrin</i>	97,8	1,06	0,15	0,1384
				0,005	0,0046
39515-40-7	<i>Cyphenothrin</i>	94,3	1,08	0,15	0,1408
				0,005	0,0044
23031-36-9	<i>Prallethrin</i>	96,7	1,03	0,15	0,1066
				0,005	0,0047
118712-89-3	<i>Transfluthrin</i>	98,5	1,3856	0,15	0,1181
				0,005	0,0036
52645-53-1	<i>Permethrin</i>	95,3	1,21	0,15	0,1181
				0,005	0,0039
52315-07-8	<i>Cypermethrin</i>	97,5	1,191	0,15	0,1228
				0,005	0,0041
72963-72-5	<i>Imiprothrin</i>	51,1	0,979	0,3	0,1566
				0,01	0,0052
89997-63-7	<i>Pyrethrin</i>	50,3	0,912	0,3	0,1655
				0,01	0,0055

Tal como se representa en la Figura 4.4, el Eucaliptol no presenta diferencias significativas en tiempo de volteo para las dosis entre 1,5μL y 5μL donde la mortalidad a las 24h es superior al 60 %.

La Figura 4.5 muestra el tiempo de volteo de las cucarachas para los piretroides y piretrinas a las dosis de estudio indicadas en la Tabla 4.7. Se representa un gráfico de intervalos utilizando las desviaciones estándar

individuales de cada dosis de estudio. El gráfico de intervalos expresa también el valor medio de cada intervalo y se han utilizado únicamente los tiempos de volteo de los individuos que han presentado mortalidad a las 24 horas.

Tabla 4.8: Resultados de mortalidad a las 24 horas desde la aplicación del producto de ensayo.

Molécula	Cantidad (µl)	Nº individuos	% Mortalidad 24h
Eugenol	2,50	6	50,00
Carvacrol	2,50	6	50,00
Timol	2,50	6	66,67
Linalol	2,50	6	50,00
Citral	2,50	6	33,33
Eucaliptol	2,50	12	91,67
Eugenol	5,00	6	100,00
Carvacrol	5,00	6	100,00
Timol	3,34	6	100,00
Linalol	5,00	6	100,00
Citral	5,00	6	100,00
Eucaliptol	5,00	6	100,00

De todos los piretroides estudiados, Praletrina y Piretrina son los más rápidos en actuar cuando la dosis de aplicación es de 0,15 mg. Sin embargo, al reducir la dosis de aplicación 30 veces se triplica el tiempo de volteo en el caso de la Praletrina. En la mayoría de los piretroides, la variabilidad de la respuesta aumenta al reducir la dosis de aplicación de la sustancia y existen diferencias significativas entre las dosis estudiadas, con la excepción de Permetrina.

Cabe destacar que los tiempos de volteo obtenidos con las dosis estudiadas de Eucaliptol son similares a las respuestas de las sustancias piretroides

comerciales. Sin embargo, las dosis necesarias son aproximadamente 20 veces superiores para que el Eucaliptol consiga la misma mortalidad con un KD similar.

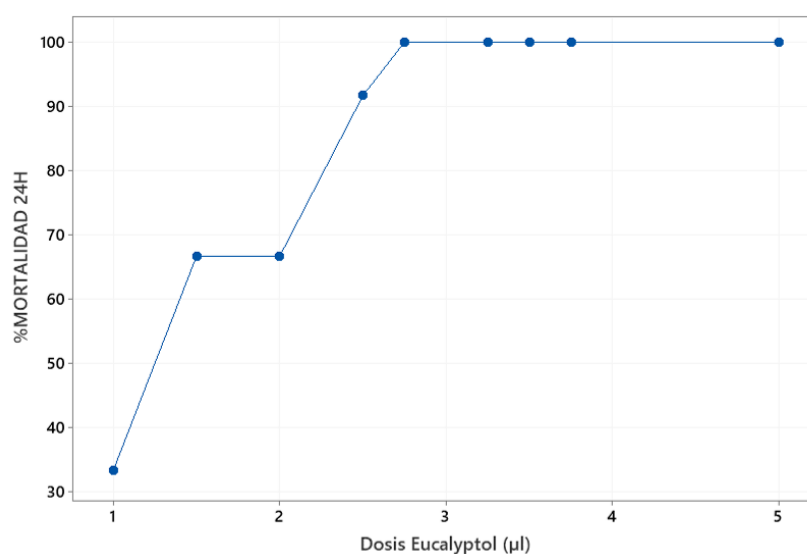


Figura 4.2: Mortalidad a las 24h del Eucaliptol en función de la dosis de aplicación

Los estudios para evaluar la actividad sinergista de una sustancia consisten en adicionar una cantidad conocida de la sustancia de estudio sobre una disolución con una concentración de algún piretroide que sea letal en el insecto objetivo, pero que a la vez permita evaluar el grado de mejora que aporta la sustancia. Tras evaluar los resultados de mortalidad y KD de los piretroides se considera adecuado el uso de Praletrina como piretroide a utilizar en los estudios de sinergia además, esta sustancia se utiliza en la mayoría de las formulaciones de productos insecticidas comerciales para uso tópico en insectos rastreros.

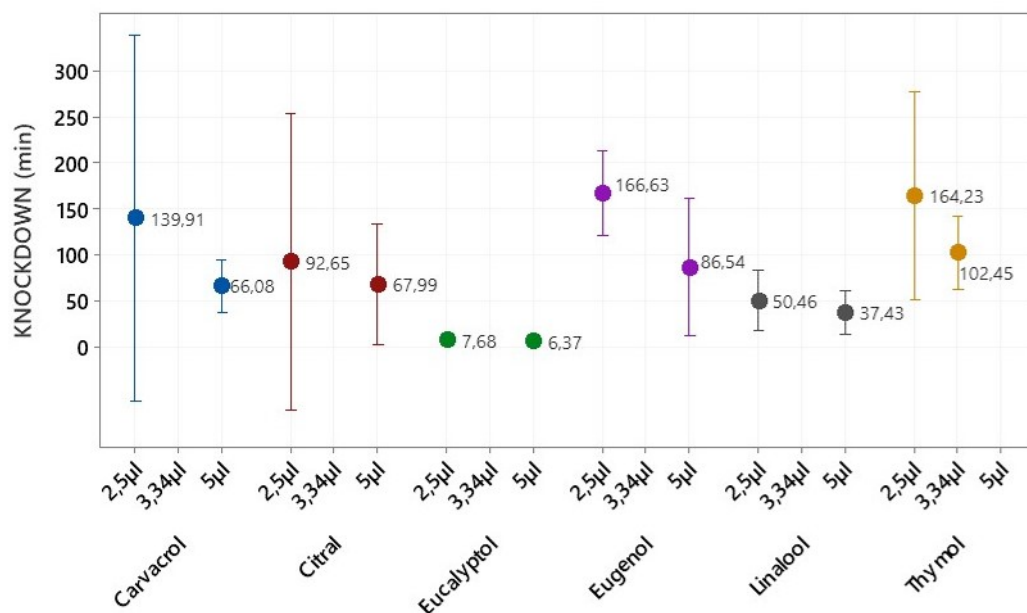


Figura 4.3: KD expresado en minutos, de las sustancias de estudio a distintas dosis.

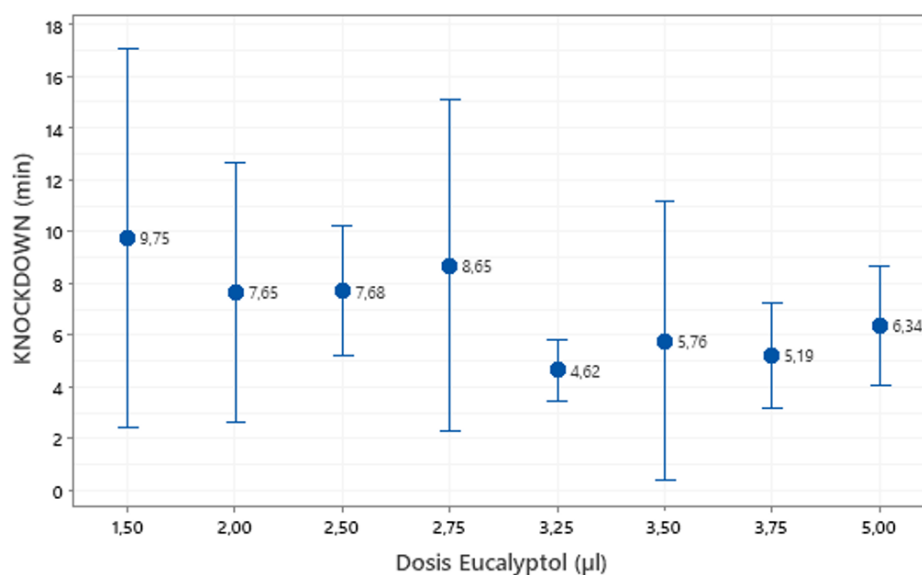


Figura 4.4: Toxicidad, expresada como tiempo de volteo, del Eucalyptol a distintas dosis

Se realizan estudios de aplicación tópica sobre *Periplaneta americana* a dos dosis de aplicación utilizando como disolventes etildiglicol y DMF. Los resultados que se recogen en la Tabla 4.9 indican que una dosis de 0,05 % (0,0025 mg) consigue alcanzar un 90-95 % de mortalidad y como se ha comentado anteriormente, los KD aumentan significativamente al reducir la dosis de aplicación. Por tanto, se considera adecuado el uso de Praletrina al 0,05 % para evaluar la sinergia de las sustancias de estudio ya que se puede determinar si existe una reducción significativa del KD y un aumento de la mortalidad (hasta 100 %) al añadir las sustancias.

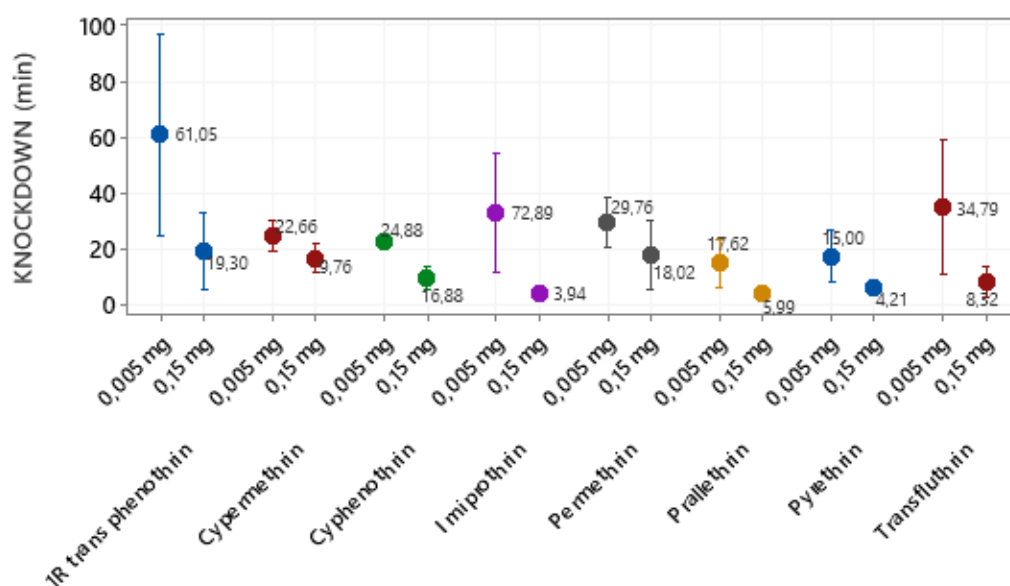


Figura 4.5: KD expresado en minutos, de piretroides y piretrinas a distintas dosis.

Tabla 4.9: Valores de mortalidad a las 24 horas de Praletrina en etildiglicol y DMF a distintas dosis de aplicación sobre *Periplaneta americana*.

Sustancia	Dosis por individuo (mg)	Dosis por individuo (% p/p)	Disolvente	N	Mortalidad 24h
Praletrina	0,005	0,1	Etildiglicol	56	100 %
Praletrina	0,0025	0,05	Etildiglicol	54	94,4 %
Praletrina	0,005	0,1	DMF	54	100 %
Praletrina	0,0025	0,05	DMF	51	90,2 %

4.1.3 Cálculo de las interacciones entre VSSC y AChE de la *Periplaneta americana* y los Terpenoides y Piretroides

Después de cuantificar la actividad biocida *in vivo* de las sustancias piretroides y terpenoides tomadas como controles positivos, se calculó la energía de unión de estas moléculas con el sitio activo de la estructura molecular del canal de sodio y de AChE para *Periplaneta americana*. Esto nos permite relacionar la potencia insecticida real con el modelo computacional que predice la unión de la molécula (ligando) en el sitio activo de la proteína (receptor). La preparación de la estructura de las dianas biológicas se realiza tal como se describe en el capítulo de materiales y métodos. Las energías de enlace se obtienen con la metodología Glide y finalmente se recalculan con el método MMGBSA según lo descrito en la Sección 3.2. La Tabla 4.10 muestra los resultados obtenidos para estas energías según se utilicen las moléculas de terpenoides (izquierda) y piretroides (derecha) respectivamente, expresados en kcal/mol. De acuerdo con la definición de esta energía, cuanto más negativo es el resultado, mayor interacción entre el receptor y la molécula.

En el caso de los terpenoides, la Tabla 4.10 muestra que el Eucaliptol es la molécula con menor energía de enlace en la estructura de la AChE y los valores obtenidos en la estructura del canal de Na_v tampoco son relevantes. Sin embargo, es el Eucaliptol el que mejores resultados ha presentado en los estudios *in vivo*. Al analizar la actividad de los piretroides en estructura del canal de Na_v de *Periplaneta americana* (Na_v PaS) se observa que no encajan en el mismo sitio activo que el ligando cristalográfico, sino que presentan múltiples contactos en una zona más interna del poro (Figura 4.6). En la Na_v PaS se ha incluido como referencia el ligando cristalográfico TTX, con una energía de interacción de $-48,60$ kcal/mol.

Tabla 4.10: Energías de enlace de los terpenoides (izquierda) y piretroides/piretrinas (derecha) en la estructura molecular de Na_v y AChE para *Periplaneta americana*.

Molécula	Na_v PaS	AChE
Eucaliptol	-21.26	-28.40
Citral	-28.05	-34.88
Linalol	-25.81	-35.40
Carvacrol	-22.07	-36.83
Eugenol	-19.87	-32.09
Timol	-20.44	-31.97

Molécula	Na_v PaS	AChE
<i>1R-trans</i> fenotrina	-36.8	-50.50
Praetrina	-46.45	-36.6
Permetrina	-34.77	-56.42
Cipermetrina	-45.98	-55.14
Extracto de piretro (II)	-51.72	-45.30
Cifenotrina	-45.17	-48.36
Transflutrina	-31.71	-47.56
Imiprotrina	-37.96	-46.69
Tetrodotoxina (TTX)	-48.60	

De la misma manera que ocurre con los piretroides, la molécula de Eucaliptol entra en una zona más interna del poro que el resto de terpenoides aunque con una interacción menor. En la Figura 4.7 se representa la inhibición experimental de los distintos terpenoides frente al TTX como referencia de inhibidor conocido

para Na_v PaS, donde se puede ver como el Eucaliptol se sitúa en una zona más interna del canal.

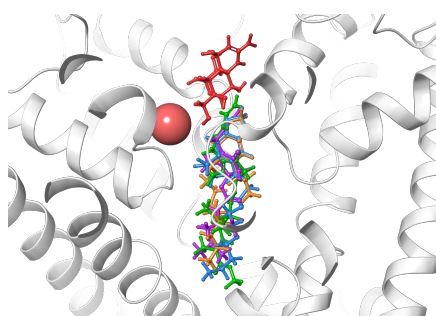


Figura 4.6: Estructura Na_v PaS para *Periplaneta americana*; la esfera representa el sodio, en rojo la molécula TTX y abajo el resto de piretroides.

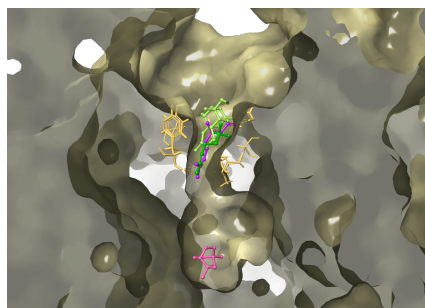


Figura 4.7: Comparación del inhibidor experimental de los terpenoides en Na_v PaS (Eucaliptol en rosa, Citral en morado y Linalol en verde oscuro) con TTX (en verde).

Este hallazgo contribuye notablemente en la búsqueda de nuevas sustancias insecticidas para la cucaracha americana, ya que la posición de enlace del Eucaliptol en la estructura del canal Na_v muestra una actividad insecticida significativa incluso con energía de enlace inferiores a -30 kcal/mol.

En el caso de la estructura de AChE para *Periplaneta americana*, obtenida por homología tomando como referencia el trabajo de Singh *et al.* [92], se obtuvieron energías de enlace para los piretroides superiores a -45 kcal/mol en la mayoría de las moléculas de estudio. Esto es indicativo de que los piretroides no sólo actúan inhibiendo la Na_v PaS sino que también presentan inhibición de la estructura de AChE y pone de manifiesto la importancia del estudio de este mecanismo de acción para determinar moléculas insecticidas. Sin embargo, las moléculas de terpenoides estudiadas cuya inhibición en AChE para otros organismos está bien documentada (ver Tabla 4.3) presentan valores de energía

de enlace entorno a -30 kcal/mol.

En este caso, terpenoides y piretroides se posicionan en la misma zona de la estructura de AChE desarrollada para *Periplaneta americana* tal y como se representa en la Figura 4.8.

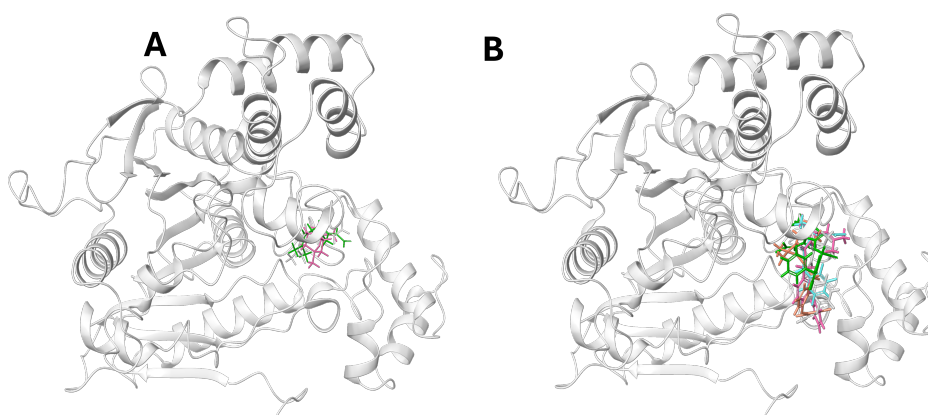


Figura 4.8: Comparación inhibido experimental de los terpenoides (imagen A) frente a los piretroides (imagen B) para AChE en *Periplaneta americana*

4.2 Nuevos inhibidores para VSSC

En este apartado se ha realizado un cribado *in silico* y ensayos *in vivo* de la base de datos DB, para encontrar nuevos compuestos que presenten un potencial efecto como insecticidas o sinergistas para los canales Na_v de *Periplaneta americana*. En primer lugar, se presenta la validación de los dos métodos basados en ligandos, Glide y METADOCK 2.0, para comprobar que reproducen correctamente el sitio de unión del ligando cristalográfico. Se comprobó también que los piretroides encajan en el mismo sitio activo que el ligando cristalográfico. A continuación se describe el procedimiento del

trabajo de VS que incluyó una simulación basada en consenso implementando Glide y METADOCK 2.0 y, posteriormente, se refinaron las energías de enlace mediante un nivel superior de teoría, MMGBSA. Por último, se identificaron los compuestos más activos para proceder con ensayos *in vivo* de aquellos que estaban comercialmente disponibles. Los resultados presentados en esta sección condujeron al descubrimiento de Miglitol como un nuevo compuesto sinérgico efectivo cuando se combina con formulaciones comerciales de insecticidas que contengan Praletrina. La incorporación de Miglitol aceleró significativamente el KD de la cucaracha americana, proporcionando un 100 % de mortalidad después de 24 horas. Estos resultados abren la puerta a insecticidas mejorados y más seguros.

4.2.1 Validación de los métodos de cribado virtual para VSSC

Fue necesario validar la estructura del canal Na_v de la cucaracha americana *Periplaneta americana* (Na_v PaS) para confirmar que los dos motores de acoplamiento seleccionados (Glide y METADOCK 2.0) reproducían correctamente el modo de unión del ligando presente en la estructura cristalina (TTX). También era un requisito que estas aplicaciones localizaran piretroides, que son inhibidores bien conocidos del canal de sodio de la cucaracha americana [3], en la misma región de Na_v PaS que el TTX. La Figura 4.9 muestra este procedimiento de validación. En el panel de la izquierda, se observa la superposición de la estructura experimental (en rojo) con las poses predichas por Glide (en rojo) y METADOCK 2.0 (verde). Se puede apreciar que la pose computada coincide con la misma ubicación ocupada por el TTX en el núcleo del poro, lo

que se asocia con una desviación cuadrática media (RMSD) de solo 0.62 y 0.68 Å para Glide y METADOCK 2.0, respectivamente. En el panel de la derecha, los resultados de Glide demuestran que los seis piretroides seleccionados (Piretrina, Butóxido de piperonilo, Cipermetrina, Fenotrina y Praletrina) se acoplan correctamente en el núcleo central, como se espera de un inhibidor de Na_v PaS. El muestreo mejorado con METADOCK 2.0 también localizó los piretroides en esa misma región. El refinamiento con MMGBSA arrojó una energía de unión de $-47,74$ kcal/mol (Glide) y $-51,77$ kcal/mol (METADOCK 2.0) para el TTX, dependiendo de si la pose ha sido obtenida con Glide o METADOCK 2.0. Como era de esperar, los piretroides alcanzaron el núcleo del poro con energías cercanas. La interacción máxima se predice para la Piretrina ($-51,72$ kcal/mol) y el Butóxido de piperonilo ($-48,13$ kcal/mol), mientras que otros piretroides se encuentran en el rango de aproximadamente $-46/ -35$ kcal/mol. De hecho, estas cifras no solo nos permitieron comparar nuestro protocolo, sino también utilizar estos valores predichos para el TTX y los piretroides como referencia para saber a qué energía y tiempo de interacción un compuesto podría ser considerado como un inhibidor de Na_v PaS.

4.2.2 Aplicación VS a Na_v PaS

Aunque el objetivo principal es diseñar una estrategia de consenso para el descubrimiento de nuevos insecticidas, el costo computacional es un parámetro crucial en cualquier procedimiento de VS. Por lo tanto, esta sección informa sobre los compuestos descubiertos, así como los recursos necesarios para completar cada uno de los pasos propuestos en el VS.

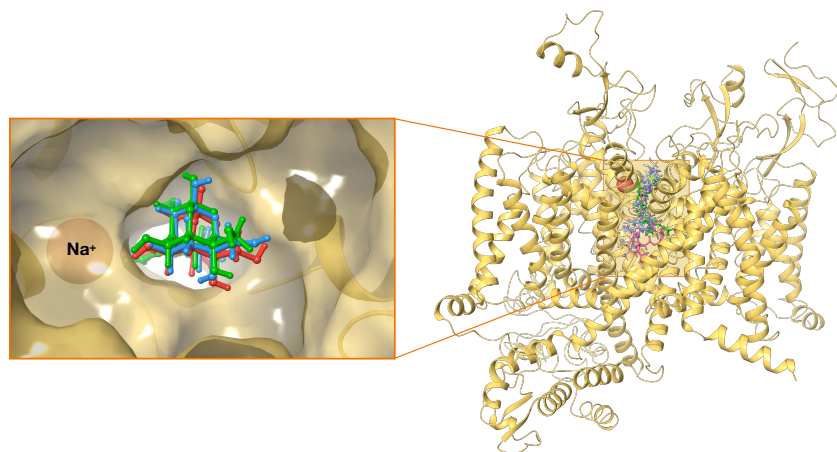


Figura 4.9: Panel izquierdo: superposición de las estructuras de TTX en el entorno del núcleo del poro de Na_vPaS : estructura cristalográfica en azul y geometría de *redocking* por Glide (rojo, RMSD = 0.62 Å) y METADOCK 2.0 (verde, RMSD = 0.68 Å). El canal se muestra con caricaturas y superficies amarillas. El Na^+ se muestra como una bola. Panel derecho: superposición de las poses predichas para los piretroides.

El flujo de trabajo de Glide se inició con el paso HTVS, que utiliza la base de datos DB como entrada, es decir, 9.137 compuestos. Todos los parámetros de Glide están configurados por defecto. En ese protocolo estándar, se retiene el 10 % de todos los compuestos para los siguientes pasos, de modo que HTVS generó 913 compuestos candidatos como salida. El tiempo total de ejecución del procedimiento HTVS fue de 51 minutos. Los 913 compuestos seleccionados se alimentaron posteriormente en el procedimiento SP, que se completó en 1 hora y 11 minutos. SP generó 100 compuestos candidatos como salida que fueron seleccionados para la última etapa del pipeline de VS. Es precisamente esta última etapa la que diferencia ambos flujos de trabajo. En el flujo de trabajo basado en Glide, las simulaciones de acoplamiento de estos 100 compuestos con el sitio activo del Na_vPaS se evaluaron con el régimen más refinado XP, en el cual se retuvieron hasta 10 poses por compuesto. Ese acoplamiento final

requirió 7 horas y 42 minutos de tiempo de ejecución en la CPU, lo que significa un promedio de aproximadamente 277 segundos por compuesto. El flujo de trabajo estándar de VS se completó calculando la energía libre de unión de los compuestos mejor clasificados, lo cual tardó 1 hora y 24 minutos. Para el registro, las simulaciones de Glide y MMGBSA se llevaron a cabo en una estación de trabajo Intel Xeon™ E5 2600v3 de 12 núcleos a 2.4GHz, equipada con 23GB de memoria RAM DDR4 y un disco duro SSD de 256GB.

El flujo de trabajo de METADOCK 2.0 también realizó una simulación con los 100 compuestos previamente seleccionados. Sin embargo, a diferencia de Glide, METADOCK 2.0 realizó un acoplamiento a ciegas (sistemático) evaluando la interacción en los 1.377 carbonos alfa (puntos) a lo largo de la superficie del canal de sodio. La Tabla 4.11 muestra los parámetros de configuración de METADOCK 2.0 obtenidos del software HYPERDOCK. Entre esos valores, es importante destacar que la población inicial generada es de 300 (INEIni). Luego, se generaron un total de 413.100 poses diferentes a lo largo de la superficie del canal de sodio, es decir, 1.377 carbonos alfa x 300 individuos en cada punto. Por lo tanto, fue imprescindible un código acelerado por GPU para realizar tales simulaciones de acoplamiento a ciegas en biosistemas complejos como el Na_v PaS. De hecho, incluso con ese gran número de poses, METADOCK 2.0 fue capaz de procesar estos 100 compuestos en solo 8 horas y 51 minutos. Ese rendimiento llevó a un tiempo de ejecución promedio de 306 segundos por compuesto cuando se ejecuta en un dispositivo NVIDIA A100 con 6912 núcleos CUDA, 40 GB de memoria HBM2 y 1.9 TB/segundo. La aceleración de las simulaciones de acoplamiento a ciegas fue posible ya que METADOCK 2.0 se desarrolló desde cero en el lenguaje de

programación CUDA, por lo que es completamente compatible con las GPU de NVIDIA. Aunque los modelos subyacentes de Glide y METADOCK 2.0 se basan en fundamentos teóricos disímiles, cabe señalar que METADOCK 2.0 tardó solo 0,74 milisegundos por pose, significativamente más rápido que los 27,72 segundos por pose de Glide, más de cuatro órdenes de magnitud de diferencia. Finalmente, se seleccionaron las mejores 100 poses de cada ligando (10.000 poses) que se sometieron a refinamiento MMGBSA, con un costo de 166 horas y 31 minutos.

Tabla 4.11: Configuración de parámetros seleccionada por HYPERDOCK con la cual se han desarrollado los experimentos de METADOCK.

Parámetro	Valor	Descripción
INEIni	300	Número de conformaciones iniciales del ligando.
IIEFlex	20	La intensificación de la flexibilidad en las funciones de mejora.
PEIIni	100	Porcentaje de las mejores conformaciones que se mejoran en la función Initialize.
IIEIni	200	La intensificación de la mejora en la función Initialize.
PBEIni	100	Porcentaje de las mejores conformaciones que se incluirán en el conjunto inicial para las siguientes iteraciones.
PWEIni	0	Porcentaje de las peores conformaciones que se incluirán en el conjunto inicial para las siguientes iteraciones.
PBEsel	50	Porcentaje de las mejores conformaciones que se seleccionarán para la combinación.
PWEsel	50	Porcentaje de las peores conformaciones que se seleccionarán para la combinación.
PBBCom	50	Porcentaje de las mejores-mejores conformaciones que se combinarán.
PWWCom	20	Porcentaje de las peores-peores conformaciones que se combinarán.
PBWCom	10	Porcentaje de las mejores-peores conformaciones que se combinarán.
PMUCom	20	Porcentaje de las mejores conformaciones de la combinación que serán mutadas.
IMUCom	10	La intensificación de la mutación de los elementos generados por la combinación.
PEIImp	50	Porcentaje de las mejores conformaciones de la combinación que se mejorarán.
IIEImp	100	La intensificación de la mejora de los elementos generados por la combinación.
PBEInc	50	Porcentaje de las mejores conformaciones que se incluirán en el conjunto de referencia.
NIREnd	3	Número máximo de pasos sin mejora.
MNIEnd	3	Número máximo de iteraciones con o sin mejora.

Como se ha discutido, los resultados numéricos de Glide y METADOCK 2.0 no son directamente comparables ya que se basan en diferentes funciones de

puntuación. El uso de MMGBSA nos permitió re-evaluar la lista de los mejores clasificados con un nivel de teoría más refinado mientras se homogenizan las energías de unión, lo que hace posible dicha comparación. Una de las principales diferencias entre el flujo de trabajo estándar Glide–MMGBSA y el muestreo mejorado con METADOCK 2.0–MMGBSA es que el primer enfoque realiza el VS en el sitio de unión (núcleo del poro) mientras que el segundo explora toda la estructura del objetivo Na_vPaS . Como consecuencia, todas las poses predichas por Glide están ubicadas "dentro del canal". Por el contrario, METADOCK 2.0 localizó poses “dentro del canal” (en el núcleo del poro, como el TTX y el catión Na^+) y “fuera del canal”. El panel superior de la Figura 4.10 clasifica las poses de METADOCK 2.0 según los valores calculados *vs.* el número de residuo del punto seleccionado. Las poses generadas “dentro del canal” y “fuera del canal” están circundadas en azul y rojo, respectivamente.

Vale la pena destacar el número similar de poses dentro y fuera del canal proporcionadas por METADOCK 2.0. Este hallazgo demostró que los ligandos podrían dirigirse a varios residuos. También es notable que METADOCK 2.0 predice tres áreas de residuos: aproximadamente 0-400, 400-900 y 900-1300. La mayor interacción (puntuación METADOCK 2.0 más negativa) se encuentra en la región de los residuos 500-900. Una inspección visual demostró que no todos estos residuos corresponden al núcleo del poro. Como consecuencia, un VS guiado por el sitio podría producir una visión limitada del modo de unión al objetivo Na_vPaS . El panel inferior de la Figura 4.10 representa las energías de interacción de las poses de METADOCK después del refinamiento con MMGBSA. El refinamiento con MMGBSA impactó significativamente en la clasificación por METADOCK 2.0 al compactar la dispersión energética.

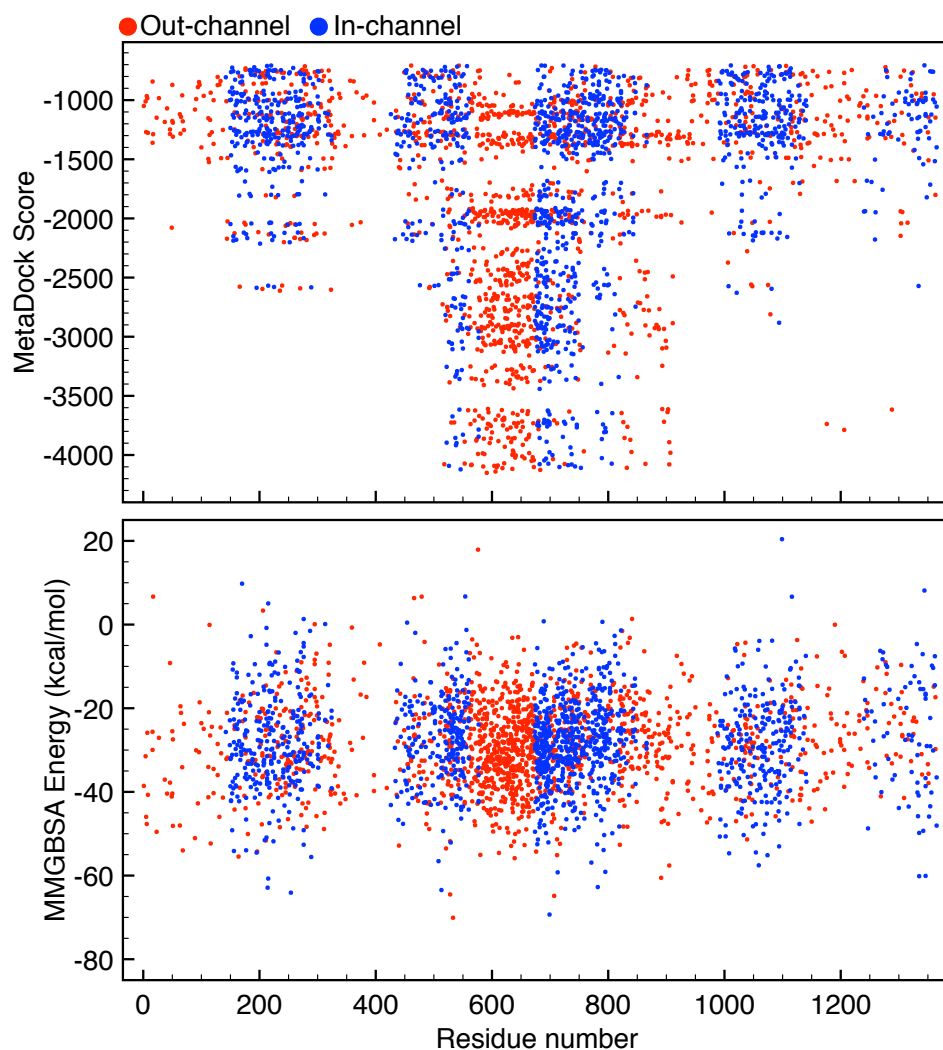


Figura 4.10: Resultados con METADOCK 2.0 (panel superior) y re-evaluación subsiguiente de todas las poses generadas con MMGBSA (panel inferior). Como un acoplamiento a ciegas, se explora toda la superficie del objetivo Na_vPaS . Las poses dentro del núcleo del poro se muestran en azul (dentro del canal), mientras que las poses fuera del canal se representan con puntos rojos (fuera del canal).

De hecho, tres regiones de residuos todavía son visibles, aunque las poses con la mayor energía de unión "dentro del canal" (umbral de -60 kcal/mol) ahora se detectan en estas tres áreas de residuos. Los compuestos "dentro del canal" con las energías de unión más altas se extrajeron para completar el análisis computacional.

La Tabla 4.12 muestra los mejores compuestos obtenidos por los dos flujos de trabajo de VS propuestos. Como se demuestra mediante los resultados numéricos, no hay una correlación lineal entre los valores de acoplamiento y las energías de interacción de MMGBSA, conclusiones que son válidas tanto para Glide como para METADOCK 2.0. Como era de esperar, el acoplamiento es una herramienta valiosa para evaluar posibles modos de unión (poses) de los fármacos dentro de los centros activos de las biomoléculas. Sin embargo, las energías de interacción necesitan ser refinadas con niveles de teoría más avanzados. Este post-procesamiento parece ser obligatorio independientemente del motor de acoplamiento utilizado. Además, la Tabla 4.12 demuestra que las poses generadas con METADOCK 2.0 están mejor ancladas al objetivo Na_v PaS. El flujo de trabajo estándar Glide-MMGBSA produce una ventana energética de $-58,03/ -33,39$ kcal/mol en contraste con los valores más negativos derivados del muestreo METADOCK 2.0-MMGBSA, con una lista de los mejor clasificados con energías en el rango de $-74,25/ -60,25$ kcal/mol. En otras palabras, METADOCK 2.0 aumenta la interacción con el objetivo al estabilizar la pose, un resultado que podría estar directamente relacionado con la mayor cantidad de poses generadas.

Tabla 4.12: Compuestos mejor clasificados predichos por el protocolo estándar de Schrödinger (valores Glide, en kcal/mol) y por muestreo con acoplamiento a ciegas METADOCK 2.0. A efectos de comparación, estas listas de compuestos se clasifican con la energía libre de unión más refinada a nivel de teoría MMGBSA. ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MMGBSA}}$, en kcal/mol)^a

Flujo estándar			Muestreo mejorado		
Molécula ^b	Glide	$\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MMGBSA}}$	Molécula ^b	METADOCK 2.0	$\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MMGBSA}}$
Bedoradrina	-4.31	-58.03	DB02629	-1319.10	-74.25
DB02732	-8.05	-56.34	Plazomicina	-2155.52	-70.08
Plazomicina	-11.30	-54.81	DB01763	-3657.78	-69.32
Dihidroestreptomicina	-7.01	-53.68	Milvexiano	-757.69	-68.76
DB01721	-3.80	-51.27	Nicofuranosa	-957.84	-68.38
Indinavir	-0.60	-50.67	DB04190	-1118.17	-67.12
Imidurea	-6.94	-50.45	Diquafosol	-3761.54	-65.58
Capivasertib	-0.32	-50.07	DB01690	-3706.87	-64.86
Netilmicina	-6.12	-46.79	Ceforanida	-1375.91	-64.51
Acarbosa	-7.79	-40.42	Acarbosa	-2139.54	-63.46
Miglitol	-7.83	-33.39	Netilmicina	-2241.69	-60.25

^a Solo se consideran para discusión las moléculas dentro del canal.

^b Se proporcionan los nombres genéricos cuando están disponibles, de lo contrario, las moléculas se identifican por códigos DB.

Con respecto a la naturaleza química de los compuestos mejor clasificados, el flujo de trabajo estándar llegó a la Bedoradrina como el mejor clasificado por MMGBSA ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MMGBSA}} = -58,03$ kcal/mol), más negativo que la energía calculada para el TTX cristalográfico en el marco Glide–MMGBSA ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MMGBSA}} = -47,74$ kcal/mol). La Bedoradrina es un tetralina (un benceno fusionado a un ciclohexano), un novedoso agonista β -adrenérgico intravenoso [122, 123] que, hasta donde se conoce, nunca ha sido propuesto como insecticida. El muestreo mejorado con METADOCK–MMGBSA situó la molécula con el có-

digo DB02629 (N,N-[2,5-O-di-2-fluoro-bencil-glucaril]-di-[1-amino-indan-2-ol]) en el primer lugar con una energía de unión de $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MMGBSA}} = -74,25$ kcal/mol, que es la interacción más grande predicha por nuestro protocolo computacional. Esta molécula pertenece a la familia de los indanos (un ciclopentano fusionado a un anillo de benceno), que ha sido propuesta como inhibidores de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV) [124]. Ambas moléculas están en el grupo experimental, es decir, aún no están aprobadas para su uso en hospitales. Curiosamente, las moléculas en primer lugar en estas dos listas no son coincidentes en ambas listas. Adentrándonos en las listas (valores MMGBSA menos negativos), el primer consenso se alcanzó con la Plazomicina, que ocupa el tercer lugar en el flujo de trabajo estándar ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MMGBSA}} = -54,81$ kcal/mol) *vs* el segundo en el muestreo mejorado ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{MMGBSA}} = -70,08$ kcal/mol). Una inspección detallada de la Tabla 4.12 muestra que la Plazomicina también exhibió valores significativamente negativos tanto en la escala Glide ($-11,30$ kcal/mol) como en la de METADOCK 2.0 ($-2155,52$). Este compuesto (originalmente etiquetado como ACHN-490) es un derivado aminoglucósido de nueva generación con una potente actividad antibiótica clínica [125]. Fue aprobado por la FDA en 2018 para el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacteriaceae* multirresistente [126]. Es notable que uno de los efectos secundarios asociados a los antibióticos aminoglucósidos es el bloqueo neuromuscular. Ese efecto indeseado se debe a la interacción con las proteínas de los canales. Los aminoglucósidos pueden actuar como bloqueantes de los poros en algunos canales activados por voltaje, incluidos los canales de Ca^{2+} y K^{+} [127]. Como demostraron Wright y colaboradores [128], los aminoglucósidos también pueden inhibir los canales de sodio en modelos de ratas *in-vivo*. Esa evidencia previa respalda aún más nuestro descubrimiento y consolida la Plazomicina

como un nuevo y prometedor bloqueador de Na_v PaS.

Desafortunadamente, estos tres candidatos (Bedoradrina, DB02629 y Plazomicina) son comercialmente inaccesibles o están asociados a precios prohibitivos para el desarrollo de aplicaciones industriales de insecticidas. En consecuencia, se decidió ampliar la búsqueda descendiendo en la lista de clasificación. Como se mencionó anteriormente, METADOCK-MMGBSA detectó varios compuestos con mayor energía de unión "dentro del canal" (umbral de -60 kcal/mol). En cuanto a Glide-MMGBSA, se observaron valores más moderados. Por lo tanto, se amplió la búsqueda en el flujo de trabajo estándar imponiendo la ventana energética de los piretroides (aproximadamente $-48/ -35$ kcal/mol). Todos los compuestos que cumplieron con estos criterios de inclusión se enumeran en la Tabla 4.12. Se realizó una búsqueda sistemática en proveedores comerciales para identificar candidatos comprables, los cuales pasaron a la etapa final de pruebas *in vivo*.

4.2.3 Ensayos *in vivo* a actuar sobre Na_v PaS

La Tabla 4.13 muestra los principales ingredientes activos, disolventes y emulsionantes incluidos en las soluciones a ensayar que se describen en la Tabla 4.14. Cada uno de estos materiales fue proporcionado por un proveedor particular y también se identifica con su número CAS. En el caso de los ingredientes activos, la pureza de todos ellos es superior al 98 %.

Tabla 4.13: Ingredientes activos principales, disolventes y emulsionantes utilizados para pruebas *in vivo*.

Nº CAS	Materiales	Proveedor
72432-03-2	Miglitol	Target Molecule Corp.
56180-94-0	Acarbosa	Glentham Life Sciences Ltd
56391-57-2	Sulfato de netilmicina	Glentham Life Sciences Ltd
1143532-39-1	Capivasertib	Target Molecule Corp.
128-46-1	Dihidroestreptomicina	Carbosynth Ltd
23031-36-9	Praletрина	Endura S.p.A.
7732-18-5	Agua	–
68-12-2	Dimetilformamida (DMF)	Fluorochem
67-68-5	Dimetilsulfóxido (DMSO)	TCI Europe N.V
–	Tween 20	Croda Iberica SA
70559-25-0	Emulsogen TS100	Clariant Produkte (Deutschland) GmbH
–	Calsogen 4814	Clariant Produkte (Deutschland) GmbH
61788-85-0	Sabowax EL-H 40	Sabo SpA

La Tabla 4.14 muestra las diferentes soluciones propuestas para las pruebas *in vivo*. Dado que las moléculas de prueba estaban en estado sólido, fue necesario preparar una solución de prueba que permitiera la aplicación tópica en el insecto. Las soluciones de prueba contenían un 3 % de la molécula a ensayar.

Además, también contenían el disolvente con la mayor afinidad química para cada molécula, con el fin de lograr la concentración deseada. Es importante destacar que los disolventes se probaron previamente para evaluar su toxicidad en insectos, aplicando a las cucarachas una solución con el 100 % de cada disolvente. Finalmente, las soluciones de prueba también incluyeron el insecticida activo, que siempre es Praletрина en una concentración del 0,05 %.

Tabla 4.14: Composición de las diferentes soluciones de prueba que se aplicarán a los modelos de cucarachas.

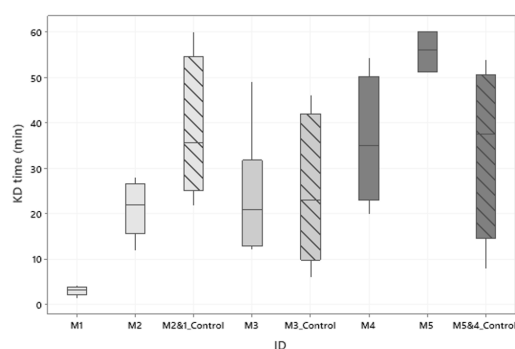
ID	Molécula			Piretroide			Solvente		
	Nombre	%	mg	Nombre	%	mg	Nombre	%	mg
M1	Miglitol	3	0,143	Praletрина	0,05	0,0024	DMF	96,95	4,626
M2	Acarbosa	3	0,144	Praletрина	0,05	0,0024	DMF	96,95	4,639
M3	Sulfato de netilmicina	3	0,148	Praletрина	0,05	0,0025	Agua	91,95	4,534
							Tween 20	1,8	0,09
							Emulsogen TS100	0,8	0,04
							Calsogen 4814	0,8	0,04
							Sabowax EL-H-40	1,8	0,09
M4	Capivasertib	3	0,166	Praletрина	0,05	0,0028	DMSO	96,95	5,367
M5	Dihidroestreptomicina	3	0,167	Praletрина	0,05	0,0028	DMSO	96,95	5,406
M2&1_Control	-	-	-	Praletрина	0,05	0,0024	DMF	99,95	4,718
M3_Control	-	-	-	Praletрина	0,05	0,0025	Agua	94,95	4,761
							Tween 20	1,8	0,09
							Emulsogen TS100	0,8	0,04
							Calsogen 4814	0,8	0,04
							Sabowax EL-H-40	1,8	0,09
M5&4_Control	-	-	-	Praletрина	0,05	0,0028	DMSO	99,95	5,498

También se incluyeron en los experimentos *in vivo* tres soluciones de control (M2&1_Control, M3_Control, M5&4_Control) que no incluían los compuestos sinérgicos probados; es decir, solo incluían los disolventes utilizados (Dimetilformamida, Dimetilsulfóxido y agua) y 0,05 % de Praletрина. En el caso de la solución M3, se utilizaron varios emulsionantes (Tween 20, Emulsogen TS100, Calsogen 4814, Sabowax EL-H-40) que permitieron solubilizar la molécula de Sulfato de Netilmicina en agua. Para esta solución de prueba, se utilizó el control M3_Control con una base de agua con emulsionantes en diferentes concentraciones (1.8 % Tween 20, 0.8 % Emulsogen TS100, 0.8 % Calsogen

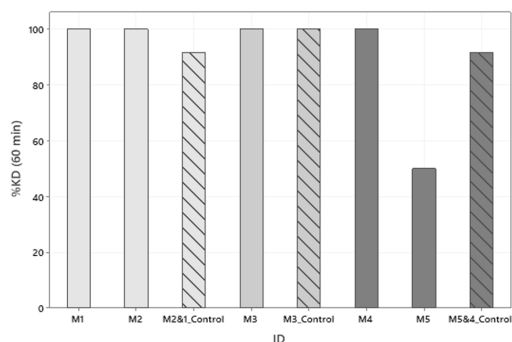
4814, 1.8 % Sabowax EL-H-40). La solución M2&1_Control se utilizó para las soluciones M1 (Miglitol) y M2 (Acarbosa), ya que ambas utilizan el mismo disolvente base (DMF). Lo mismo ocurre con M5&4_Control, que se utilizó para las soluciones M4 (Capivasertib) y M5 (Dihidroestreptomicina) ya que ambas comparten DMSO como disolvente base. La Tabla 4.14 también muestra la cantidad (en mg) que recibe el insecto de cada ingrediente incluido en la solución de prueba. Esto corresponde a una aplicación de 5 µl por insecto, tal y como se explicó previamente en el capítulo 3.

La Figura 4.11 muestra las métricas *in vivo* para medir la efectividad sinérgica de cada solución descrita en la Tabla 4.14. La Figura 4.11a muestra el KD (en minutos) de cada solución. Claramente, la solución basada en Miglitol (M1) superó por un amplio margen al resto de soluciones en términos de tiempo de KD, volteando a todas las cucarachas en menos de cinco minutos, mientras que otras soluciones necesitaron más de 30 minutos. El efecto sinérgico se demostró claramente para el Miglitol, ya que mejoró su solución de control con un factor de aceleración de 12X. La segunda solución más prometedora fue la Acarbosa (M2), cuyo KD fue de alrededor de 20 minutos. Esta solución también superó a su control por un amplio margen, pero su mejora no fue tan evidente en comparación con los otros dos controles. M3, M4 y M5 no mostraron un claro efecto sinérgico con los piretroides y, por lo tanto, se descartan como sinérgicos. Las Figuras 4.11b y 4.11c muestran el porcentaje de la población total de cucarachas que voltearon después de 60 minutos de observación continua y después de 24 horas desde la aplicación, respectivamente. Cabe destacar que ambas métricas son bastante diferentes ya que el insecto puede verse inicialmente afectado debido a los impulsos nerviosos causados por la

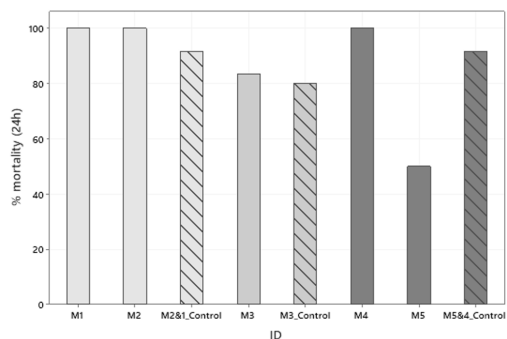
acción de las moléculas de prueba, pero la cucaracha puede recuperarse poco después. De hecho, este fenómeno se refleja en las Figuras 4.11b y 4.11c donde el porcentaje de mortalidad se redujo de 60 minutos a 24 horas en algunas de las soluciones (M3, M3_Control).



(a) Tiempo de KD en minutos (min) para las diferentes mezclas en estudio.



(b) Porcentaje de la población total de cucarachas que se ha volteado después de 60 minutos.



(c) Porcentaje de la población total de cucarachas que ha muerto después de 24 horas.

Figura 4.11: Resultados *in vivo* después de la aplicación de las diferentes mezclas en estudio: tiempo de KD, el porcentaje de la población volteado después de 60 minutos y la mortalidad después de 24 horas.

Es importante destacar que tanto M1 como M2 lograron un 100 % de volteo a los 60 minutos y este 100 % se mantuvo después de 24 horas, lo que les dio un aumento del 25 % en la mortalidad en comparación con su control.

De hecho, ambas, junto con M4, fueron las únicas soluciones que lograron una mortalidad completa después de 24 horas, mejorando el panorama actual de los insecticidas basados en piretroides.

Las dos moléculas que mostraron sinergia con Praletrina, Acarbosa y Miglitol, están descritas como inhibidores de la enzima alfa-glucosidasa que actúa retrasando la absorción de carbohidratos en el intestino delgado. Ambos se diferencian por su estructura química y características farmacológicas: la Acarbosa, introducida hace unos años en el mercado, es un tetrasacárido no absorbible de origen microbiano; el Miglitol es un derivado de la Desoxinojirimicina, estructuralmente similar a los monosacáridos, que se absorbe en más del 60 %, utilizando el mismo transportador intestinal que la glucosa, hecho que no ocurre con la Acarbosa. Después de absorberse no se metaboliza y se elimina rápidamente por vía renal [129].

Tras analizar esta conexión entre ambas moléculas, se pretende comprobar la actividad sinergista de moléculas inhibidoras de alfa-glucosida y similares estructuralmente a las que han mostrado resultados positivos. Se realizaron ensayos de aplicación tópica con cuatro moléculas derivadas de Desoxinojirimicina y con otra molécula, Voglibosa, que es un derivado de la Valiolamina (producto natural que se encuentra en *Streptomyces hygroscopicus*) también presente en la estructura de la Acarbosa. Sus estructuras moleculares se representan en la Figura 4.12.

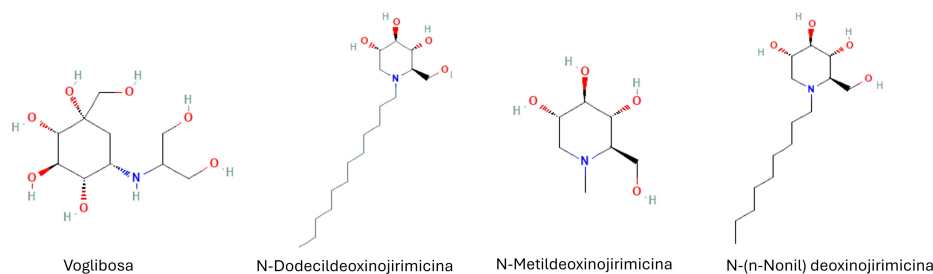


Figura 4.12: Estructura molecular de las sustancias inhibitoras de alfa-glucosidasa propuestas para el ensayo *in vivo*. Fuente: *PubChem Open chemistry database* [45]

En la Tabla 4.15 se indican los ingredientes utilizados en este ensayo de aplicación tópica sobre *Periplaneta americana* identificando mediante nombre y número CAS las moléculas de estudio utilizadas para la preparación de la solución de ensayo. Se indican también las dosis de aplicación de cada molécula y los proveedores de dichos ingredientes. Además, se comprobó en su certificado de análisis que las purezas eran superiores al 98 % en todos los casos.

Tabla 4.15: Identificación de los ingredientes utilizados en el ensayo in-vivo de aplicación tópica.

Molécula	Nº CAS	Proveedor	Dosis de aplicación (mg)
Voglibosa	83480-29-9	—	0,17
Miglitol	72432-03-2	Target Molecule Corp.	0,17
Acarbosa	56180-94-0	Glentham Life Sciences Ltd	0,17
N-(n-Nonil) deoxinojirimicina	81117-35-3	—	0,17
N-(n-Butil) deoxigalactonojirimicina	141206-42-0	—	0,17
N-Metildeoxinojirimicina	69567-10-8	—	0,17
N-Dodecildeoxinojirimicina	79206-22-7	Toronto Research Chemicals (Trc) Canadá	0,16

En este ensayo de aplicación tópica sobre *Periplaneta americana*, se evaluó la actividad sinérgica de las moléculas a un 3 %*p/p* en una disolución de DMSO y añadiendo como piretroide Praletrina al 0,05 %*p/p*, tal como se indica en

la Tabla 4.16. La actividad insecticida de las moléculas de estudio se realizó también al 3 % en DMSO sin presencia de Praletrina. Los resultados del ensayo para evaluar el potencial biocida de las moléculas indicaron que a la dosis de estudio, ninguna de las moléculas fue capaz de producir mortalidad a las 24h desde la aplicación de la solución. En el caso del estudio de una solución que contiene Praletrina al 0,05 %, todas las soluciones de estudio consiguieron un 100 % de mortalidad a las 24h, presentando un ligero aumento sobre la muestra control que no superó el 90 %.

Tabla 4.16: Composición de las soluciones de estudio de moléculas inhibidoras de alfa-glucosidasa.

ID	Molécula		Praletrina	DMSO
	Nombre	%p/p	%p/p	%p/p
6 I	Voglibosa	3		97
9 I	N-(n-Nonil) deoxinojirimicina	3		97
10 I	N-(n-Butil) deoxigalactonojirimicina	3		97
11 I	N-Metildeoxinojirimicina	3		97
12 I	N-Dodecildeoxinojirimicina	3		97
TS 6 I	Voglibosa	3	0,05	96,95
TS 7 I	Miglitol	3	0,05	96,95
TS 8 I	Acarbosa	3	0,05	96,95
TS 9 I	N-(n-Nonil) deoxinojirimicina	3	0,05	96,95
TS 10 I	N-(n-Butil) deoxigalactonojirimicina	3	0,05	96,95
TS 11 I	N-Metildeoxinojirimicina	3	0,05	96,95
TS 12 I	N-Dodecildeoxinojirimicina	3	0,05	96,95
Praletrina+DMSO			0,05	99,95

La Figura 4.13 muestra los resultados del KD durante el tiempo de observación del ensayo, lo que nos permitió medir la sinergia con respecto a la

solución de estudio que no contenía la sustancia activa, en este caso, Praletrina. Para el cálculo estadístico se excluyeron los datos de KD que no presentaban mortalidad a las 24h. En este caso, el análisis estadístico ANOVA de un solo factor realizado con el programa *Minitab 20* mostró diferencias significativas en el KD tanto para Acarbosa como para las cuatro moléculas derivadas de Deoxinojirimicina.

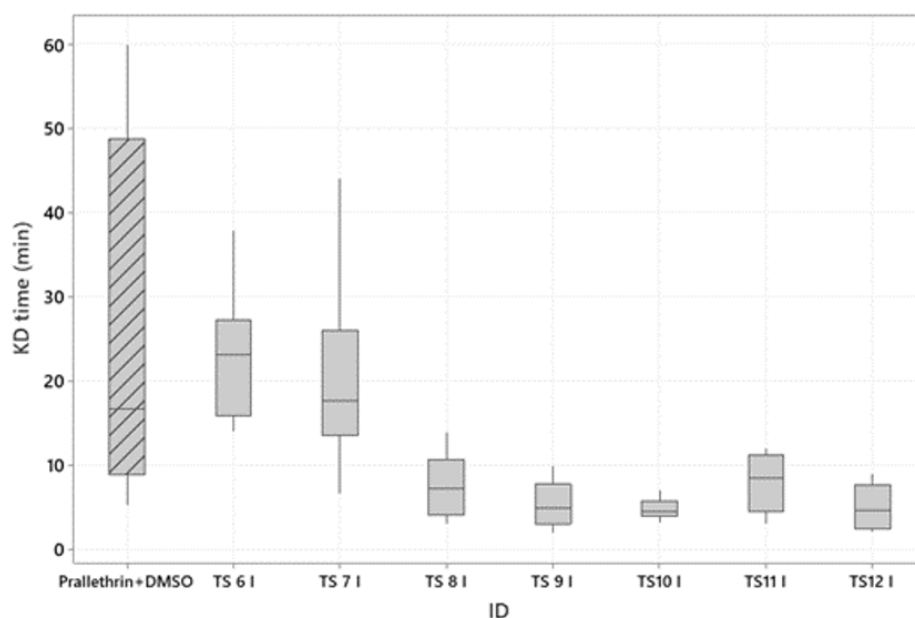


Figura 4.13: Tiempo de KD en minutos (min) para las diferentes soluciones de estudio de las sustancias inhibidoras de alfa-glucosidasa propuestas.

En la Tabla 4.17 se presentan los valores de media y desviación estándar del tiempo de volteo a las 24h y se calculó la diferencia respecto a la solución control que no contiene Praletrina. En todas las soluciones estudiadas se registró una reducción del KD que, en el caso de las nuevas moléculas de estudio redujo entre un 70 - 80 % el momento de la muerte de la cucaracha.

Tabla 4.17: Resultados de media, desviación estándar de los tiempos de volteo a las 24h. Cálculo de la reducción de tiempos respecto al control sin Praletrina.

Molécula	N	KD Media (min)	Desv.Est.	Δ KD (min)	Δ KD (%)
Vogliobosa	10	22,93	7,24	5,07	18,1
Miglitol	12	20,15	10,37	7,85	28,03
Acarbosa	12	7,68	3,83	20,32	72,57
N-(n-Nonil) deoxinojirimicina	6	5,35	2,84	22,65	80,89
N-(n-Butil) deoxigalactonojirimicina	6	4,808	1,295	23,192	82,82
N-Metildeoxinojirimicina	6	8,01	3,56	19,99	71,39
N-Dodecildeoxinojirimicina	6	5,06	2,70	22,94	81,93

Durante el análisis de los resultados de este ensayo, se detectaron diferencias en el KD de Miglitol y Acarbosa con Praletrina en función del disolvente utilizado en el ensayo, por tanto, se amplió el estudio realizando nuevos ensayos para analizar la sinergia de estas moléculas utilizando como matriz una disolución de DMF con 0,05 %p/p de Praletrina frente a una disolución de DMSO con la misma concentración de activo.

En la Figura 4.14 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de aplicación tópica sobre *Periplaneta americana* comparando la actividad sinergista de Miglitol y Acarbosa con los disolventes DMF y DMSO. En el tratamiento estadístico se excluyeron los datos donde la mortalidad a las 24h era nula.

En el caso de la solución con DMF, se observó un efecto sinérgico de ambas moléculas destacando el Miglitol con un potencial sinérgico de la Praletrina con diferencias estadísticamente significativas. En la solución de DMSO, se presentó de nuevo la Acarbosa como sinérgico con diferencias estadísticamente significativas, mientras que en esta solución, el Miglitol redujo su potencial sinergista respecto a lo observado con la solución de DMF.

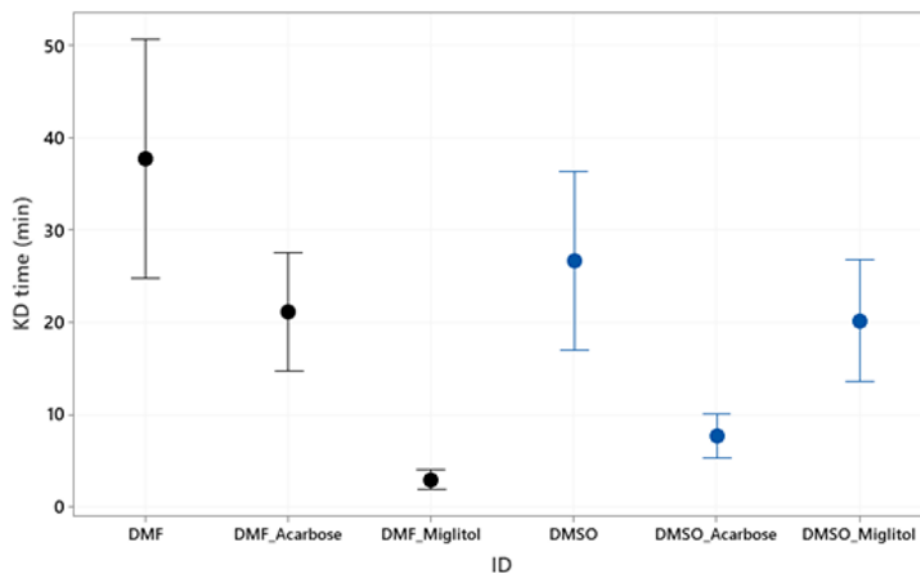


Figura 4.14: Comparación de tiempo de KD en minutos (min) de Miglitol y Acarbose en soluciones de DMF y DMSO con 0,05 % Praletrina.

En la Tabla 4.18 se presenta la reducción de KD, calculada como diferencia de KD respecto a la solución control que no contiene la molécula de estudio. En el caso del Miglitol, pasó de reducir el KD en 35,62 minutos cuando el solvente es DMF a reducir 6,47 minutos al utilizar DMSO.

Tabla 4.18: Comparación de tiempos de volteo a las 24h de Miglitol y Acarbose en distintos disolventes con Praletrina al 0,05 %.

Molécula	N	KD Media (min)	Desv. Est.	Δ KD (min)
DMF_Acarbosa	6	21,11	6,07	17,49
DMF_Miglitol	6	2,972	1,030	35,628
DMSO_Acarbosa	12	7,68	3,83	19,4
DMSO_Miglitol	18	20,61	8,87	6,47

4.3 Nuevos inhibidores para AChE

Como ya se ha comentado, muchos de los insecticidas utilizados para combatir plagas interrumpen la actividad biológica de la AChE, una neurotransmisión crucial en insectos y otras plagas importantes [130]. La inhibición de AChE tiene como resultado la interrupción de la señal nerviosa, lo que lleva a la eliminación de los organismos nocivos sin dañar a las especies no objetivo. Sin embargo, una desventaja significativa en la búsqueda de nuevas sustancias inhibidoras de AChE es la falta de información estructural detallada sobre la enzima de algunas especies concretas, lo cual es crucial para diseñar inhibidores dirigidos. En el caso concreto de la cucaracha *Periplaneta americana* se ha podido comprobar la actividad insecticida de sustancias terpenoides (apartado 4.1.2) descritas en la literatura científica como inhibidoras de AChE [116].

Esta sección resume cómo el uso de metodologías de IA llevan a la identificación de nuevos candidatos para la inhibición de AChE en la cucaracha americana utilizando la base de datos DB. En primer lugar, se muestra el proceso de predicción de la estructura terciaria de AChE comparando los resultados obtenidos con la metodología clásica de modelado por homología con los resultados conseguidos por AlphaFold como herramienta más novedosa de IA. A continuación, se muestra el desarrollo de VS sobre las estructuras predichas, identificando una serie de compuestos activos *in silico*. Finalmente, se seleccionan los compuestos considerados viables comercialmente de los propuestos por VS y se presentan los resultados toxicológicos de dichos compuestos en ensayos *in vivo*, evaluando tanto el potencial insecticida como la sinergia con sustancias activas piretroides que están presentes en las formulaciones insecti-

cidas comerciales. De las moléculas de estudio propuestas, destaca la molécula PF-04995274 como candidato a sinergista de Praetrina, reduciendo significativamente los KD del individuo.

4.3.1 Predicción de la estructura terciaria de AChE

La estructura AChE de la cucaracha americana sigue sin resolverse, lo que impide el uso del VS más clásico de proteína-ligando. Afortunadamente, conocemos la secuencia de la AChE de *Periplaneta americana*, denotada por el código de secuencia GenBank ALJ10969.1. Como se ha mencionado anteriormente AlphaFold aprovecha esta información biológica para construir la estructura terciaria de la proteína objetivo, un paso necesario para habilitar las simulaciones de VS basadas en la estructura. Para garantizar que la IA conduzca a una estructura válida, el resultado generado por AlphaFold se comparó con la estrategia clásica de homología, que se basa principalmente en la búsqueda de secuencias similares que posteriormente se utilizan como plantillas estructurales.

La inspección visual y los valores de RMSD sugieren que ambos métodos conducen a estructuras muy similares, de modo que ambos pueden usarse como objetivos para las simulaciones de VS. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un análisis para comparar las energías de interacción entre los compuestos de DB y cada uno de los dos objetivos. La Figura 4.15 muestra un diagrama de caja y bigotes que transmite la distribución de las energías de interacción logradas con las metaheurísticas menos exigentes M1 de METADOCK 2.0. En el eje x, se pueden ver las dos categorías energéticas: las obtenidas utilizando la estructura de AChE predicha por AlphaFold (ScoringAlphaFold) y las derivadas

del modelo de AChE basado en homología (ScoringHomology). Cada caja en el gráfico encapsula el rango intercuartílico (IQR) de las puntuaciones, representando el 50 % medio de los datos para cada estructura, con la línea horizontal dentro de la caja que denota la puntuación mediana. Los bigotes se extienden para cubrir el rango total de datos, excluyendo valores atípicos, representados por puntos individuales más allá de los bigotes. Estos valores atípicos representan puntuaciones significativamente más altas o bajas que la mayor parte de los datos y podrían ser indicativos de afinidades de unión excepcionalmente fuertes o débiles. La distribución de las puntuaciones también sugirió que tanto los modelos de AlphaFold como los de homología tienen un rango similar de afinidades de unión a través de la biblioteca de compuestos examinada, como lo evidencia la similar extensión de los bigotes y el IQR. También es importante notar que los valores de las puntuaciones fueron negativos; en este marco, una puntuación más baja (más negativa) representa una afinidad de unión predicha más fuerte. La similitud en la dispersión de las puntuaciones entre los dos modelos podría sugerir que, a pesar de las diferencias metodológicas en la predicción de estructuras, los sitios de unión globales que predicen son comparables. Esta congruencia es crucial, ya que da credibilidad a la fiabilidad de los resultados de VS independientemente del modelo estructural utilizado para modelar AChE.

4.3.2 Aplicación de VS a AChE de *Periplaneta americana*

Los experimentos del cribado virtual se realizaron en un nodo computacional con una CPU Intel(R) Xeon(R) Silver 4216 @ 2.10GHz, que cuenta con dieciséis

núcleos físicos aumentados a treinta y dos hilos mediante hyperthreading. Complementando la CPU, la capacidad computacional del nodo se ve reforzada por 384 GB de RAM DDR5 y una GPU NVIDIA A100. Esta GPU equipada con núcleos Tensor tiene una capacidad de hasta 80GB de memoria a más de 2 terabytes por segundo (TB/s), permitiendo ejecutar los modelos de IA más grandes en grandes conjuntos de datos.

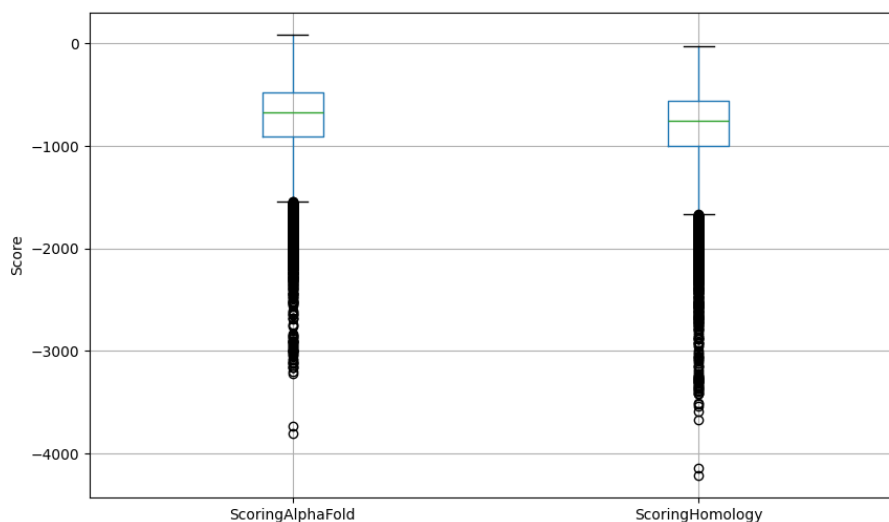


Figura 4.15: Diagrama de dispersión de las puntuaciones de afinidad de unión obtenidas del acoplamiento a ciegas de los compuestos de DB contra dos estructuras receptoras: una derivada mediante modelado por homología (azul) y la otra predicha por AlphaFold (rojo). Cada punto representa la puntuación de acoplamiento para un solo compuesto, mostrando la distribución general y destacando las afinidades de unión relativas predichas para cada receptor.

Como en cualquier experimento de VS, la selección de un base de datos de compuestos es un factor clave. Para este estudio, se seleccionó una base de datos bien conocida por su utilidad en el diseño de fármacos, aunque su potencial para el desarrollo de insecticidas ha sido comparativamente menos explorado. La base de datos DB ha sido sistemáticamente examinada [131], abarcando una amplia gama de compuestos que exceden las 10.000 entradas,

incluyendo medicamentos aprobados, nutracéuticos, agentes experimentales, así como aquellos que han sido retirados del mercado [132]. Hasta ahora, DB se ha utilizado principalmente en el diseño de fármacos dirigidos a biomoléculas humanas. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que esa biblioteca de compuestos también puede ser utilizada como fuente para otras aplicaciones, incluyendo el descubrimiento de nuevos insecticidas [133]. En este estudio las estructuras moleculares depositadas en DB fueron depuradas utilizando el código de la herramienta LigPrep de Schrödinger, que asigna órdenes de enlace, calcula los estados de protonación predominantes a pH neutro y realiza la optimización estructural con el campo de fuerza OPLS4 [91].

El despliegue de METADOCK 2.0 en nuestro estudio requirió la configuración estratégica de sus parámetros. Estos parámetros dirigen el alcance operativo de los algoritmos metaheurísticos fundamentales para explorar la variada topografía de los espacios de búsqueda con esfuerzo computacional diferencial. Estas configuraciones (ver Tabla 4.19), codificadas como M1, M2, M3 y M4, fueron meticulosamente diseñadas para extender progresivamente el rigor computacional y expandir el potencial para sondear las complejidades conformacionales de la interacción ligando-receptor. Estas configuraciones son:

- **M1:** Esta configuración es el modelo base, caracterizado por una intensificación mínima de los parámetros. M1 está específicamente configurado para cribados rápidos e iniciales, lo que lo hace ideal para evaluaciones preliminares donde se prioriza la eficiencia computacional sobre la profundidad de búsqueda exhaustiva. Esta configuración permite una rápida exploración del espacio de búsqueda para identificar rápidamente posibles aciertos con recursos computacionales razonables.

- **M2:** Basándose en la configuración M1, M2 introduce mejoras moderadas a la flexibilidad y a los parámetros que gobiernan las funciones de mejora inicial. Esta configuración está diseñada para equilibrar la velocidad computacional y la profundidad de exploración. Ajusta los parámetros del modelo para permitir una exploración más detallada del espacio de acoplamiento sin un aumento sustancial en la demanda computacional, lo que la hace adecuada para cribados más refinados.
- **M3:** La tercera configuración marca una escalada significativa en la complejidad del proceso de búsqueda. Mejora extensamente los parámetros de selección y combinación, apoyando una exploración más minuciosa del espacio de acoplamiento. M3 emplea un gran número de conformaciones iniciales y enfatiza la combinación estratégica de las mejores y peores poses. Este enfoque está destinado a explorar una gama más amplia de posibles interacciones entre el ligando y el receptor, potencialmente descubriendo configuraciones de unión únicas y eficaces.
- **M4:** La más compleja de las configuraciones maximiza tanto la intensidad computacional como la profundidad de búsqueda. Utiliza el mayor número de conformaciones iniciales e intensifica cada parámetro para llevar al límite las capacidades de búsqueda metaheurística. M4 está orientada hacia experimentos computacionales exhaustivos donde el objetivo es explorar todo el espacio de búsqueda para posibles conformaciones proteína-ligando que puedan tener interacciones óptimas, aunque a un costo computacional mayor.

Tabla 4.19: Configuraciones de METADOCK 2.0 utilizadas en la evaluación, etiquetadas de M1 a M4.

	<i>Configuraciones</i>			
	M1	M2	M3	M4
INEIni	128	128	256	1024
IIEFlex	20	30	40	50
PEIIni	100	100	50	50
IIEIni	50	150	200	200
PBEIni	100	50	50	100
PWEIni	0	50	50	0
PBEsel	50	50	80	100
PWEsel	50	50	20	0
PBBCom	30	20	100	15
PWWCom	0	20	10	0
PBWCom	0	20	10	0
PMUCom	20	0	10	0
IMUCom	50	0	30	0
PEIImp	50	50	100	100
IIEImp	200	100	100	50
PBEInc	50	90	50	90
NIREnd	4	4	4	5
MNIEnd	4	4	4	5

Cada configuración se basa incrementalmente en la anterior, ofreciendo un espectro de estrategias que van desde el cribado rápido hasta búsquedas profundas y exhaustivas. Esta escalada sistemática en complejidad permite a los investigadores seleccionar la configuración que mejor se adapte a las demandas

específicas y recursos de su estudio, alineando el esfuerzo computacional con el nivel de exhaustividad deseado en el proceso de cribado.

La Figura 4.16 muestra el rendimiento de las cuatro metaheurísticas generadas por METADOCK 2.0. La simulación de acoplamiento a ciegas implementa el receptor AChE generado por AlphaFold y todos los compuestos incluidos en la base de datos DB. Como se discutió anteriormente, la nomenclatura de estas metaheurísticas adopta una designación secuencial, donde M1 se atribuye al algoritmo más ágil computacionalmente, ascendiendo en intensidad de recursos hasta M4. La abscisa cuantifica la mejora en el rendimiento computacional, expresada como un factor de aceleración al comparar las metaheurísticas por pares. La ordenada captura la variación en la función de puntuación, una métrica que refleja la estimación de afinidad de unión. Este valor numérico puede esperarse que disminuya con una búsqueda más refinada, lo cual, por supuesto, incrementa el esfuerzo computacional.

Una observación detallada reveló que la metaheurística M1, cuando se compara con M2 (Figura 4.16, círculos azules), muestra un rendimiento computacional acelerado, aunque con una amplia variancia en la diferencia de la función de puntuación. Los conjuntos de datos sugirieron una respuesta heterogénea a las mejoras de eficiencia, implicando una compensación multifacética entre la velocidad computacional y la fidelidad de las predicciones de afinidad. Al avanzar a la comparación M2 frente a M3 (Figura 4.16, cruces naranjas), una convergencia de puntos de datos insinuaba una menor magnitud de aceleración, alineada con una dispersión más estrecha en las diferencias de la función de puntuación. Este patrón apunta una progresión hacia el equilibrio: un sacrificio moderado en la velocidad computacional a favor de la precisión en la puntuación.

La comparación M3-M4 (Figura 4.16, cuadrados rojos) presentó el paradigma más intrigante; la aceleración computacional es mínima, lo que implicaba una casi equivalencia en el tiempo de ejecución. Sin embargo, hubo un salto pronunciado en las diferencias de la función de puntuación a favor de M4, lo que sugirió que M4, aunque intensivo en computación, potencialmente lograba una mejora notable en la predicción de afinidades de unión. En conjunto, estos puntos de datos iluminaban la compensación intrínseca entre la conveniencia computacional y la precisión de las predicciones de interacción ligando-proteína. Esta representación gráfica subraya la sofisticación inherente en el desarrollo de estrategias computacionales para el descubrimiento de fármacos, donde los avances algorítmicos se calibran meticulosamente para optimizar tanto la velocidad de ejecución como la perspicacia del modelado predictivo.

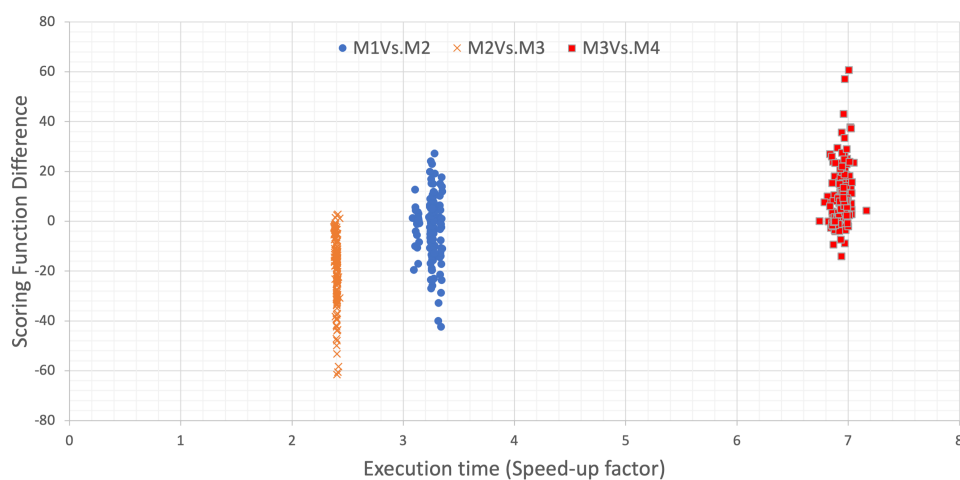


Figura 4.16: Compensaciones entre el tiempo de ejecución y la precisión de la función de puntuación para diferentes metaheurísticas (M1, M2, M3 y M4) utilizadas en el cribado de los 50 mejores compuestos de la base de datos DrugBank. Cada punto representa un par de metaheurísticas comparadas, con el eje x mostrando el factor de aceleración en el tiempo de ejecución y el eje y indicando la diferencia en la función de puntuación.

La Figura 4.17 proporciona una comparación visual entre la cobertura del espacio de búsqueda del flujo de trabajo tradicional de Schrödinger utilizando GLIDE y las metaheurísticas desarrolladas por METADOCK 2.0, aplicadas a un estudio de acoplamiento molecular. Representada en un diagrama de cinta, la proteína se muestra como una estructura gris, con las posibles poses de unión del ligando indicadas por puntos de colores: las configuraciones M1 a M4 de METADOCK 2.0 están representadas por puntos rojos, azules, verdes y amarillos, respectivamente, mientras que el flujo de trabajo de Schrödinger se denota en púrpura. La distribución basada en el enfoque de acoplamiento a ciegas de METADOCK 2.0 produjo una búsqueda más exhaustiva a lo largo de la superficie de la proteína, resultando en una multitud de poses que superan en número a las generadas por el flujo de trabajo de Schrödinger. Esta búsqueda exhaustiva confirmó la capacidad de METADOCK 2.0 para realizar un análisis conformacional extenso.

Como se discutió anteriormente, el flujo de trabajo estándar de VS implementado en Glide lleva a un menor número de poses. Sin embargo, se puede observar una coincidencia en las áreas exploradas por ambas metodologías. Ese resultado sugirió que, aunque los enfoques pueden diferir en exhaustividad, convergen en regiones similares de la proteína que, probablemente, son de alta relevancia para la unión. Además, la densidad y la dispersión de las poses de METADOCK 2.0 sugirieron un muestreo estocástico intenso del espacio del ligando, capturando una amplia gama de posibles modos de unión que luego pueden evaluarse más a fondo por su viabilidad bioquímica. En contraste, el flujo de trabajo de Schrödinger, con su estrategia de acoplamiento dirigido, busca en regiones de interés predefinidas que podrían pasar por alto nuevos sitios de

interacción que METADOCK 2.0 puede descubrir. Estos resultados numéricos validaron aún más a METADOCK 2.0 en la identificación de un rico panorama de configuraciones de unión, ofreciendo un valioso complemento al enfoque de acoplamiento dirigido tradicionalmente empleado en el descubrimiento computacional de fármacos.

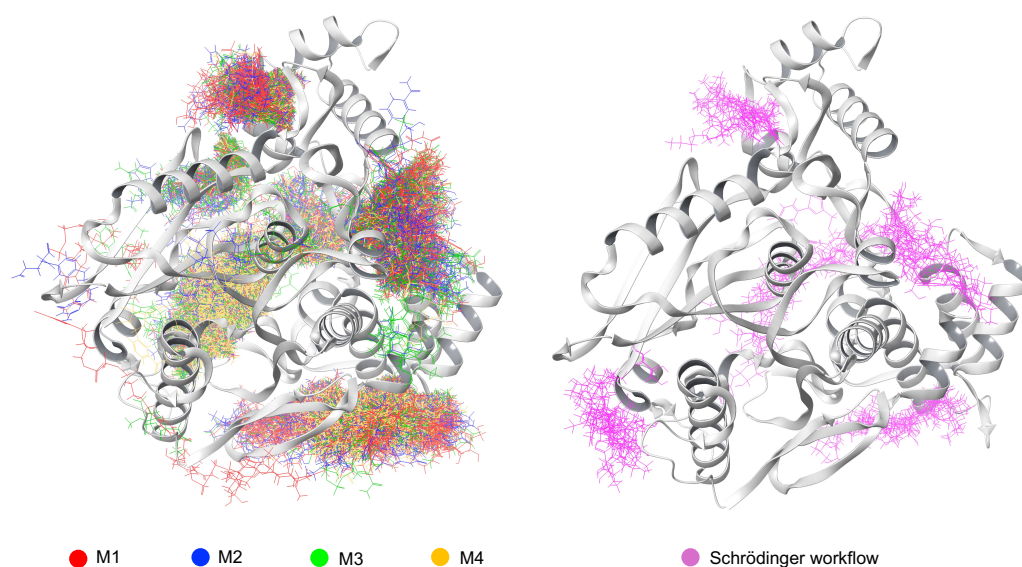


Figura 4.17: Análisis comparativo de METADOCK 2.0 (panel izquierdo) y Schrödinger Glide (panel derecho). La estructura de la proteína se representa en una cinta gris. Las poses de acoplamiento se visualizan como puntos codificados por colores: las configuraciones de METADOCK 2.0 M1 (rojo), M2 (azul), M3 (verde) y M4 (amarillo), mientras que el flujo de trabajo estándar de Schrödinger Glide se muestra en púrpura.

La Figura 4.18 resume el impacto del post-refinamiento a través de MMGB-SA. Este nivel de teoría se utiliza para aumentar la precisión de las energías de unión generadas por las metaheurísticas M1 a M4, que están dispuestas en orden ascendente según su complejidad computacional inherente. En este análisis gráfico se representan los valores de re-puntuación diferencial entre pares

sucesivos de metaheurísticas: M1 frente a M2 (círculos azules), M2 frente a M3 (triángulos rojos) y M3 frente a M4 (cruces verdes). La abscisa enumera los compuestos de la base de datos sujetos a este análisis, mientras que la ordenada captura la variación resultante en los valores de re-puntuación tras la aplicación de MMGBSA.

Los valores negativos en la ordenada sugirieron una mejora en la afinidad de unión predicha después de la re-puntuación para las poses generadas por la metaheurística más compleja computacionalmente. Los valores positivos, sin embargo, indicaron un mejor resultado de re-puntuación para las poses obtenidas por la metaheurística comparativamente menos compleja dentro del par comparado. La distribución de puntos de datos, particularmente la prevalencia de puntos a lo largo y por encima de la línea cero, sugirió que los resultados de re-puntuación de MMGBSA resultan en resultados de puntuación similares o mejorados para las poses generadas por metaheurísticas menos complejas. Esta observación infiere que la optimización inherente al procedimiento de MMGBSA puede, hasta cierto punto, mitigar las disparidades en la puntuación inicial generada por diferentes niveles de complejidad metaheurística.

Uno de los resultados que merece ser resaltado es el hecho de que la frecuencia de valores negativos es menor en comparación con las comparaciones previas en la Figura 4.16, lo que puede atribuirse a la capacidad de refinamiento intrínseca de MMGBSA. Este método de refinamiento evalúa a la vez que mejora potencialmente las afinidades de unión predichas al tener en cuenta factores como los efectos de solvatación y las contribuciones entrópicas, proporcionando así una visión más matizada de la termodinámica de la interacción ligando-receptor. Todos esos resultados numéricos acumulados demostra-

ron que, si bien la adopción de metaheurísticas más sofisticadas generalmente está asociada con una ventaja predictiva inicial, la posterior aplicación de la re-puntuación de MMGBSA puede equilibrar y mejorar efectivamente las predicciones de afinidad de unión, particularmente para aquellas poses generadas por algoritmos menos exigentes computacionalmente, como M1.

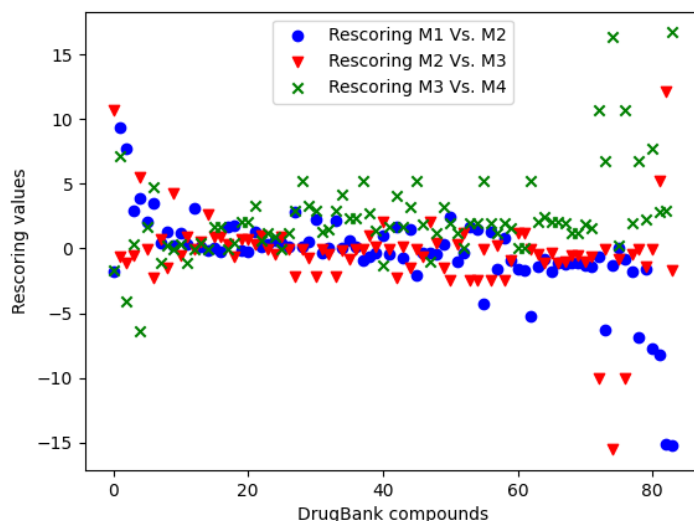


Figura 4.18: Diagrama de dispersión que contrasta las diferencias en los resultados de re-puntuación MMGBSA para las poses de acoplamiento derivadas de un espectro de algoritmos metaheurísticos (M1-M4) implementados en METADOCK 2.0.

Finalmente, se recolectaron todos los resultados reportados utilizando el flujo de trabajo estándar de Glide y el muestreo mejorado por METADOCK 2. La Tabla 4.20 muestra los compuestos mejor clasificados con el potencial para dirigirse a AChE de la cucaracha americana. El criterio de selección se basó en su energía libre de unión refinada a nivel de teoría MMGBSA, con un umbral establecido para valores inferiores (más negativos) a -50 kcal/mol, lo que indica interacciones potenciales fuertes [133]. En el panel izquierdo, las

moléculas están enumeradas por sus identificadores DB o nombres genéricos cuando están disponibles, junto con sus respectivas puntuaciones Glide y energías de unión refinadas con el objetivo principal, a saber, AChE (ΔG_{AChE}). Con el objetivo de proporcionar una visión más general, también se calculó la interacción con el canal (Na_v), que se etiqueta como ΔG_{Na_v} . Esta evaluación de doble objetivo aborda la posibilidad de una eficacia acumulativa, que es particularmente pertinente en el contexto de la acción insecticida. El panel derecho de la Tabla 4.20 incluye los resultados numéricos del muestreo mejorado utilizando METADOCK 2.0 con ambos objetivos.

Tabla 4.20: Compuestos mejor clasificados por el protocolo estándar de Schrödinger (puntuación Glide, en kcal/mol) y por el muestreo con acoplamiento a ciegas METADOCK 2.0. Las energías de interacción se refinan como energía libre de unión a nivel de teoría MMGBSA (ΔG_{AChE} , en kcal/mol).

Flujo de trabajo estándar				Muestreo mejorado			
Molécula ^a	Glide	ΔG_{AChE}	ΔG_{Na_v}	Molécula ^a	METADOCK 2	ΔG_{AChE}	ΔG_{Na_v}
DB02226	-12.60	-98.99	-50.59	Capivasertib	-100.43	-69.07	-50.01
RPR128515	-10.75	-65.25	-46.03	Netilmicina	-88.16	-66.81	-53.78
DB02732	-12.54	-63.75	-29.76	Acarbosa	-112.81	-65.92	-39.73
DB06858	-12.97	-62.57	-50.24	Pf 04995274	-117.96	-65.01	-50.81
Zorubicin	-9.86	-55.79	-38.21	Domperidona	-99.55	-57.99	-56.78
Hexoprenaline	-10.53	-54.38	-63.01	Nadida	-100.43	-54.49	-40.09
DB06942	-11.10	-52.74	-49.11	Quinina	-95.89	-53.55	-30.78
DB07054	-9.21	-52.67	-51.43	Miglustat	-78.51	-53.36	-35.18
Nadida	-9.82	-51.03	-40.09	Sotalol	-79.25	-51.10	-39.41
				Tetracaina	-94.25	-50.13	-37.20

^a Se proporcionan los nombres genéricos cuando están disponibles, de lo contrario, las moléculas se identifican por códigos DB.

Es notable que entre los aproximadamente 10.000 compuestos depositados en la base de datos DB, ambos cribados coinciden en incluir Nadida en su lista de mejor clasificados. Nadida es un coenzima involucrado en numerosas reacciones enzimáticas, lo que indica la robustez del cribado a través de diferentes algoritmos de búsqueda. También destacamos que un análogo de Nadida, por ejemplo, DB02732, está presente en la lista del flujo de trabajo estándar de VS, lo que sugiere la efectividad del algoritmo en la identificación de moléculas bioquímicamente relevantes.

Finalmente, también se vió que las energías asociadas a la unión de AChE (ΔG_{AChE}) son mayores (más negativas) que los valores obtenidos para el canal de sodio (ΔG_{Na_v}). Este es un resultado esperado, ya que la lista de selección se basó específicamente en la interacción con AChE. Sin embargo, algunos aciertos cumplen con el requisito de los -50 kcal/mol en ambos objetivos: DB02226, DB06858, Hexoprenalina y DB07054 en el flujo de trabajo estándar basado en Glide; Capivasertib, Netilmicina, Pf 04995274 y Domperidona para el muestreo mejorado con METADOCK 2.0. Estos compuestos podrían, por lo tanto, ofrecer una acción insecticida más letal si bloquean simultáneamente ambos objetivos.

Todos los datos acumulados demostraron que el muestreo mejorado por METADOCK 2.0 aumenta la multiplicidad y dispersión de las poses predichas, y en consecuencia, realiza una búsqueda más expansiva sobre la superficie del objetivo. Este método de acoplamiento a ciegas reveló una variedad de moléculas candidatas con interacciones predichas significativas, como lo evidencian sus puntuaciones MMGBSA. La Tabla 4.20 proporciona una imagen ilustrativa de los hallazgos más prometedores del VS. Las listas reportadas (muestreos estándar y mejorados) se implementaron directamente en ensayos experimen-

tales para confirmar la sinergia entre las técnicas computacionales tradicionales y las metodologías innovadoras mejoradas con IA en la búsqueda de agentes insecticidas efectivos.

4.3.3 Ensayos *in vivo* a actuar sobre AChE de *Periplaneta americana*

De las moléculas de la Tabla 4.20 propuestas por la metodología computacional se seleccionaron aquellas que, estando disponibles comercialmente, tuvieran un coste asumible. Las tres primeras moléculas mejor posicionadas por METADOCK 2.0 (Capivasertib, Netilmicina y Acarbosa) se estudiaron sobre *Periplaneta americana* en el capítulo anterior ya que también presentan buenos resultados de inhibición con el canal Na_v de la cucaracha. Cabe destacar que en este estudio, Acarbosa destacó por su eficacia sinergista con Praletrina. En esta sección se muestran los resultados de aplicación tópica en cucaracha de las moléculas que se indican en la Tabla 4.21, cuyas estructuras moleculares se muestran en la Figura 4.21.

Tabla 4.21: Identificación de las moléculas de estudio propuestas por el modelo de AChE.

Nº CAS	Molécula	Proveedor
53-84-9	Nadida	Glentham Life Sciences Ltd
130-95-0	Quinina	Thermo Fisher (Kandel) GmbH
136-47-0/94-24-6	Tetracaina	TCI EUROPE N.V
57808-66-9	Domperidona	Glentham Life Sciences Ltd
1331782-27-4	PF-04995274	Targetmol Chemicals Inc

Para determinar la toxicidad de estas moléculas sobre *Periplaneta americana* se prepararon distintas soluciones de estudio que incluían el solvente más compatible con la molécula de estudio a nivel de solubilidad y una dosis letal de sustancia piretroide conocida que implique una mortalidad a las 24h entre el 80 y 90% de la población. A estas soluciones control, se les incorporó un 3% de la molécula de estudio siempre que su solubilidad lo permitiera. Estas soluciones de estudio (Tabla 4.22), permitieron evaluar la actividad sinergista de cada molécula a la dosis de estudio sobre la sustancia activa piretroide. Para evaluar el potencial insecticida de las moléculas, se aplicó una solución con la molécula de estudio en su disolvente más adecuado sin presencia de sustancia activa piretroide a la máxima concentración posible tal como se describe en la Tabla 4.23.

Tabla 4.22: Composición de las soluciones de estudio propuestas para el estudio de sinergia.

ID	Molécula		Solvente		Piretroide	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
1.1S_AChE	Tetracaina	3	Etildiglicol	96,95	Permetrina	0,1
2.1S_AChE	Quinina	3	Etildiglicol	96,95	Permetrina	0,1
2.1SC&1.1SC_AChE	-	-	Etildiglicol	99,90	Permetrina	0,1
1.2S_AChE	Tetracaina	3	Etildiglicol	96,95	Praetrina	0,05
2.2S_AChE	Quinina	3	Etildiglicol	96,95	Praetrina	0,05
2.2SC&1.2SC_AChE	-	-	Etildiglicol	99,90	Praetrina	0,05
3S_AChE	Domperidona	0,9	Etildiglicol	99,09	Praetrina	0,01
3SC_AChE	-	-	Etildiglicol	99,99	Praetrina	0,01
4S_AChE	PF-04995274	3	DMF	96,95	Praetrina	0,05
4SC_AChE	-	-	DMF	99,95	Praetrina	0,05
5S_AChE	Nadida	3	DMSO	96,95	Praetrina	0,05
5SC_AChE	-	-	DMSO	99,95	Praetrina	0,05

Las soluciones de estudio indicadas en Tabla 4.23 no mostraron mortalidad de ningún individuo a las 24h de la aplicación tópica, por lo que, a las dosis indicadas no se pudo afirmar que exista actividad insecticida de dichos compuestos.

Tabla 4.23: Composición de las soluciones de estudio propuestas para el estudio de actividad insecticida sobre *Periplaneta americana*.

ID	Molécula	Molécula (%p/p)	Dosis molécula (mg)	Solvente	Solvente (%p/p)
1I_AChE	Tetracaina	10	0,148	DMSO	90
2I_AChE	Quinina	10	0,149	DMSO	90
3I_AChE	Domperidona	0,9	0,045	Etildiglicol	99,1
4I_AChE	PF-04995274	3	0,143	DMF	97

En la Figura 4.19 se representan los KD, expresados en minutos, para las moléculas de estudio de la Tabla 4.21 con Praletrina como sustancia activa al 0,05 %. Al adicionar la molécula de estudio a la solución control que contiene Praletrina al 0,05 % se pudo identificar sinergia cuando el KD se reducía significativamente. Para determinar si las medias de los valores de KD de las soluciones de ensayo diferían respecto a su control, se realizó un estadístico t de dos muestras con el programa *Minitab 20*.

La solución de estudio 4S AChE mostró diferencias estadísticamente significativas (valor $p = 0,001$) respecto al valor medio de KD de su control 4SC AChE, reduciendo el tiempo de volteo medio de la cucaracha en 19,26 minutos. El resto de las moléculas de estudio no mostraron diferencias significativas, por lo que no se pudo afirmar que exista sinergia.

En el caso de las moléculas Quinina y Tetracaina, se realizó un estudio de sinergia con Permetrina para evaluar si existían diferentes comportamientos en función del piretroide utilizado. En la Figura 4.20 se comparan los KD

obtenidos al añadir Quinina y Tetracaina a una solución de etildiglicol con 0.1 % Permetrina y otra con 0.05 % Praletrina. La actividad de estas moléculas con Permetrina no indicó sinergia, sino una tendencia antagonista, ya que la solución control presentó un KD significativamente inferior a las soluciones que incluían las moléculas de estudio.

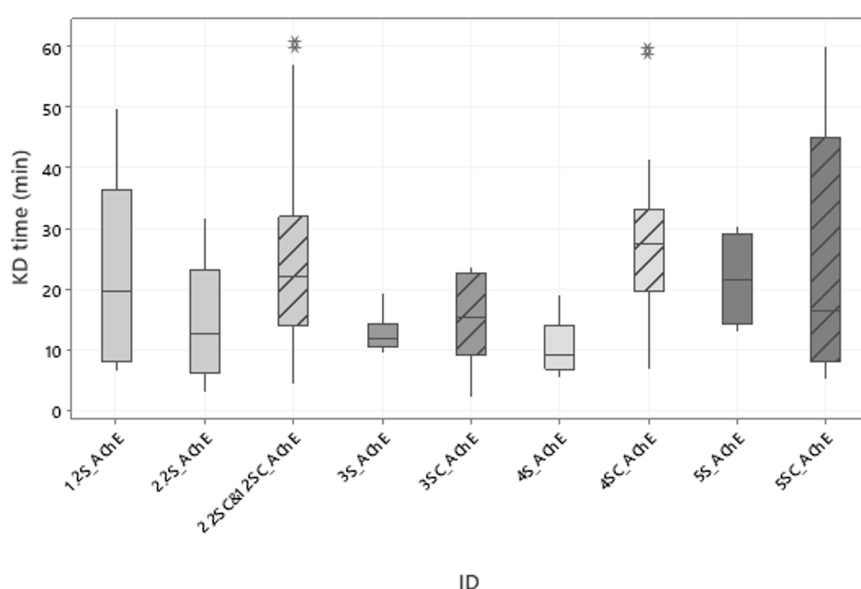


Figura 4.19: Tiempo de volteo (KD) en minutos (min) para las moléculas de estudio de la Tabla 4.21 con praletrina.

La Tabla 4.24 relaciona las dosis de aplicación de las moléculas de estudio con el KD medio obtenido en los ensayos *in vivo* con la metodología de aplicación tópica sobre *Periplaneta americana*. Cabe destacar que aplicando 0,143 mg de PF-04995274 sobre la cucaracha, a través de una solución insecticida de Praletrina al 0,05 % se consiguió reducir un 65 % (19,26 min) el KD medio del individuo.

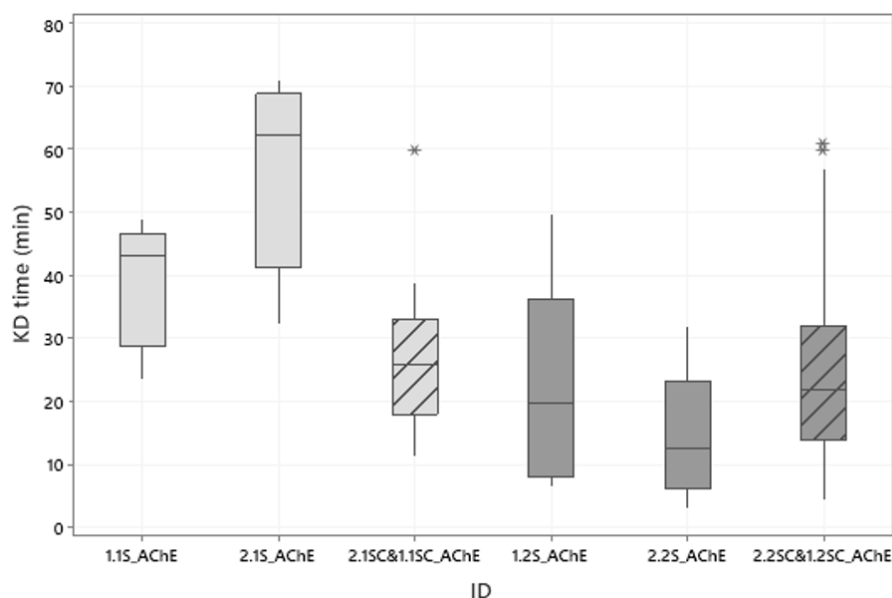


Figura 4.20: Comparación de los tiempo de volteo (KD) en minutos (min) para las moléculas Tetracaina y Quinina con permetrina y praletrina.

Este compuesto pertenece a la clase de los bencisoxazoles, compuestos aromáticos que contienen un anillo de benceno fusionado a un anillo de isoxazol, tal como puede apreciarse en la Figura 4.21.

Tabla 4.24: Tiempos de volteo a las 24h de las moléculas de estudio y sus dosis de aplicación sobre *Periplaneta americana*.

ID	Molécula	Dosis (mg)	N	KD Media (min)	Desv.Est	ΔKD (min)
1.1S_AChE	Tetracaina	0,148	6	39,17	9,94	-12,37
2.1S_AChE	Quinina	0,149	6	56,8	15,2	-30
1.2S_AChE	Tetracaina	0,148	6	22,69	16,36	2,01
2.2S_AChE	Quinina	0,149	6	14,62	10,41	10,08
3S_AChE	Domperidona	0,045	6	12,73	3,43	2,27
4S_AChE	PF-04995274	0,143	6	10,38	4,8	19,26
5S_AChE	Nadida	0,16	6	21,65	7,44	6,35

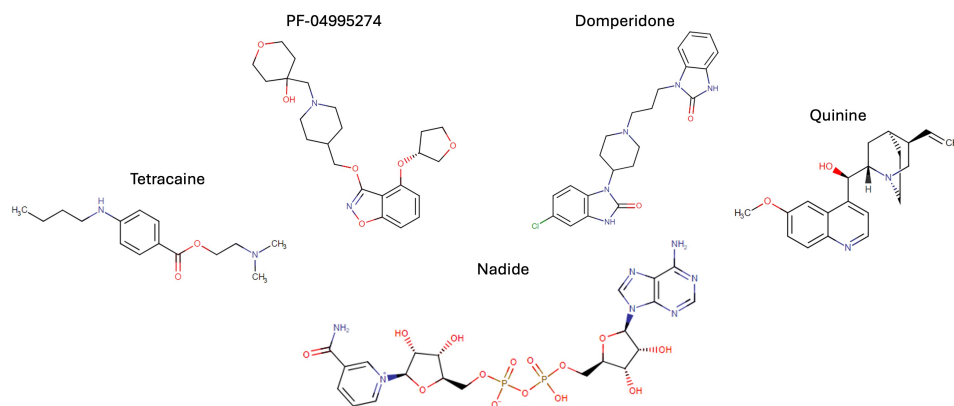


Figura 4.21: Estructura molecular de las moléculas de estudio propuestas por el modelo de AChE. Fuente: *PubChem Open chemistry database* [45]

Respecto a la mortalidad registrada a las 24 horas de la aplicación de las sustancias de ensayo, tal como puede apreciarse en la Figura 4.22, se consiguió el 100 % de mortalidad en todas las soluciones de estudio que contenían las moléculas propuestas sobre una solución con 0,05 % de Praetrina. Esto supone un aumento de mortalidad respecto a las soluciones de estudio con Praetrina al 0,05 % que no superan el 90 % de mortalidad a las 24 horas desde la aplicación.

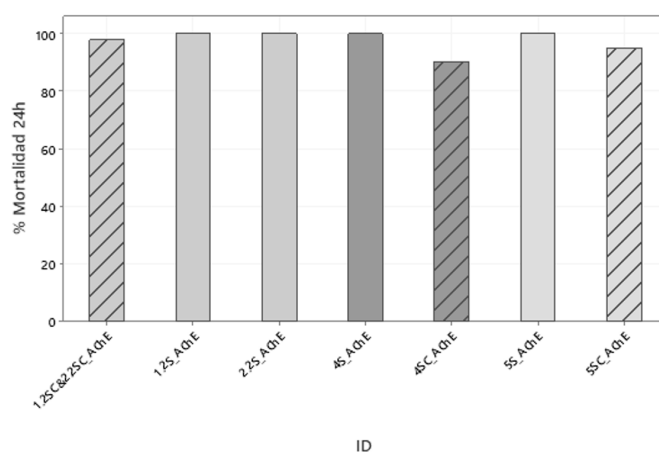


Figura 4.22: Porcentaje de la población total de cucarachas que han muerto después de 24 horas, para las soluciones de estudio de la Tabla 4.21.

Capítulo 5

Conclusiones y Líneas Futuras

Este capítulo tiene como objetivo realizar la síntesis de las conclusiones que podemos encontrar a lo largo de esta tesis doctoral, y sobre las cuáles pueden desarrollarse líneas investigadoras futuras.

5.1 Conclusiones

Durante la elaboración de esta tesis doctoral, se han abordado diversos aspectos y objetivos propuestos que han generado las siguientes conclusiones:

1. Desarrollo de la metodología experimental para la búsqueda de nuevas sustancias biocidas (*in silico*) y su validación al aplicarse a una dosis conocida sobre *Periplaneta americana* (*in vivo*). La metodología de aplicación tópica sobre la zona ventral de la cucaracha *Periplaneta americana* desarrollada por FA permitió cuantificar la mortalidad y el tiempo que

tarda en actuar la sustancia a una dosis de aplicación definida, evaluando así su efecto insecticida y su efecto sinérgico al actuar combinado con otra sustancia biocida conocida.

2. La caracterización de algunas sustancias piretroides mediante ensayos *in vivo* demostraron su eficacia biocida a una dosis entre 0,005 y 0,15 μL , sin embargo, el tiempo que transcurre desde su aplicación hasta el volteo del insecto aumenta significativamente al reducir la dosis de aplicación. Se seleccionó Praletrina como base para los estudios de sinergia ya que en los distintos disolventes empleados se consiguió una mortalidad a las 24 horas del 90-95 %. Los terpenoides propuestos demostraron su eficacia *in vivo* consiguiendo un 100 % de mortalidad tras 24 horas. En particular, el Eucaliptol consiguió igualar a la Praletrina en tiempo de volteo, pero con una dosis 20 veces mayor.
3. Desarrollo del modelo computacional para predecir la interacción de una sustancia en el sitio activo del VSSC a partir de la estructura cristalográfica disponible en la base de datos PDB con el código 6A95, para la cucaracha americana (*Periplaneta americana*). Se utilizó Glide como herramienta de *docking* molecular para posicionar las moléculas en el sitio activo y se realizó el cálculo de la energía de enlace con una posterior re-puntuación MMGBSA. La aplicación de Glide a los piretroides empleados reflejó que estos se sitúan en una región más profunda del canal y no coinciden con el ligando cristalográfico (TTX), sin embargo, las energías de enlace promedio de todos los piretroides dentro del canal muestran valores similares a los del TTX. Para los terpenoides estudiados, el Eucaliptol no ha presentado energías de enlace

significativas, sin embargo, su posición en la Na_v PaS es la misma que la de los piretroides, lo que podría explicar su potencial insecticida en aplicación tópica. Por tanto, para el descubrimiento de nuevas sustancias sobre la diana del VSSC de *Periplaneta americana* se consideró explorar distintas regiones activas de la estructura molecular y se estableció -50 kcal/mol como energía de enlace mínima para la selección de moléculas *in silico*.

4. Desarrollo del modelo computacional para predecir la interacción de una sustancia en el sitio activo de AChE, a partir de un homólogo estructural depositado en el PDB con el código de acceso 5X61. Una vez resuelta la estructura molecular de AChE para *Periplaneta americana* se utilizó Glide como herramienta de *docking* molecular para posicionar las moléculas en el sitio activo y una posterior re-puntuación MMGBSA para el cálculo de la energía de enlace. Los piretroides estudiados presentaron una mayor afinidad que los terpenoides en el sitio activo de AChE de *Periplaneta americana*. En este caso, tanto piretroides como terpenoides ocupaban la misma región dentro de la estructura propuesta.
5. Búsqueda de nuevos inhibidores del canal de Na_v de la cucaracha americana *Periplaneta americana*, denominado Na_v PaS, mediante un VS completo de la base de datos DB a través de dos enfoques diferentes: Glide y METADOCK 2.0. Estos métodos de VS proporcionaron dos listas de compuestos que fueron posteriormente depuradas con re-puntuación MMGBSA para generar una lista clasificada de productos químicos según su capacidad predicha para alcanzar y bloquear el núcleo del poro. Plazomicina, Netilmicina y Acarbosa están presentes en ambas listas entre

los mejor clasificados (consenso). Entre todos los compuestos seleccionados, se pudo adquirir Miglitol, Acarbosa, Sulfato de Netilmicina, Capivasertib y Dihidroestreptomicina para evaluar su actividad insecticida y/o sinérgica con un insecticida formulado con Praletrina, sobre *Periplaneta americana*.

6. Búsqueda de nuevos inhibidores de la AChE de *Periplaneta americana* utilizando VS a partir de la base de datos DB, aplicando la convergencia de la computación de alto rendimiento (HPC) y la inteligencia artificial (IA) en bioinformática. La capacidad del algoritmo AlphaFold para predecir la estructura de AChE y la aplicación de estas técnicas computacionales avanzadas llevó a la identificación de inhibidores prometedores de AChE, entre los que vuelven a posicionarse Capivasertib, Netilmicina y Acarbosa como las mejor clasificadas. Además, surge el compuesto Nadida como un candidato particularmente notable debido a su presencia en la lista de compuestos mejor clasificados según los protocolos Glide y METADOCK 2.0. Entre las moléculas disponibles comercialmente a un coste razonable para su estudio, se utilizaron Nadida, Quinina, Tetracaina, Domperidona y PF-04995274 para comprobar la actividad biocida sobre *Periplaneta americana*.
7. Evaluación *in vivo* de todas las moléculas propuestas *in silico* con los modelos computacionales de VSSC y AChE en *Periplaneta americana* para cuantificar su eficacia como insecticidas o como sinérgicos de los insecticidas domésticos a base de Praletrina. Miglitol se mostró como un potente sinérgico para eliminar a la cucaracha americana, reduciendo el tiempo de volteo 12 veces y ofreciendo una tasa de mortalidad del 100 %. Acarbosa

y la molécula PF-04995274 también redujeron el tiempo de volteo por un factor de 2X y 3X respectivamente y una tasa de mortalidad del 100 %. El estudio de moléculas con actividad inhibidora de alfa-glucosidasa, igual que indica DB para Miglitol y Acarbosa, demostró acción sinérgica con Praletrina, mediante ensayos *in vivo* con *Periplaneta americana* de moléculas derivadas de desoxinojirimicina y Voglibosa, también presente en la estructura de la Acarbosa. Estas moléculas no mostraron potencial insecticida por si mismas. Sin embargo, su actividad sinérgica con uno de los principales activos piretroides utilizados en el mercado de insectos rastreros contribuye notablemente a la optimización de las formulaciones insecticidas comerciales para esta especie de cucaracha tan presente en los hogares.

5.2 Vías futuras

1. Generalizar las metodologías propuestas de VS a otras dianas que participen activamente en los procesos biocidas de diferentes insectos.
2. Realizar un proceso multiobjetivo con compuestos que inhiban varias dianas es un paso ciertamente prometedor, ya que los resultados obtenidos hacen pensar que varios modos de acción pueden actuar simultáneamente para lograr una eliminación rápida y efectiva de insectos. Los códigos de VS acelerados por GPU junto con el desarrollo de modelos de IA multiobjetivo, podrían allanar el camino para descubrir mejores insecticidas.
3. Ampliar la metodología computacional para la búsqueda de inhibidores

sinérgicos incluyendo la molécula del piretroide sobre el que se pretende evaluar sinergia en la estructura de la diana biológica, de manera que se evalúe cómo influye la presencia del piretroide en la unión con la diana.

4. Implementar criterios de selección durante el proceso de VS que tengan en cuenta aspectos como el coste, parámetros toxicológicos ambientales o parámetros fisicoquímicos, que favorezcan la viabilidad de un producto insecticida.
5. Aplicar la metodología VS propuesta utilizando otras bases de datos de moléculas como Coconut o Zinc20 es una vía de acción rápida que permite optimizar las formulaciones insecticidas a partir de la adición de sustancias utilizadas comercialmente para otros fines (alimentación, cosmética...) y cuyos estudios de impacto sobre la salud de las personas y el medio ambiente están disponibles.
6. Búsqueda de homólogos estructurales a las moléculas que han destacado en este estudio por su actividad sinergista y su validación empírica a través de pruebas *in vivo*.
7. Determinar la sinergia de las moléculas propuestas *in silico* tomando como referencia cualquier combinación insecticida registrada distinta de la Praletrina.

5.3 Publicaciones científicas derivadas de los resultados de la tesis

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han dado lugar a un artículo científico y a una patente:

- **Journal:** Chafer-Dolz, B., Cecilia, J. M., Imbernón, B., Núñez-Delicado, E., Casaña-Giner, V., & Cerón-Carrasco, J. P. (2023). Insecticide discovery by drug repurposing: new synergistic inhibitors against *Periplaneta americana*. *New Journal of Chemistry*, 47(37), 17234-17243. I.F 2,7:
- **Patente:** Chafer-Dolz, B., Cecilia, J. M., Imbernón, B., Núñez-Delicado, E., Casaña-Giner, V., & Cerón-Carrasco, J. P. (2022). Iminoazúcares y aminociclitol glucósidos biodegradables inhibidores de alfa-glucosidasa con actividad sinérgica insecticida, acaricida o ambas. Patente de invención registrada en España, número P202230916. Comunidad Valenciana: Francisco Aragón, S.L.U.

Bibliografía

- [1] John E Casida and Kathleen A Durkin. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of entomology*, 58:99–117, 2013.
- [2] Anudurga Gajendiran and Jayanthi Abraham. An overview of pyrethroid insecticides. *Frontiers in Biology*, 13:79–90, 2018.
- [3] David M Soderlund. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of toxicology*, 86:165–181, 2012.
- [4] Anna Brinch, Steffen Foss Hansen, Nanna B Hartmann, and Anders Baun. Eu regulation of nanobiocides: challenges in implementing the biocidal product regulation (bpr). *Nanomaterials*, 6(2):33, 2016.
- [5] ECHA. Biocidal products regulation (bpr). <https://www.echa.europa.eu/es/web/guest/regulations/biocidal-products-regulation/understanding-bpr>, 2024. Accessed: 2024-09-16.
- [6] Murray B Isman. Bioinsecticides based on plant essential oils: A short overview. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 75(7-8):179–182, 2020.

-
- [7] Idin Zibae. Synergistic effect of some essential oils on toxicity and knock-down effects, against mosquitos, cockroaches and housefly. *Arthropods*, 4(4):107, 2015.
- [8] Milena Jankowska, Justyna Rogalska, Joanna Wyszowska, and Maria Stankiewicz. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—a review. *Molecules*, 23(1):34, 2017.
- [9] Gregory Sliwoski, Sandeepkumar Kothiwale, Jens Meiler, and Edward W Lowe. Computational methods in drug discovery. *Pharmacological reviews*, 66(1):334–395, 2014.
- [10] Garrett M Morris, David S Goodsell, Robert S Halliday, Ruth Huey, William E Hart, Richard K Belew, and Arthur J Olson. Automated docking using a lamarkian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14):1639–1662, 1998.
- [11] Irene Sánchez-Linares, Horacio Pérez-Sánchez, José M Cecilia, and José M García. High-throughput parallel blind virtual screening using bind-surf. *BioMed Central (BMC) Bioinformatics*, 13:1–14, 2012.
- [12] Baldomero Imbernón, Antonio Serrano, Andrés Bueno-Crespo, José L Abellán, Horacio Pérez-Sánchez, and José M Cecilia. Metadock 2: a high-throughput parallel metaheuristic scheme for molecular docking. *Bioinformatics*, 37(11):1515–1520, 2021.
- [13] Margot W Beukers, Lisa CW Chang, Jacobien K von Frijtag Drabbe Künzel, Thea Mulder-Krieger, Ronald F Spanjersberg, Johannes Brussee, and

- Ad P IJzerman. New, non-adenosine, high-potency agonists for the human adenosine a_{2b} receptor with an improved selectivity profile compared to the reference agonist n-ethylcarboxamidoadenosine. *Journal of medicinal chemistry*, 47(15):3707–3709, 2004.
- [14] Simon McIntosh-Smith, James Price, Richard B Sessions, and Amaurys A Ibarra. High performance in silico virtual drug screening on many-core processors. *The international journal of high performance computing applications*, 29(2):119–134, 2015.
- [15] Todd JA Ewing, Shingo Makino, A Geoffrey Skillman, and Irwin D Kuntz. Dock 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of computer-aided molecular design*, 15:411–428, 2001.
- [16] Baldomero Imbernón, José M Cecilia, Horacio Pérez-Sánchez, and Domingo Giménez. Metadock: A parallel metaheuristic schema for virtual screening methods. *The International Journal of High Performance Computing Applications*, 32(6):789–803, 2018.
- [17] Martin Karplus and Gregory A Petsko. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, 347(6294):631–639, 1990.
- [18] David Van Der Spoel, Erik Lindahl, Berk Hess, Gerrit Groenhof, Alan E Mark, and Herman JC Berendsen. Gromacs: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, 26(16):1701–1718, 2005.
- [19] John Jumper, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, Russ Bates, Augustin Židek, Anna Potapenko, et al. Applying and improving

- alphafold at casp14. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 89(12):1711–1721, 2021.
- [20] Mihaly Varadi, Stephen Anyango, Mandar Deshpande, Sreenath Nair, Cindy Natassia, Galabina Yordanova, David Yuan, Oana Stroe, Gemma Wood, Agata Laydon, et al. Alphafold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*, 50(D1):D439–D444, 2022.
- [21] David S Wishart, Yannick D Feunang, An C Guo, Elvis J Lo, Ana Marcu, Jason R Grant, Tanvir Sajed, Daniel Johnson, Carin Li, Zinat Sayeeda, et al. Drugbank 5.0: a major update to the drugbank database for 2018. *Nucleic acids research*, 46(D1):D1074–D1082, 2018.
- [22] Xavier Bonnefoy, Helge Kampen, and Kevin Sweeney. *Public health significance of urban pests*. World Health Organization, 2008.
- [23] Richard J Brenner and Richard D Kramer. Cockroaches (blattaria). In *Medical and veterinary entomology*, pages 61–77. Elsevier, 2019.
- [24] Allan E Smith and Diane M Secoy. A compendium of inorganic substances used in european pest control before 1850. *Journal of agricultural and food chemistry*, 24(6):1180–1186, 1976.
- [25] John E Casida and Gary B Quistad. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual review of entomology*, 43(1):1–16, 1998.
- [26] FB LaForge and WF Barthel. Constituents of pyrethrum flowers. xvi. heterogeneous nature of pyrethrolone. *The Journal of Organic Chemistry*, 9(3):242–249, 1944.

- [27] SH Harper. The chrysanthemumcarboxylic acids. vii.—catalytic hydrogenation of the chrysanthemic acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 5(11):529–533, 1954.
- [28] Yuzo Inouye, Yasuhiko Takeshita, and Minoru Ohno. Studies on synthetic pyrethroids: Part v. synthesis of geometrical isomers of chrysanthemum dicarboxylic acid. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 19(3):193–199, 1955.
- [29] Yoshio Katsuda, Tadayoshi Chikamoto, and Yuzo Inouye. The absolute configuration of naturally derived pyrethrolone and cinerolone. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 22(6):427–428, 1958.
- [30] Paul Müller. *DDT Das Insektizid Dichlordiphenyltrichloräthan und Seine Bedeutung: The Insecticide Dichlorodiphenyltrichloroethane and its Significance*, volume 9. Springer-Verlag, 2013.
- [31] Linda M Field, TG Emyr Davies, Andrias O O’reilly, Martin S Williamson, and Bonnie A Wallace. Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides. *European biophysics journal*, 46:675–679, 2017.
- [32] Isaac Ishaaya. *Biochemical sites of insecticide action and resistance*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [33] Tetsuo Satoh and Ramesh C Gupta. *Anticholinesterase pesticides: metabolism, neurotoxicity, and epidemiology*. John Wiley & Sons, 2011.
- [34] Danna De Boer, Nguyet Nguyen, Jia Mao, Jessica Moore, and Eric J Sorin. A comprehensive review of cholinesterase modeling and simulation. *Biomolecules*, 11(4):580, 2021.

- [35] Sehan Lee and Mace G Barron. A mechanism-based 3d-qsar approach for classification and prediction of acetylcholinesterase inhibitory potency of organophosphate and carbamate analogs. *Journal of computer-aided molecular design*, 30:347–363, 2016.
- [36] Yuan-Ping Pang. Insect acetylcholinesterase as a target for effective and environmentally safe insecticides. In *advances in insect physiology*, volume 46, pages 435–494. Elsevier, 2014.
- [37] Prakash Subramanyam and Henry M Colecraft. Ion channel engineering: perspectives and strategies. *Journal of molecular biology*, 427(1):190–204, 2015.
- [38] Benoît Roux. Ion channels and ion selectivity. *Essays in biochemistry*, 61(2):201–209, 2017.
- [39] Andrias O O'Reilly, Bhupinder PS Khambay, Martin S Williamson, Linda M Field, BA Wallace, and TG Emyr Davies. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemical Journal*, 396(2):255–263, 2006.
- [40] Huaizong Shen, Qiang Zhou, Xiaojing Pan, Zhangqiang Li, Jianping Wu, and Nieng Yan. Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. *Science*, 355(6328):eaal4326, 2017.
- [41] Huaizong Shen, Zhangqiang Li, Yan Jiang, Xiaojing Pan, Jianping Wu, Ben Cristofori-Armstrong, Jennifer J Smith, Yanni KY Chin, Jianlin Lei, Qiang Zhou, et al. Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins. *Science*, 362(6412):eaau2596, 2018.

- [42] Noritada Matsuo. Discovery and development of pyrethroid insecticides. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 95(7):378–400, 2019.
- [43] Masachika Hirano, Nobushige Itaya, Isao Ohno, Yoshio Fujita, and Hirotsuke Yoshioka. A new pyrethroid-type ester with strong knockdown activity. *Pesticide Science*, 10(4):291–294, 1979.
- [44] Keimei Fujimoto, Nobushige Itaya, Yoshitoshi Okuno, Tadaomi Kadota, and Takashi Yamaguchi. A new insecticidal pyrethroid ester. *Agricultural and biological chemistry*, 37(11):2681–2682, 1973.
- [45] NCBI. Pubchem database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2024. Accessed: 2024-09-07.
- [46] Ò Aznar-Alemany and E Eljarrat. Introduction to pyrethroid insecticides: chemical structures, properties, mode of action and use. *Pyrethroid Insecticides*, pages 1–16, 2020.
- [47] Cayo Corcellas, Maria Luisa Feo, Joao Paulo Torres, Olaf Malm, William Ocampo-Duque, Ethel Eljarrat, and Damià Barceló. Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. *Environment international*, 47:17–22, 2012.
- [48] Hans-Dieter Holtje, Wolfgang Sippl, Didier Rognan, and Gerd Folkers. *Molecular modeling*, volume 5. Wiley-VCH Weinheim, 2003.
- [49] Shuguang Yuan, HC Stephen Chan, and Zhenquan Hu. Using pymol as a platform for computational drug design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 7(2):e1298, 2017.

- [50] Jianyuan Deng, Zhibo Yang, Hehe Wang, Iwao Ojima, Dimitris Samaras, and Fusheng Wang. A systematic study of key elements underlying molecular property prediction. *Nature Communications*, 14(1):6395, 2023.
- [51] Anastasiia V Sadybekov and Vsevolod Katritch. Computational approaches streamlining drug discovery. *Nature*, 616(7958):673–685, 2023.
- [52] John Jumper, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, Russ Bates, Augustin Žídek, Anna Potapenko, et al. Highly accurate protein structure prediction with alphafold. *nature*, 596(7873):583–589, 2021.
- [53] Richard Evans, Michael O’Neill, Alexander Pritzel, Natasha Antropova, Andrew Senior, Tim Green, Augustin Žídek, Russ Bates, Sam Blackwell, Jason Yim, et al. Protein complex prediction with alphafold-multimer. *bioRxiv*, pages 2021–10, 2021.
- [54] Prasanna V Balachandran, Dezhen Xue, James Theiler, John Hogden, and Turab Lookman. Adaptive strategies for materials design using uncertainties. *Scientific reports*, 6(1):19660, 2016.
- [55] Maurizio Fermeglia and Sabrina Pricl. Multiscale molecular modeling in nanostructured material design and process system engineering. *Computers & Chemical Engineering*, 33(10):1701–1710, 2009.
- [56] Yiwen Hu and Markus J. Buehler. End-to-end protein normal mode frequency predictions using language and graph models and application to sonification. *American Chemical Society (ACS) Nano*, 16(12):20656–20670, 2022.

- [57] Michele Ceriotti, Cecilia Clementi, and O Anatole von Lilienfeld. Machine learning meets chemical physics. *The Journal of Chemical Physics*, 154(16), 2021.
- [58] Adam Hospital, Josep Ramon Goñi, Modesto Orozco, and Josep L Gelpí. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, pages 37–47, 2015.
- [59] Attila Szabo and Neil S Ostlund. *Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory*. Courier Corporation, 2012.
- [60] H Bernhard Schlegel. Møller-plesset perturbation theory with spin projection. *The Journal of Physical Chemistry*, 92(11):3075–3078, 1988.
- [61] Tobias Becker, Alexander Schnell, and Juzar Thingna. Canonically consistent quantum master equation. *Physical Review Letters*, 129(20):200403, 2022.
- [62] Thomas A. Halgren, Robert B. Murphy, Richard A. Friesner, Hege S. Beard, Leah L. Frye, W. Thomas Pollard, and Jay L. Banks. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. enrichment factors in database screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7):1750–1759, 03 2004.
- [63] Garrett M Morris, Ruth Huey, William Lindstrom, Michel F Sanner, Richard K Belew, David S Goodsell, and Arthur J Olson. Autodock4 and autodocktools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16):2785–2791, 2009.
- [64] Andrés Aszódi and William R Taylor. Homology modelling by distance geometry. *Folding and Design*, 1(5):325–334, 1996.

- [65] Daan Frenkel and Berend Smit. *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*, volume 2. Academic Press San Diego, 2002.
- [66] Alessandro Laio and Michele Parrinello. Escaping free-energy minima. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(20):12562–12566, 2002.
- [67] Vojtěch Spiwok and Blanka Králová. Metadynamics in the conformational space nonlinearly dimensionally reduced by isomap. *The Journal of chemical physics*, 135(22), 2011.
- [68] Artem Cherkasov, Eugene N Muratov, Denis Fourches, Alexandre Varnek, Igor I Baskin, Mark Cronin, John Dearden, Paola Gramatica, Yvonne C Martin, Roberto Todeschini, et al. Qsar modeling: where have you been? where are you going to? *Journal of medicinal chemistry*, 57(12):4977–5010, 2014.
- [69] Paola Gramatica. Principles of qsar modeling: comments and suggestions from personal experience. *International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships (IJQSPR)*, 5(3):61–97, 2020.
- [70] Ulrich Rester. From virtuality to reality-virtual screening in lead discovery and lead optimization: a medicinal chemistry perspective. *Current opinion in drug discovery & development*, 11(4):559–568, 2008.
- [71] John J Irwin and Brian K Shoichet. Zinc- a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, 45(1):177–182, 2005.

- [72] Sunghwan Kim, Paul A Thiessen, Evan E Bolton, Jie Chen, Gang Fu, Asta Gindulyte, Lianyi Han, Jane He, Siqian He, Benjamin A Shoemaker, et al. Pubchem substance and compound databases. *Nucleic acids research*, 44(D1):D1202–D1213, 2016.
- [73] Xian Zeng, Peng Zhang, Weidong He, Chu Qin, Shangying Chen, Lin Tao, Yali Wang, Ying Tan, Dan Gao, Bohua Wang, et al. Npass: natural product activity and species source database for natural product research, discovery and tool development. *Nucleic acids research*, 46(D1):D1217–D1222, 2018.
- [74] Kathleen Gallo, Emanuel Kemmler, Andrean Goede, Finnja Becker, Mathias Dunkel, Robert Preissner, and Priyanka Banerjee. Supernatural 3.0—a database of natural products and natural product-based derivatives. *Nucleic Acids Research*, 51(D1):D654–D659, 2023.
- [75] Xiao-Chen Bai, Greg McMullan, and Sjors HW Scheres. How cryo-em is revolutionizing structural biology. *Trends in biochemical sciences*, 40(1):49–57, 2015.
- [76] Protein Data Bank. Protein data bank. *Nature New Biol*, 233(223):10–1038, 1971.
- [77] Andrew Waterhouse, Martino Bertoni, Stefan Bienert, Gabriel Studer, Gerardo Tauriello, Rafal Gumieny, Florian T Heer, Tjaart A P de Beer, Christine Rempfer, Lorenza Bordoli, et al. Swiss-model: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1):W296–W303, 2018.

- [78] Lawrence A Kelley, Stefans Mezulis, Christopher M Yates, Mark N Wass, and Michael JE Sternberg. The phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6):845–858, 2015.
- [79] CASP. Protein structure prediction center. <https://predictioncenter.org/>, 2024. Accessed: 2024-09-17.
- [80] James C Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D Skeel, Laxmikant Kale, and Klaus Schulten. Scalable molecular dynamics with namd. *Journal of computational chemistry*, 26(16):1781–1802, 2005.
- [81] Michał Rostkowski, Mats H. M. Olsson, Chresten R. Søndergaard, and Jan H. Jensen. Graphical analysis of ph-dependent properties of proteins predicted using propka. *BioMed Central (BMC) Structural Biology*, 11:1–6, 2011.
- [82] Thomas A Halgren. Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability. *Journal of chemical information and modeling*, 49(2):377–389, 2009.
- [83] David S Goodsell, Michel F Sanner, Arthur J Olson, and Stefano Forli. The autodock suite at 30. *Protein Science*, 30(1):31–43, 2021.
- [84] Richard A. Friesner, Jay L. Banks, Robert B. Murphy, Thomas A. Halgren, Jasna J. Klicic, Daniel T. Mainz, Matthew P. Repasky, Eric H. Knoll, Mee Shelley, Jason K. Perry, David E. Shaw, Perry Francis, and Peter S. Shenkin. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7):1739–1749, 03 2004.

- [85] ACHILES. Achilles: Alignment-free prediction of chromatin interactions with deep learning models. <https://bio-hpc.ucam.edu/achilles/>, 2024. Accessed: 2024-09-17.
- [86] Thomas A Halgren, Robert B Murphy, Richard A Friesner, Hege S Beard, Leah L Frye, W Thomas Pollard, and Jay L Banks. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. enrichment factors in database screening. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7):1750–1759, 2004.
- [87] Spencer S Ericksen, Haozhen Wu, Huikun Zhang, Lauren A Michael, Michael A Newton, F Michael Hoffmann, and Scott A Wildman. Machine learning consensus scoring improves performance across targets in structure-based virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, 57(7):1579–1590, 2017.
- [88] Sakshi Singh, Qanita Bani Baker, and Dev Bukhsh Singh. Molecular docking and molecular dynamics simulation. In *Bioinformatics*, pages 291–304. Elsevier, 2022.
- [89] Hao Tang, Xiang S Wang, Xi-Ping Huang, Bryan L Roth, Kyle V Butler, Alan P Kozikowski, Mira Jung, and Alexander Tropsha. Novel inhibitors of human histone deacetylase (hdac) identified by qsar modeling of known inhibitors, virtual screening, and experimental validation. *Journal of chemical information and modeling*, 49(2):461–476, 2009.
- [90] Ted T Ashburn and Karl B Thor. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 3(8):673–683, 2004.

- [91] Schrödinger release 2021-3: Ligprep, 2017. Schrödinger, LLC, New York, NY.
- [92] Kabrambam D Singh, Rajendra K Labala, Thiyam B Devi, Ningthoujam I Singh, Heisnam D Chanu, Sonia Sougrakpam, Bunindro S Namerakpam, Dinabandhu Sahoo, and Yallappa Rajashekar. Biochemical efficacy, molecular docking and inhibitory effect of 2, 3-dimethylmaleic anhydride on insect acetylcholinesterase. *Scientific reports*, 7(1):12483, 2017.
- [93] Schrödinger release 2021-3, 2021. Epik Schrödinger, LLC, New York, 2021.
- [94] John C. Shelley, Anuradha Cholleti, Leah L. Frye, Jeremy R. Greenwood, Mathew R. Timlin, and Makoto Uchimaya. Epik: a software program for pka prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(12):681–691, 2007.
- [95] Mats H. M. Olsson, Chresten R. Søndergaard, Michal Rostkowski, and Jan H. Jensen. Propka3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pka predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(2):525–537, 2011.
- [96] Chao Lu, Chuanjie Wu, Delaram Ghoreishi, Wei Chen, Lingle Wang, Wolfgang Damm, Gregory A. Ross, Markus K. Dahlgren, Ellery Russell, Christopher D. Von Bargen, Robert Abel, Richard A. Friesner, and Edward D. Harder. Opls4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space. *J. Chem. Theory Comput.*, 17(7):4291–4300, 07 2021.

- [97] Narasimha Muddagoni, Revanth Bathula, Mahender Dasari, and Sarita Rajender Potlapally. Homology modeling, virtual screening, prime-mmgsa, autodock-identification of inhibitors of fgr protein. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 11(4):11088–11103, 2021.
- [98] Milot Mirdita, Konstantin Schütze, Yoshitaka Moriwaki, Lim Heo, Sergey Ovchinnikov, and Martin Steinegger. Colabfold: making protein folding accessible to all. *Nature methods*, 19(6):679–682, 2022.
- [99] Richard A. Friesner, Robert B. Murphy, Matthew P. Repasky, Leah L. Frye, Jeremy R. Greenwood, Thomas A. Halgren, Paul C. Sanschagrin, and Daniel T. Mainz. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21):6177–6196, 10 2006.
- [100] Thomas A. Halgren. Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(2):377–389, 2009. PMID: 19154148.
- [101] Baldomero Imbernón, José M Cecilia, José-Matías Cutillas-Lozano, and Domingo Giménez. Designing hyperdock: a parallel hyperheuristic method for virtual screening. In *Proceedings of the 47th International Conference on Parallel Processing Companion*, pages 1–8, 2018.
- [102] Baldomero Imbernón, Antonio Llanes, José-Matías Cutillas-Lozano, and Domingo Giménez. Hyperdock: Improving virtual screening through parallel hyperheuristics. *The International Journal of High Performance Computing Applications*, 34(1):30–41, 2020.

- [103] Matthew P. Jacobson, Richard A. Friesner, Zhexin Xiang, and Barry Honig. On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations. *Journal of Molecular Biology*, 320(3):597–608, 2002.
- [104] Matthew P. Jacobson, David L. Pincus, Chaya S. Rapp, Tyler J.F. Day, Barry Honig, David E. Shaw, and Richard A. Friesner. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(2):351–367, 2004.
- [105] Tingjun Hou, Junmei Wang, Youyong Li, and Wei Wang. Assessing the performance of the mm/pbsa and mm/gbsa methods. 1. the accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(1):69–82, 01 2011.
- [106] Giulio Rastelli, Alberto Del Rio, Gianluca Degliesposti, and Miriam Sgobba. Fast and accurate predictions of binding free energies using mm-pbsa and mm-gbsa. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4):797–810, 2010.
- [107] Sanna P. Niinivehmas, Salla I. Virtanen, Jukka V. Lehtonen, Pekka A. Postila, and Olli T. Pentikäinen. Comparison of virtual high-throughput screening methods for the identification of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(6):1353–1363, 06 2011.
- [108] Mikko Ylilauri and Olli T. Pentikäinen. Mmgbsa as a tool to understand

- the binding affinities of filamin–peptide interactions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(10):2626–2633, 10 2013.
- [109] Pin-Chih Su, Cheng-Chieh Tsai, Shahila Mehboob, Kirk E. Hevener, and Michael E. Johnson. Comparison of radii sets, entropy, qm methods, and sampling on mm-pbsa, mm-gbsa, and qm/mm-gbsa ligand binding energies of f. tularensis enoyl-acp reductase (fabI). *Journal of Computational Chemistry*, 36(25):1859–1873, 2015.
- [110] Jing Zhai and William H Robinson. Measuring cypermethrin resistance in the german cockroach (orthoptera: Blattellidae). *Journal of economic entomology*, 85(2):348–351, 1992.
- [111] Jeffrey G Scott, Donald G Cochran, and Blair D Siegfried. Insecticide toxicity, synergism, and resistance in the german cockroach (dictyoptera: Blattellidae). *Journal of economic entomology*, 83(5):1698–1703, 1990.
- [112] Hossein Ladonni. Evaluation of three methods for detecting permethrin resistance in adult and nymphal blattella germanica (dictyoptera: Blattellidae). *Journal of economic entomology*, 94(3):694–697, 2001.
- [113] DataPhysics Instruments GmbH. *Operating Manual OCA*. Filderstadt, Germany, version 1.0 edition, March 2015. Copyright DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt.
- [114] NB Vargaftik, BN Volkov, and LD Voljak. International tables of the surface tension of water. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 12(3):817–820, 1983.
- [115] NR Pallas and Y Harrison. An automated drop shape apparatus and the surface tension of pure water. *Colloids and Surfaces*, 43(2):169–194, 1990.

- [116] María Dolores López, Francisco J Campoy, María Jesús Pascual-Villalobos, Encarnación Muñoz-Delgado, and Cecilio J Vidal. Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased or decreased by selected monoterpenoids and phenylpropanoids in a concentration-dependent manner. *Chemico-Biological Interactions*, 229:36–43, 2015.
- [117] Mila Jukic, Olivera Politeo, Milka Maksimovic, Mia Milos, and Mladen Milos. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21(3):259–261, 2007.
- [118] Satomi Dohi, Masanori Terasaki, and Masakazu Makino. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10):4313–4318, 2009.
- [119] T. G. E. Davies, L. M. Field, P. N. R. Usherwood, and M. S. Williamson. Ddt, pyretrinas, piretroides y canales de sodio en insectos. *IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) Life*, 59(3):151–162, 2007.
- [120] Christopher A Lipinski, Franco Lombardo, Beryl W Dominy, and Paul J Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3):3–25, 1997.
- [121] Tabasum Ali, Sheikh Tahir Majeed, Rabiya Majeed, Rabiah Bashir, Suhail Ahmad Mir, Ifat Jan, Ghulam Nabi Bader, and Khurshid Iqbal Andrabi. Recent advances in the pharmacological properties and molecular

- mechanisms of carvacrol. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 34(1):35–47, 2024.
- [122] Yoshihito Inoue, Toshiyuki Yoshizato, and Tatsuhiko Kawarabayashi. Investigation of β_2 -adrenoceptor subtype selectivity and organ specificity for bedoradrine (kur-1246), a novel tocolytic beta-adrenergic receptor stimulant. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 35(3):405–413, 2009.
- [123] Kazuko Matsuda, Malath Makhay, Kirk Johnson, and Yuichi Iwaki. Evaluation of bedoradrine sulfate (mn-221), a novel, highly selective beta2-adrenergic receptor agonist for the treatment of asthma via intravenous infusion. *Journal of Asthma*, 49(10):1071–1078, 2012.
- [124] Jimmy Lindberg, David Pyring, Seved Löwgren, Åsa Rosenquist, Guido Zuccarello, Ingemar Kvarnström, Hong Zhang, Lotta Vrang, Björn Clas-son, Anders Hallberg, Bertil Samuelsson, and Torsten Unge. Symmetric fluoro-substituted diol-based hiv protease inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, 271(22):4594–4602, 2004.
- [125] Eliana S. Armstrong and George H. Miller. Combating evolution with intelligent design: the neoglycoside achn-490. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5):565–573, 2010.
- [126] Georgina Cox, Linda Ejim, Peter J. Stogios, Kalinka Koteva, Emily Bordeleau, Elena Evdokimova, Arthur O. Sieron, Alexei Savchenko, Alisa W. Serio, Kevin M. Krause, and Gerard D. Wright. Plazomicin retains antibiotic activity against most aminoglycoside modifying enzymes. *ACS Infectious Diseases*, 4(6):980–987, 06 2018.

- [127] K Nomura, K Naruse, K Watanabe, and M Sokabe. Aminoglycoside blockade of Ca^{2+} -activated K^{+} channel from rat brain synaptosomal membranes incorporated into planar bilayers. *Journal of Membrane Biology*, 115(3):241–251, May 1990.
- [128] Adrian J. Yeiser, James R. Cox, and Sterling N. Wright. Voltage-dependent inhibition of rat skeletal muscle sodium channels by aminoglycoside antibiotics. *Pflügers Archiv*, 448(2):204–213, 2004.
- [129] M. J. Benavides Moraz, M. J. Bruscas Alijarde, J. Mozota Duarte, and S. Medrano Sanz. Los nuevos antidiabéticos orales para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Medicina Integral (Edición impresa)*, pages 355–358, 2000.
- [130] José P. Cerón-Carrasco, Denis Jacquemin, Jérôme Graton, Steeve Thany, and Jean-Yves Le Questel. New insights on the molecular recognition of imidacloprid with *aplysia californica* achbp: A computational study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(15):3944–3953, 2013.
- [131] Sunghwan Kim, Jie Chen, Tiejun Cheng, Asta Gindulyte, Jia He, Siqian He, Qingliang Li, Benjamin A Shoemaker, Paul A Thiessen, Bo Yu, et al. Pubchem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic acids research*, 49(D1):D1388–D1395, 2021.
- [132] J. Wang. Fast identification of possible drug treatment of coronavirus disease-19 (covid-19) through computational drug repurposing study. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60:1549–9596, 2020.
- [133] Beatriz Chafer-Dolz, José M Cecilia, Baldomero Imbernón, Estrella Núñez-Delicado, Victor Casaña-Giner, and José P Cerón-Carrasco. Insec-

ticide discovery by drug repurposing: new synergistic inhibitors against periplaneta americana. *New Journal of Chemistry*, 47(37):17234–17243, 2023.