

**MANIFESTACIONES SEMIOQUÍMICAS Y MECANISMO DE ACCIÓN
DE *Thymus vulgaris* (LABIATAE) FRENTE A *Stegomyia aegypti* (Reinert et al. 2004)
(DIPTERA: CULICIDAE).**

SHARON SMITH VERA RINCON

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
2015**

**MANIFESTACIONES SEMIOQUÍMICAS Y MECANISMO DE ACCIÓN
DE *Thymus vulgaris* (LABIATAE) FRENTE A *Stegomyia aegypti* (Reinert et al. 2004)
(DIPTERA: CULICIDAE).**

**Trabajo de investigación para optar al título de
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

SHARON SMITH VERA RINCON

Cód. 2138729

Director

Jonny Edward Duque Luna

Ph.D en Ciencias Biológicas

Co-directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Ph.D en Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS

2015

DEDICATORIA

Principalmente le dedico esta tesis a mi Dios Jesús, quien me ayudo cada día y permitió que esto fuera posible.

A mí querido Esposo Andrés, por enseñarme a crecer y demostrarme su amor.

A mis padres Alba Lucia y Raúl, y mi hermano Ander, que sin su amor y apoyo no sería lo que soy.

A mi sobrinita Isabella a que me alegro la vida con su ternura.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a muchas personas que sin su ayuda, apoyo y amistad esta tesis no habría sido posible. Agradezco especialmente a mis tutores el Dr. Jonny E. Duque y a la Dra. Stelia C. Méndez por abrirme las puertas en su grupo y darme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría, así como su apoyo y aliento. Gracias por todo el compromiso durante este proceso.

Gracias a todos mis colegas del CINTROP, me hicieron muy feliz en este paso de la vida. A todos les estaré siempre agradecida. A mis compañeros del lab 402, en especial a Mayra por su colaboración en la parte experimental y a Linda por despejarme la mente con sus canciones.

Le agradezco a mi familia por ser mi apoyo incondicional.

Gracias al programa de apoyo a la investigación "Patrimonio Autónomo, Fondo Nacional de Financiamiento Para La Ciencia, Francisco José de Caldas," contrato RC-0572-2012- Bio-Red - CENIVAM.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1.IDENTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
2.PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	20
3.MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	21
3.1. IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL DENGUE.....	21
3.2. VECTOR PRINCIPAL DEL DENGUE: <i>Stegomyia aegypti</i>	22
3.3. USO Y VÍAS DE PENETRACIÓN DE INSECTICIDAS PARA EL CONTROL DE <i>Stegomyia aegypti</i>	24
3.3.1. Penetración por vía cutánea.	25
3.3.2. Penetración por vía oral y/o digestiva.....	25
3.3.3. Penetración por vía respiratoria.	26
3.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS INSECTICIDAS	26
3.4.1. Insecticidas neurotóxicos.	26
3.5. RESISTENCIA A INSECTICIDAS	33
3.6. ACEITES ESENCIALES COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE VECTORES	33
3.6.1. Composición química de los aceites esenciales.....	35
3.6.2. Efectos biológicos los aceites esenciales.	35
3.6.3. Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	36
3.7. ANÁLISIS <i>In silico</i>	36
3.7.1. Principio de hibridación molecular.	36
4. OBJETIVOS	38
5. JUSTIFICACIÓN	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL Y MATERIAL BIOLÓGICO	40
6.2. BIOENSAYOS ACTIVIDAD OVICIDA	41
6.3. EFECTOS DE <i>T vulgaris</i> SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	42
6.4. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD LARVICIDA	43
6.5. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD PUPICIDA	43
6.6. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD ADULTICIDA	43
6.7. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD REPELENCIA A LA PICADA DE LOS MOSQUITOS ..	44
6.8. BIOENSAYOS ACTIVIDAD ATRAYENTE PARA LA OVIPOSICIÓN	45
6.9. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE LARVAS DE <i>S. aegypti</i>	47

6.10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES	47
6.11. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXIGENO	47
6.12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS MITOCONDRIALES	48
6.12.1. Preparación de la suspensión mitocondrial	48
6.12.2. NADH oxidasa	49
6.12.3. NADH deshidrogenasa	49
6.12.4. NADH Citocromo C reductasa	49
6.12.5. Succinato oxidasa	50
6.12.6. Succinato deshidrogenasa	50
6.13. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ACETILCOLINESTERASA	50
6.13.1. Ensayo <i>In vitro</i>	50
6.13.2. Ensayo <i>In vivo</i>	51
6.14. ENSAYOS SOBRE EL EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>T. vulgaris</i>	51
6.15. Cribado virtual: Análisis <i>In Silico</i>	52
6.15.1. Cálculo de los parámetros de Lipinski	52
6.15.2. Cálculo de los valores de solubilidad y riesgo	53
6.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
6. CONSIDERACIONES ÉTICAS	54
7. RESULTADOS	55
7.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL	55
7.2. ACTIVIDAD OVICIDA DEL ACEITE ESENCIAL	56
7.3. EFECTO DEL AE SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	57
7.4. ACTIVIDAD LARVICIDA	58
7.5. ACTIVIDAD PUPICIDA	60
7.6. ACTIVIDAD ADULTICIDA	61
7.7. ACTIVIDAD REPELENTE	62
7.8. ACTIVIDAD DETERRENTE DURANTE LA OVIPOSICIÓN DE <i>S. aegypti</i>	63
7.9. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>T. vulgaris</i> EN LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL	64
7.9.1. Análisis del control respiratorio/ consumo de oxígeno	64
7.9.2. Efecto del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> sobre las enzimas de la cadena respiratoria	66
7.10. EFECTO DE <i>T. vulgaris</i> EN LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ACETILCOLINESTERASA	68

7.11. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>T. vulgaris</i> EN LA DEGRADACIÓN DEL ADN	.69
7.12. RESULTADO DEL CRIBADO VIRTUAL DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL AE DE <i>T. vulgaris</i>70
8.DISCUSIÓN73
9.CONCLUSIONES80
10.RECOMENDACIONES81
11.PARTICIPACION EN CONFERENCIAS Y PASANTIAS82
BIBLIOGRAFÍA83
ANEXOS101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Casos de dengue en América durante los años 1980-2015).	22
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Stegomyia aegypti</i>	24
Figura 3. Esquema de una sinapsis colinérgica.	28
Figura 4. Cadena transportadora de electrones (Complejo I, II, III, IV).	31
Figura 5. Principales interrelaciones entre el metabolismo.	34
Figura 6. Alimentación de adultos	40
Figura 7. Dispositivo de oviposición.	41
Figura 8. Selección de pupas.	41
Figura 9. Diagrama de ensayo actividad ovicida.	42
Figura 10. Diagrama de impregnación de botellas.	44
Figura 11. Uso de dispositivo en acrílico para ensayo de repelencia.	45
Figura 12. Jaulas de experimentación con adultos de <i>S. aegypti</i>	46
Figura 13. Diseño de bioensayo de oviposición.	46
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de ADN procedente de cultivo celular.	52
Figura 15. Estructuras químicas de los componentes del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i>	56
Figura 16. Porcentaje de eclosión de huevos frescos y embrionados	57
Figura 17. Embriones de huevos de <i>S. aegypti</i> expuestos a diferentes concentraciones del AE	58
Figura 18. Cambios morfológicos inducidos por el AE en pupas de <i>S. aegypti</i>	61
Figura 19. Efecto del AE de <i>T. vulgaris</i> sobre la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP en el estado 3.	64
Figura 20. Efecto del AE de <i>T. vulgaris</i> sobre la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP	65
Figura 21. Efecto del AE de <i>T. vulgaris</i> sobre el coeficiente de control respiratorio (CCR).	66
Figura 22. Efecto del aceite esencial del <i>T. vulgaris</i> sobre las enzimas de la cadena respiratoria.	67
Figura 23. Efecto del AE sobre la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa comercial.	68
Figura 24. Efecto del AE sobre la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en larvas	69
Figura 25. Daño en el ADN.	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Inhibidores de la cadena respiratoria.	31
Tabla 2. Parámetros de Lipinski que deben cumplir los compuestos mayoritarios del AE.	52
Tabla 3. Composición química del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	55
Tabla 4. Porcentaje de mortalidad de larvas <i>S. aegypti</i>	59
Tabla 5. Actividad larvicida de <i>T. vulgaris</i> contra larvas de <i>S. aegypti</i>	59
Tabla 6. Porcentaje de mortalidad en pupas.	60
Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de adultos.	62
Tabla 8. Porcentaje de repelencia de AE de <i>T. vulgaris</i> en humanos.	63
Tabla 9. Actividad atrayente y/o deterrente de oviposición.	63
Tabla 10. Parámetros de Lipinski.	70
Tabla 11. Valores de toxicidad en Osiris® property explorer.	70
Tabla 12. Valores afinidad de fármaco por Osiris® property explorer.	71

ANEXOS

Anexo A. Consentimiento informado	101
---	-----

RESUMEN

TITULO: MANIFESTACIONES SEMIOQUÍMICAS Y MECANISMO DE ACCIÓN DE *Thymus vulgaris* (LABIATAE) FRENTE A *Stegomyia aegypti* (Reinert et al. 2004) (DIPTERA: CULICIDAE).*

AUTOR: SHARON SMITH VERA RINCON**

PALABRAS CLAVES: Aceite esencial, bioactividad, acetilcolinesterasa, mitocondrias, transporte de electrones, necrosis

DESCRIPCION:

El objetivo de esta disertación fue determinar el potencial insecticida del aceite esencial (AE) de *T. vulgaris* en *S. aegypti* en todas las etapas del ciclo de vida (huevo, larvas, pupas y adultos), el efecto repelente en humanos y el efecto atrayente y/o deterrente de oviposición. Adicionalmente, dilucidar el mecanismo de acción para inhibir funciones biológicas como alteración de la bioenergética mitocondrial, inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, degradación de ADN y análisis *in silico* de los compuestos mayoritarios, timol y *p*-cimeno. Se encontró que el AE tiene acción ovicida, presentando un 50% de inhibición a una concentración de 50 mg.mL⁻¹ ejerce actividad larvicida con una CL₅₀= 58 y CL₉₅= 88 mg.mL⁻¹, presenta actividad pupicida con 63% de mortalidad a una concentración de 390 mg.mL⁻¹. En adultos se reportó a 1000 mg.mL⁻¹ un 23% de mortalidad. Presentó efecto repelente en humanos contra la picadura de *S. aegypti* con 37% de protección a 1000 mg.mL⁻¹, también presenta propiedades deterrentes y disuasivas a partir de 5 mg.mL⁻¹ con valores de 78%. A nivel mitocondrial el AE causó inhibición del complejo III, en la cadena transportadora de electrones. La concentración a la cual el AE proporcionó, una inhibición del 50% de la enzima acetilcolinesterasa (IC₅₀) fue de 70 mg.mL⁻¹ en ensayos *in vitro* y 167 mg.mL⁻¹ para ensayos *In vivo*. Las larvas que se expusieron a diferentes concentraciones del AE, murieron por necrosis. El análisis *in silico* reveló que timol y *p*-cimeno presentan mayor eficiencia vía oral. Los resultados indican que el AE de *T. vulgaris* es un candidato promisorio para el control del vector, que puede contribuir a disminuir las poblaciones del mosquito en un futuro.

* Trabajo presentado para optar al título de Magister en ciencias básicas biomédicas.

** Facultad de salud, departamento de ciencias básicas biomédicas, Director: Jonny Edward Duque Luna Ph.D; Co-directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez Ph.D

ABSTRACT

TITLE: SEMIOCHEMICAL MANIFESTATIONS AND ACTION MECHANISM OF *Thymus vulgaris* (LABIATAE) AGAINST *Stegomyia aegypti* (REINERT et al. 2004) (DIPTERA: CULICIDAE).*

AUTHOR: SHARON SMITH VERA RINCON**

KEYWORDS: Essential oil, Bioactivity, Acetylcholinesterase, Mitochondria, Electron Transport Chain, Necrosis.

ABSTRACT:

The aim of this work was to determine the insecticidal potential of essential oil (EO) from *T. vulgaris* against all life stages of *S. aegypti* (eggs, larvae, pupae and adults). Repellency effect in humans as well as the oviposition deterrent activity were also evaluated. In addition, the ability of *T. vulgaris* to inhibit important biological functions in *S. aegypti* such as mitochondrial bioenergetics and acetylcholinesterase activity was investigated. Moreover the degradation of DNA by presence of *T. vulgaris* was studied. Furthermore, analysis *in silico* of the major compounds of *T. vulgaris* (thymol and *p*-cymene) was developed. EO of *T. vulgaris* exhibited insecticidal activity against all *S. aegypti* life stages. Ovicidal activity with only 50% of eggs hatching was detected at 5 mg.mL⁻¹ of EO. *T. vulgaris* has also larvicidal activity with CL₅₀=58.3 mg.mL⁻¹ and CL₉₅=87.6 mg.mL⁻¹. Moreover, 390 mg.mL⁻¹ and 1000 mg.mL⁻¹ of EO induce 63% and 23% mortality in pupae and adults, respectively. *T. vulgaris* also displayed repellent activity at 1000 mg.mL⁻¹ with 37% of protection against mosquito bites in humans. 78.4% deterrent activity was observed at 5 mg.mL⁻¹ of EO. On the other hand, *T. vulgaris* inhibited the mitochondrial respiratory chain complex III, which affected ATP synthesis. Also, 50% inhibition of acetylcholinesterase was detected at 70.61 mg.mL⁻¹ and 167.6 mg.mL⁻¹ of EO under *in vitro* and *in vivo* conditions, respectively. Furthermore, larvae suffered necrosis and die at any concentration of EO used. Analysis *in silico* shows thymol and *p*-cymene to be very efficient via oral. All of these results show that EO of *T. vulgaris* is a good candidate for *S. aegypti* control.

* Graduation project

** Facultad de salud, departamento de ciencias básicas biomédicas, Director: Jonny Edward Duque

Luna Ph.D; Co-directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez Ph.D

INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral transmitida por la picadura de mosquitos vectores, principalmente del género *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762) (Reinert et al. 2004; Reinert et al. 2009; Le Goff et al. 2013) causada por un virus perteneciente a la familia Flaviviridae (Laughlin et al. 2012). Actualmente, se constituye como la arbovirosis más importante a nivel mundial, en términos de morbilidad, mortalidad e impacto económico (WHO 2013). Siendo endémica en más de 100 países en áreas tropicales y subtropicales del mundo (países del sudeste de Asia, África, el Mediterráneo oriental y las Américas) (Guzman et al. 2010). Se estima que cada año ocurren 390 millones de infecciones en todo el mundo, de las cuales 96 millones son casos sintomáticos (Bhatt et al. 2013). En Colombia, la incidencia nacional del dengue a la semana epidemiológica 13 del año en curso (2015) registró un incremento de 113.3 casos por cada 100.000 habitantes (WHO 2013).

Los factores que favorecen la transmisión del dengue, están relacionados con el cambio climático, el aumento de la población mundial en áreas urbanas, la práctica del almacenamiento de agua en recipientes caseros frecuentemente descubiertos, y la gran producción de objetos descartables que sirven como criaderos de mosquitos (e.g. neumáticos). A todo esto se le suma el aumento de los viajes y las migraciones, las fallas existentes en el control del vector, las características del hospedero (e.g. respuesta inmune del hospedero, la naturaleza de su estado inmunológico y sus características genéticas) y la falta de una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad (Corrales & Laya 2012).

Durante las dos últimas décadas las acciones para control del vector se han orientado principalmente a la utilización de insecticidas de tipo organofosforados y piretroides, tales como malatión, temefos, cipermetrina, entre otros (Casida & Gary 1998; Rattan 2010). Sin embargo, su uso indiscriminado ha generado serios problemas de contaminación ambiental incluyendo efectos tóxicos en los seres humanos y la aparición de poblaciones de mosquitos resistentes (Silva et al. 2008; Santacoloma et al. 2010).

Particularmente, la resistencia de *S. aegypti* a insecticidas es un fenómeno que se ha extendido por todo el Caribe y en algunos países de América Central y América del Sur, incluyendo Colombia (Fonseca et al. 2011), lo que representa una amenaza para la eficacia del control del vector. Por lo anterior, existe un gran interés de buscar nuevos insecticidas que sean tanto efectivos para el control de mosquitos como amigables para el medio ambiente (Giraldo et al. 2008; Leyva et al. 2012).

Los aceites esenciales (AEs) son mezclas de compuestos volátiles producidos por las plantas como parte de su metabolismo secundario, los cuales juegan un factor importante en las interacciones ecológicas intra e interespecificas entre diferentes organismos (Dicke & Sabelis 1988), por lo cual también se denominan semioquímicos.

Dentro del grupo de los semioquímicos, encontramos los infoquímicos, los cuales son compuestos químicos que generan un comportamiento y/o respuesta fisiológica en el individuo receptor. Estos se dividen a su vez en aleloquímicos (comunicación interespecifica) y en feromonas (comunicación intraespecifica) (Navarro et al. 2009). Los AEs pueden ejercer un efecto de tipo aleloquímicos al actuar como repelentes, disuasivos de oviposición, e inhibidores del desarrollo y crecimiento contra insectos (Carvalho et al. 2003; Dolan et al. 2007; Samidurai et al. 2009; Dua et al. 2013).

Por lo todo lo mencionado anteriormente, los AEs son una alternativa para el control de mosquitos. Sin embargo, poco se conoce sobre su mecanismo de acción insecticida. Existen varios AEs con propiedades farmacológicas (citotóxicos, repelentes) cuyo potencial insecticida aún no ha sido explorado con detalle. Este es el caso del AE de *Thymus vulgaris* (Chintalchere et al. 2013; Al-Balushi et al. 2013), el cual es objeto en esta investigación.

En este trabajo de investigación se ha determinado el potencial insecticida del AE de *T. vulgaris* en *Stegomyia aegypti*; se tuvieron en cuenta todas las etapas del ciclo de vida del mosquito: huevos, larvas, pupas y adultos; se cuantificó la actividad repelente en humanos y la actividad atrayente y/o deterrente del AE. Adicionalmente se evaluó el potencial de este AE para inhibir diferentes funciones biológicas en *S. aegypti* como alteración de la bioenergética mitocondrial, inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, degradación de ADN y análisis *in silico* de los componentes mayoritarios, con miras a comprender cuál es su mecanismo de acción.

1. IDENTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Stegomyia aegypti es un mosquito cosmopolita vector de diversas arbovirosis, entre ellas el virus dengue (VDEN) (Bhatt et al. 2013). La transmisión y simultánea circulación de los cuatro serotipos que ocasionan el dengue (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4) permiten manifestar la enfermedad desde un cuadro asintomático, pasando por una enfermedad febril inaparente, hasta la forma grave. La circulación de más de un serotipo representa en varios países patrones de endemicidad, lo que indica que el dengue es un riesgo constante que lleva a la muerte a un porcentaje entre el 1 y 3 % de las personas contagiadas (Laughlin et al. 2012).

En Colombia, durante las dos últimas décadas las acciones de control del vector se han orientado a la aplicación principal de insecticidas organofosforados y piretroides (Meinert et al. 2000) como malatión con efecto adulticida y temefos como larvicida los cuales son aplicados en contenedores de almacenamiento de agua. Estas acciones, constituyen prácticamente la principal fuente para la interrupción de la transmisión de la enfermedad, debido a la ausencia de una vacuna para el dengue (Guzman et al. 2010). El uso de estos productos químicos derivó varios problemas como contaminación ambiental, bioacumulación de principios activos, efectos tóxicos en el hombre y la aparición de poblaciones del mosquito resistentes a las moléculas empleadas (Meinert et al. 2000; Santacoloma et al. 2010)

La aparición de la resistencia a insecticidas, representa una amenaza para la eficacia del control vectorial, esta condición se ha extendido por todo el Caribe y en algunos países de América del Sur (Incluyendo Colombia) y América Central (WHO 2013). La resistencia a insecticidas en vectores, se convierte en una limitante para el manejo de los programas de control, requiriendo la búsqueda de nuevas sustancias y moléculas con acción insecticida (Giraldo et al. 2008; Leyva et al. 2012). En busca de alternativas amigables con el medio ambiente y efectivas en el control de mosquitos, se han utilizado aceites esenciales extraídos de plantas medicinales y/o aromáticas, los cuales han mostrado tener un potencial en la actividad insecticida (Silva et al. 2008; Bakkali et al. 2009; Vera et al. 2014). Actualmente, se reporta el uso de estas sustancias para el control de mosquitos ejerciendo actividad como: larvicidas, repelentes, disuasivos de oviposición, inhibidores de desarrollo y crecimiento (Leyva et al. 2012, Vera et al. 2014).

Numerosos estudios han descrito la composición y la bioactividad que presenta especies del género *Thymus* de la familia Lamiaceae, siendo de interés farmacológico *Thymus vulgaris* el cual presenta actividad antifúngica, antimicrobiana, antioxidante (Bozin et al. 2007; Miladi et al. 2013). Debido a las propiedades farmacológicas señaladas anteriormente para *T. vulgaris*, se plantea la necesidad de estudiar la actividad biológica del aceite esencial proveniente de *Thymus vulgaris* en el control de *S. aegypti*. Así como también elucidar su mecanismo de acción.

2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿El aceite esencial de *Thymus vulgaris* tiene actividad ovicida, larvicida, pupicida, adulticida en *Stegomyia aegypti*?

¿El aceite esencial de *Thymus vulgaris* ejerce efecto atrayente y/o repelente durante la oviposición de hembras de *Stegomyia aegypti*?

¿El aceite esencial de *Thymus vulgaris* tiene actividad repelente contra *Stegomyia aegypti*, cuando es aplicado de forma tópica en humanos?

¿Cuáles son las posibles rutas de acción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* contra *Stegomyia aegypti*?

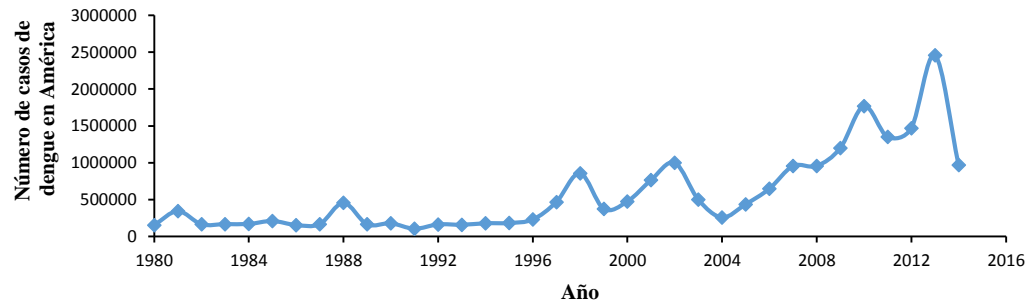
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1. IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL DENGUE

El dengue es una enfermedad viral que se transmite a través de la picadura de un mosquito del género *Stegomyia*, siendo el vector principal *Stegomyia aegypti*; otras especies transmisoras son *Stegomyia albopictus*, *Aedes poliniensis* y *Aedes mediovittatus* (Bhatt et al. 2013). El virus del dengue (VDEN) es un virus de ARN pequeño monocatenario que abarca cuatro serotipos diferentes (VDEN-1 a VDEN-4), los cuales pertenecen al género Flavivirus y a la familia Flaviviridae (San Martin et al. 2010). La manifestación clínica de la enfermedad es de amplio espectro, incluyendo un síndrome febril inespecífico hasta una enfermedad severa caracterizada por permeabilidad vascular, complicaciones hemorrágicas y deterioro de órganos (Laughlin et al. 2012).

En América, el dengue constituye una situación epidemiológica muy compleja dada la circulación de los cuatro serotipos, además de la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y las condiciones climáticas que hacen propicia la transmisión de la enfermedad. A principios de los 80s el número de casos reportados comenzó a aumentar considerablemente y esta tendencia se ha mantenido (**Figura 1**). Así, durante los años 90s se reportaron alrededor de 2,7 millones de casos, mientras que tan sólo en el año 2010 se notificaron más de 1,7 millones, de los cuales 50.235 fueron casos severos (con 1.185 muertes). Durante las últimas cuatro décadas, el dengue ha sido reconocido como la enfermedad viral más importante de los seres humanos transmitida por artrópodos (Shepard et al. 2011). En el 2011 se reportó en América una incidencia de dengue mayor a 200 casos por cada 100.000 habitantes (Brathwaite et al. 2012). Tanto para la salud humana como para la economía global el impacto del dengue es alarmante principalmente en zonas tropicales y subtropicales, lo cual incrementa la necesidad de implementar mecanismos de prevención y control (Tikar et al. 2008; Martínez 2008).

Figura 1. Casos de dengue en América durante los años 1980-2015. Fuente: Reporte semanal de dengue por país. Programa Regional de Dengue (OPS).



3.2. VECTOR PRINCIPAL DEL DENGUE: *Stegomyia aegypti*

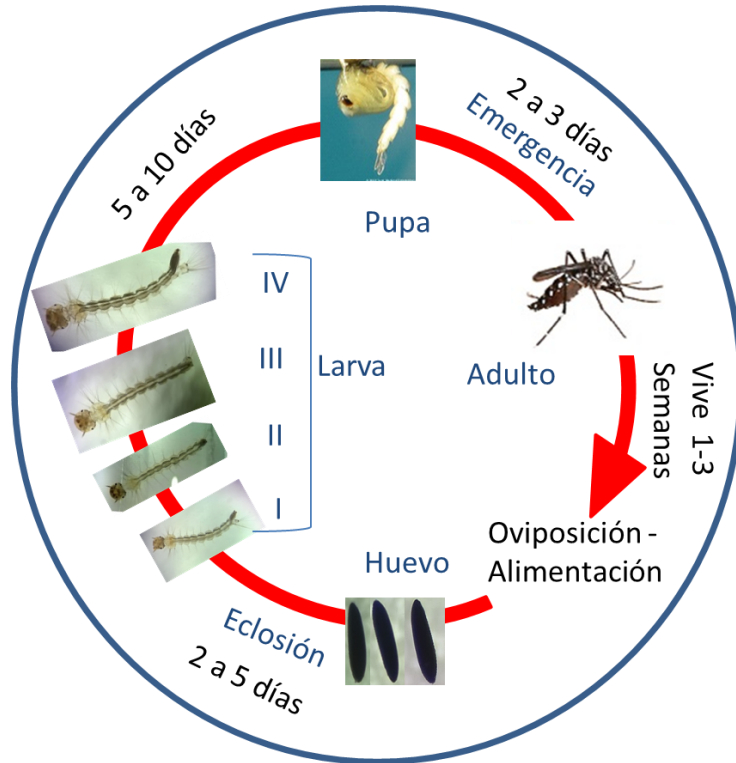
Este mosquito es una especie tropical y subtropical ampliamente distribuida alrededor del mundo, especialmente entre las latitudes 35°N y 35°S a 10°C aproximadamente. Su rango de distribución altitudinal se encuentra por debajo de los 2.000 m. s. n. m (Le Goff et al. 2013).

3.2.1. Ciclo de vida de *Stegomyia aegypti*. Este mosquito presenta un ciclo de vida holometábolo pasando por cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto (**Figura 2**). Los tres primeros estadios son acuáticos, mientras que el estadio de adulto es terrestre. En las regiones tropicales el ciclo de vida se completa entre 7 y 13 días (Le Goff et al. 2013). A continuación se da una breve descripción de cada uno de los estadios:

- **Huevo.** Los huevos son ovipositados por las hembras, durante 3-5 días, luego de ser alimentadas con sangre. El número de postura de huevos varía de 10 a 100 por oviposición. De hecho, una hembra vigorosa puede llegar a ovipositar hasta 500 huevos. La mayoría de huevos pueden durar largos periodos sin agua antes de eclosionar, los cuales son llamados huevos resistentes a la desecación o inactivos. Estos huevos resisten altas temperaturas y condiciones de sequía hasta por un periodo de un año. Los huevos eclosionan 4 días después de estar expuestos a humedad constante. Inicialmente se tornan blancos y luego pasan a ser oscuros con el desarrollo del embrión, que en óptimas condiciones se desarrolla entre 48 y 72 horas (Guzmán et al. 2013).

- **Larva.** Las larvas se generan de la eclosión de los huevos y experimentan un ciclo de cuatro estados larvarios. Su desarrollo se completa en siete días, siendo la temperatura optima de 25°C a 27°C. La temperatura mínima y máxima que soportan es 13°C y 35 °C, respectivamente. Durante su desarrollo se alimentan de material orgánico plantado o sumergido en los recipientes que habitan, siendo importante el lugar para el crecimiento y alimentación (Guzmán et al. 2013).
- **Pupa.** Corresponde al tercer estadio del mosquito. En este estadio las pupas no se alimentan, y tienden a moverse poco, presentan un periodo de reposo donde se presentan importantes modificaciones y cambios anátomo-fisiológicos que conducirán a la última fase del desarrollo. Este período dura de 1 a 3 días en condiciones favorables de temperatura es decir entre 13°C y 35 °C, pero variaciones extremas como cambio en la temperatura pueden prolongarlo (Guzmán et al. 2013).
- **Adulto.** Su etapa reproductiva inicia de 24 a 48 horas despues de emerger de la pupa. En este periodo la hembra necesita fuentes proteicas para poder madurar los ovocitos y depositar sus huevos. La hembra es la única que se alimenta de sangre y sus hábitos alimenticios son principalmente diurnos, aunque existen registros de alimentación nocturna en presencia de luz artificial (Medlock et al. 2005; Guzmán et al. 2013). La alimentación es importante para que la hembra oviposite huevos embrionados viables que son huevos que puedan convertirse en adultos. En condiciones de laboratorio, las hembras pueden vivir entre 131 y 225 días, pero en condiciones de campo no viven mas de 30 dias (Guzmán et al. 2013).

Figura 2. Ciclo de vida de *Stegomyia aegypti*, cepa Rockefeller, mantenida en insectario, en condiciones controladas (T= 24° C; HR=75%; fotoperiodo 12h).



3.3. USO Y VÍAS DE PENETRACIÓN DE INSECTICIDAS PARA EL CONTROL DE *Stegomyia aegypti*

En la actualidad los principales insecticidas utilizados para el control de vectores, de acuerdo a su estructura química se clasifican en, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, insecticidas biológicos y reguladores del crecimiento (Braga & Valle 2007). Al contacto con estos compuestos se presentan diferentes vías de ingreso a los organismos, las cuales dependen de las propiedades fisicoquímicas de los insecticidas, las formulaciones y las condiciones ambientales. Entre las principales vías de ingreso se encuentran:

3.3.1. Penetración por vía cutánea. La entrada de los insecticidas a los organismos de forma dérmica, cutánea o por contacto es característico de insecticidas de tipo organofosforados, carbamatos, piretroides (permetrina), análogos de las hormonas juveniles (metopreno) e inhibidores del crecimiento de la quitina (diflubenzurón). Los cuales debido a su naturaleza química como compuestos de tipo lipofílicos y /o hidrofílicos, peso molecular y tiempo de exposición (difusión pasiva) pasan a través de la cutícula, la dermis y la epidermis (Lau et al. 2010; Sadanandane et al. 2012).

Los compuestos de tipo organofosforados se caracterizan por presentar compuestos derivados del ácido fosfórico, fosfónico y fosforico como ésteres, amidas o tioles, estos compuestos generalmente son liposolubles lo que facilita el paso a través de la cutícula de los insectos, además se hidrolizan fácilmente en agua lo cual permite que se degraden con mayor facilidad. Pertenecen a este grupo malation, diazinón, clorpirifos y diclorvos (Ramírez & Lacasaña 2001).

Los carbamatos son otro tipo de insecticidas los cuales son derivados de ésteres carbamatados, del mismo modo que los organofosforados, los carbamatos son fácilmente hidrolizables en soluciones alcalinas. Entre los más usados están el propoxur y el baygón (Ramírez & Lacasaña 2001).

Los piretroides son insecticidas de tipo sintético de baja toxicidad, pueden tener un grupo alfaciano (permetrin) o sin grupo alfaciano (cypermetrín) que le permiten ser solubles en agua, tener mayor estabilidad en el medio ambiente y ser más persistentes (Ramírez & Lacasaña 2001).

3.3.2. Penetración por vía oral y/o digestiva. Dentro de esta vía de penetración se encuentran los insecticidas de tipo: inhibidores de síntesis de quitina (*Bacillus thuringiensis*), los cuales bajo formulaciones tipo encapsulamiento y/o en forma de cristales se utilizan para tratamiento de agua y alimentos (Guevara et al. 2004).

Los insecticidas son ingeridos por estadios larvales pasando a través del epitelio intestinal, llegando a la hemolinfa en donde se liberan, endotoxinas que destruyen las paredes del intestino, propiciando pérdida de iones K^+ y de gradientes iónicos, generando una disminución en el pH del medio, provocando lisis celular (Ochoa & Arrivillaga 2009).

3.3.3. Penetración por vía respiratoria. Dependiendo de las formulaciones comerciales, los insecticidas también se pueden encontrar en forma de fumigantes, los cuales tienen la capacidad de difusión, una propiedad esencial para su función. Algunos pueden penetrar con facilidad a través de la ropa y ser absorbidos rápidamente a través de la membrana pulmonar, el intestino y la piel, en los insectos el insecticida ingresa a través del sistema traqueal y a través de los espiráculos (Casida 2009).

Un mismo insecticida puede tener la capacidad de actuar por las tres vías de penetración descritas anteriormente, como es el caso de algunos organofosforados y carbamatos, otros solo actúan por una sola vía, como la mayoría de inhibidores de síntesis de quitina que actúan por ingestión (Ramírez & Lacasaña 2001).

3.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS INSECTICIDAS

Los insecticidas se pueden clasificar según el mecanismo de acción de la siguiente manera: Neurotóxicos, bloqueadores de la respiración celular y reguladores de crecimiento.

3.4.1. Insecticidas neurotóxicos. Dentro de esta clasificación se encuentran los insecticidas, cuyo mecanismo de acción se basa en la interferencia de los impulsos nerviosos de diversos organismos e insectos. Estos insecticidas afectan la sinapsis entre axones, la unión neuromuscular, alteran la permeabilidad de los canales iónicos pre-sinápticos, e inhiben la actividad de enzimas indispensables para la neurotransmisión química, durante la sinapsis. Además se pueden fijar a receptores post sinápticos bloqueando la actividad enzimática. En todos los casos el resultado es la incoordinación muscular, parálisis (espástica o flácida) y muerte de los insectos (Lasansky 1971; Klowden 2013).

3.4.1.1. Inhibición de la sinapsis colinérgica

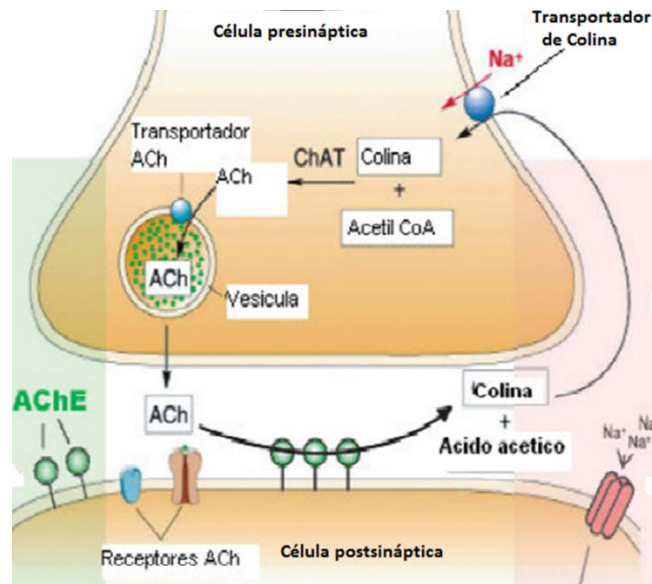
Neurotransmisor acetilcolina (ACh).

Este neurotransmisor ejerce su acción en diferentes regiones del sistema nervioso central (SNC) como en: ganglios periféricos y en la placa neuromuscular. El efecto de la ACh en la sinapsis termina por la actividad de una enzima conocida como acetilcolinesterasa (AChE) la cual hidroliza rápidamente a la ACh en acetato y colina, regulando la concentración de este neurotransmisor en la sinapsis (Maussolié et al. 1993) (**Figura 3**).

La inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) provoca la acumulación de acetilcolina en las sinapsis, de modo que la membrana post-sináptica entra en un estado de estimulación permanente, lo que resulta en ataxia es decir, falta de ordenación en el sistema neuromuscular generando enfermedades, que finalmente con llevan a la muerte (Casida & Quistad 2004, Casida 2009).

La acetilcolinesterasa pertenece a la familia de enzimas conocidas como colinesterasas, las cuales pueden ser definidas como un grupo de esterasas de serina capaces de hidrolizar ésteres de colina, tales como la acetilcolina. Presentan una distribución muy amplia desde organismos unicelulares, plantas, invertebrados y vertebrados, se puede encontrar unida a la membrana celular o de forma libre en el espacio extracelular (Massoulié et al. 1993; Casida 2009).

Figura 3. Esquema de una sinapsis colinérgica. En la terminal presináptica la acetilcolin transferasa sintetiza la acetilcolina a partir de colina y acetil coenzima A. La ACh se acumula en las vesículas vía un transportador y se libera por la acción de potenciales de acción. La ACh se hidroliza por la acetilcolinesterasa (AChE) soluble o anclada a la membrana. La colina se recaptura por un transportados de alta afinidad presente en la sinapsis, adaptación de Koolman & Klaus (2005).



Existen sustancias neuroactivas diferentes de los neurotransmisores como los neuropéptidos, que pueden desempeñar un papel en la transmisión sináptica, no generan la señal transmisora, pero la pueden regular. Estas moléculas pueden ser liberadas de las mismas terminales axónicas que los neurotransmisores, y se conocen como neuromoduladores, no tienen efecto directo sobre la membrana postsináptica, en su lugar puede aumentar, prolongar, inhibir o limitar el efecto del neurotransmisor (Curtis et al. 2006).

Existe una gran variedad de neurotransmisores y neuromoduladores cada uno tiene su mecanismo específico de síntesis, recepción, e inactivación. Desde el punto de vista del control de insectos otros neurotransmisores importantes son el ácido gamma aminobutírico (GABA), glutamato y octopamina (Qinfan et al. 2011; Klowden 2013).

3.4.1.2. Insecticidas que inhiben la sinapsis colinérgica

Organofosforados y Carbmatos

Los insecticidas organofosforados y carbamatos tienen grupos químicos diferentes, pero el mecanismo a través del cual producen toxicidad, se asocia con la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, mediante inhibición competitiva irreversible. La acetilcolinesterasa genera la hidrólisis de la acetilcolina, al estar inhibida la enzima, se genera acumulación de la acetilcolina en el espacio sináptico, interrumpiendo el impulso nervioso, lo que con lleva a la paralización del cerebro y muerte del insecto (Casida & Gary 1998; Casida et al. 2004; Casida 2009).

Piretroides

Los piretroides ejercen su acción de forma neurotóxica, generan constante estimulación y bloqueo exagerado del sistema nervioso. Son compuestos que se caracterizan por producir interferencia en el mecanismo de transporte iónico de la membrana del axón, también genera inhibición del calcio y magnesio, actuando sobre los neurotransmisores de las terminaciones nerviosas, interfiriendo en la función neuronal (Corbel et al. 2006; Casida 2009; Rodríguez et al. 2011).

Aceites esenciales

Algunos aceites esenciales actúan generando una inhibición competitiva por el sitio de acción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), generando una prolongación la acción del neurotransmisor acetilcolina, aumentando impulsos eléctricos permanentes que generan agotamiento muscular y efecto letal (Wattoo & Tapanee 2014).

3.4.2. Insecticidas bloqueadores de la respiración celular. Existen insecticidas cuyo blanco de acción es la inhibición el transporte de electrones en alguno de los complejos (I-IV) de la cadena respiratoria mitocondrial o actuando como desacopladores de la fosforilación oxidativa. Estos compuestos pueden inhibir la formación de gradiente de protones y la síntesis de ATP. Por ejemplo pueden actuar sobre la NADH deshidrogenasa, bloqueando la transferencia de electrones entre la flavina y la ubiquinona afectando el complejo I, están los compuestos como cyenopirafen que inihibe la succinato deshidrogenasa, en el complejo II (Figura 4) (Moncada 2010; Narahashi et al. 2007).

3.4.2.1. Insecticidas que inhiben la respiración celular

Fenzaquin

Dentro de estos compuestos se encuentran la rotenona y los acaricidas como fenazaquin inhibidores del transporte de electrones, a través del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, impiden la oxidación del malato, glutamato y otros sustratos de las enzimas dependientes de NAD⁺, no permiten la formación de gradientes de H⁺ (Triepels et al. 2001).

Clorfenapir

El Clorfenapir es un tipo de compuesto químico lipófilico, se convierte en metabolito activo por la acción de las enzimas presentes en el intestino de los insectos al ser ingerido, actua como desacoplador de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, alterando la permeabilidad en las membranas, el gradiente de protones y la síntesis de ATP. Esto conlleva a la muerte celular (Hunt et al. 1998; Vasudevan & Vaidyanathan 2011).

Aceites esenciales

Los aceites esenciales también incluyen compuestos con propiedades antioxidantes, como son los compuestos fenólicos y terpenoides. Algunos aceites esenciales muestran diferentes niveles de citotoxicidad dependiendo de su composición química, especialmente en relación con su contenido fenólico, afectando la permeabilidad de las membranas mitocondriales, actuando como desacopladores en las mitocondrias (Bakkali et al. 2008). A continuación, los inhibidores más comunes de la cadena respiratoria son descritos en la **Tabla 1**.

Figura 4. Cadena transportadora de electrones (Complejo I, II, III, IV). La cadena transportadora de electrones inicia, con el flujo de electrones desde en NADH o FADH₂ al O₂ a través de cuatro complejos proteicos situados en la membrana mitocondrial interna.

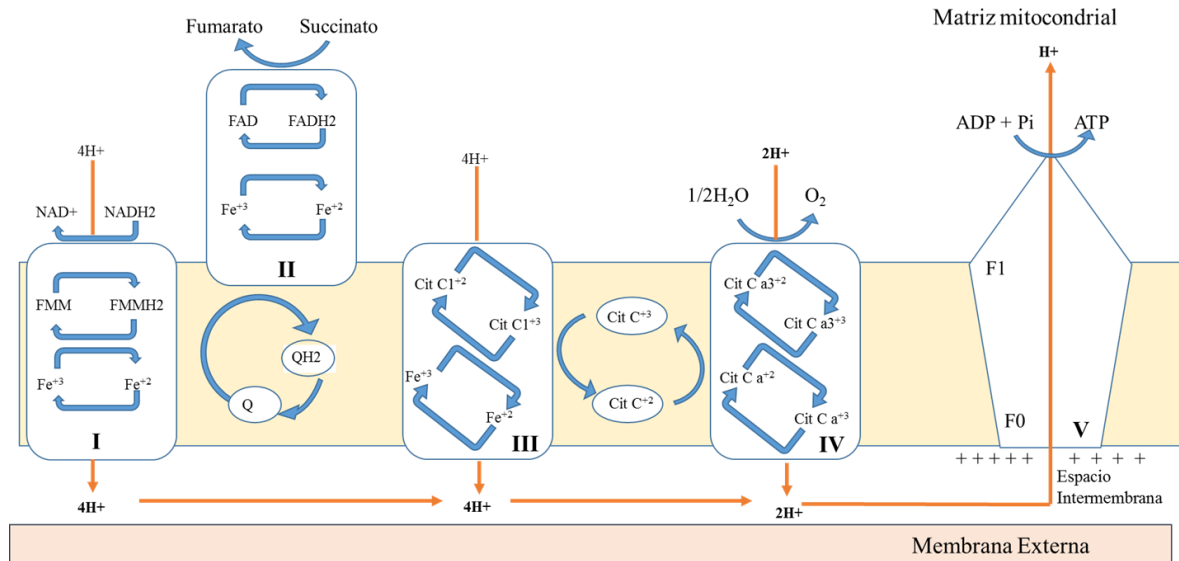


Tabla 1. Inhibidores de la cadena respiratoria.

Inhibidores de la cadena de transporte de electrones			
Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV
Rotenona Barbitúricos Piericidina Fenazaquin Clorpromazina	Carboxina	Antimicina Naftoquinona	Monóxido de carbono Cianuro (CN ⁻) Azida (N ³⁻) Sulfuro de hidrogeno (H ₂ S)
Inhibidores de la fosforilación oxidativa			Desacoplantes
Oligomicina (inhibe el flujo de protones hacia F ₀) Ionoforos (Valiomicina) Atractilosido (inhibe la translocasa)			2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) 2,4-dinitrocresol (2,4-DNC) Carbonilcianuro- <i>m</i> -clorofenilhidrazona (CCCP), Clorfenapir

3.4.3. Insecticidas reguladores de crecimiento. Los insecticidas conocidos como reguladores de crecimiento, se caracterizan por afectar funciones metabólicas específicas en los insectos, provocando principalmente un desequilibrio en el crecimiento y desarrollo del insecto. Estos compuestos imitan la acción de la hormona juvenil, inhiben la síntesis de quitina, también pueden acelerar el proceso de la muda antes que el organismo haya realizado sus procesos de morfogénesis, reproducción y embriogénesis normalmente. Los más destacados son los inhibidores de la síntesis de quitina y los análogos de la hormona juvenil (Ono 2014; Nishiura et al. 2003)

3.4.3.1. Inhibidores de la síntesis de quitina. Son compuestos que interfieren con la síntesis de la quitina. La quitina es un amino polisacárido que forma partes esenciales de la cutícula de artrópodos como insectos, garrapatas, ácaros, arañas, etc. que a su vez es el elemento protector esencial del exoesqueleto (Belinato et al. 2009).

Para que los insectos puedan crecer en talla y desarrollarse, los estadios inmaduros de los artrópodos tienen que mudar y en la producción de esta nueva cutícula necesitan quitina, que es la que le produce la dureza. Los inhibidores de la síntesis de quitina hacen imposible esta síntesis: la larva o ninfa no puede mudar correctamente y muere en el intento. (Lau et al. 2010; Sadanandane et al. 2012). Los principales síntomas son distorsión de la endocutícula, lo cual ocasiona la ruptura de la cutícula y exudación de los fluidos internos del cuerpo, la larva se vuelve color oscuro debido a la oxidación de la hemolinfa exudada. Las sustancias activas de este tipo más empleadas son ciromazina, diciclanic y diflubenzurón (Lau et al. 2010; Sadanandane et al. 2012).

3.4.3.2. Análogos de la hormona juvenil. Los análogos de la hormona juvenil, son compuestos que sustituyen la actividad de dicha hormona durante el desarrollo larval. Afectan sobre todo a la última etapa en donde se da el cambio de muda de larva a pupa. Las pupas no se forman correctamente o se encuentran en estadios intermedios entre larva y pupa, los adultos no emergen de la pupa interrumpiendo el proceso de desarrollo normal de los insectos. Los análogos de la hormona juvenil más empleados son fenoxicarb, metopreno y piriproxifén (Silva et al. 2003; Silva & Mendes 2007).

3.5. RESISTENCIA A INSECTICIDAS

La resistencia a los insecticidas es considerado como un problema grave para el control vectorial, requiriendo un enfoque proactivo para combatirlo (Pavela 2015). La aparición de la resistencia está determinada por características genéticas intrínsecas de los vectores tales como la frecuencia y dominancia de los alelos resistentes, las formas de penetración en la cutícula, así como factores biológicos como ciclo de vida, número de descendientes por generación, aislamiento, movilidad y migración, y aspectos operativos como calibración de equipos, aplicación de dosis sub-letales o excesivas de insecticida, personal poco capacitado que usa indiscriminadamente los insecticidas (Rodríguez et al. 2011).

La resistencia es definida como el desarrollo de la habilidad de tolerar dosis de tóxicos, las cuales resultarían letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma. Estos problemas se han convertido en el principal impulso para una búsqueda de nuevas alternativas, aceptables para el medio ambiente, la salud y para la protección contra insectos. Entre las estrategias alternativas existentes está el uso de pesticidas a base de extractos de plantas (Pavela 2015).

3.6. ACEITES ESENCIALES COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE VECTORES

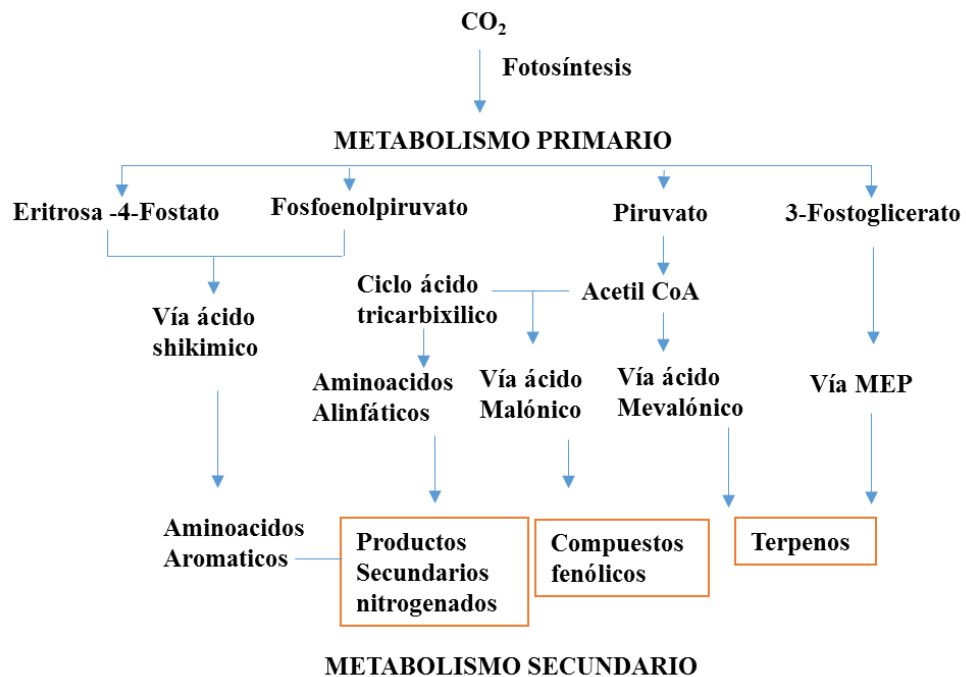
Los AEs son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos a partir de material vegetal (i.e. flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces). Son sintetizados en pequeñas cantidades y de forma no generalizada por las diversas partes u órganos de las plantas. Su producción es restringida a un determinado género, familia, o especies de plantas (Burt 2004; Rattan 2010).

Los aceites esenciales son productos derivados del metabolismo secundario e.g. no son esenciales para el metabolismo sino que son sintetizados como defensa, adaptación, etc (Zari 2012). Los aceites esenciales se caracterizan por ser mezclas complejas que pueden llegar a tener más de 100 componentes, los cuales pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular (e.g. alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos.

La producción de estos metabolitos depende de las interacciones de las plantas con el medio ambiente e. g. protección frente a depredadores, patógenos o estrés ambiental que sufren durante su crecimiento o está relacionada con la maquinaria reproductiva de la planta i.e. atracción de insectos para la promoción de la polinización (Croteau 1987). En la **Figura 5**, se observa un esquema general de las vías biosintéticas de estos compuestos (Celis 2007).

Desde la edad media, los seres humanos han utilizado los AEs por sus propiedades ya observadas en la naturaleza: protección de las plantas, antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas. En la actualidad se conocen 3.000 aceites esenciales aproximadamente, de los cuales 300 son de importancia comercial, especialmente para la industria farmacéutica, agronómica, alimentaria, sanitaria, cosméticos y perfumes. Además, son usados por la medicina casera dada sus propiedades medicinales (Hajhashemi et al 2003; Silva et al. 2003). Algunos de ellos constituyen alternativas eficaces o complementarias a compuestos sintéticos de la industria química, sin mostrar los mismos efectos secundarios (Carson & Riley 2003).

Figura 5. Principales interrelaciones entre el metabolismo primario y el metabolismo secundario de las células vegetales (Adaptado de Celis 2007).



3.6.1. Composición química de los aceites esenciales. Los aceites esenciales son mezclas que pueden contener terpenos, terpenoides, compuestos aromáticos y alifáticos, caracterizados por bajo peso molecular. Los terpenos constituyen el 90% de los aceites esenciales y forman diferentes clases estructurales y funcionales. Los compuestos aromáticos se producen con menor frecuencia que los terpenos y se derivan del fenilpropano. Por último, los compuestos azufrados o componentes nitrogenados como glucosinolatos o derivados isotiocianato, también son característicos de los metabolitos secundarios pero en menor cantidad (Bakkali et al. 2008). Generalmente los componentes mayoritarios son los que determinan las propiedades biológicas del aceite esencial (Bakkali et al. 2008).

3.6.2. Efectos biológicos los aceites esenciales. Los AEs suelen exhibir diferentes efectos biológicos, entre los cuales se resaltan los siguientes:

Citotoxicidad: debido a la gran cantidad de componentes, los aceites esenciales no tienen objetivos celulares específicos. Los AEs de carácter lipófilos, pasan a través de la pared y la membrana citoplasmática, alterando la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, y causan permeabilización de las membranas, asociada con la pérdida de iones y la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y el agotamiento del ATP (Carson et al. 2002). En general, la actividad citotóxica de los AEs se debe principalmente a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes. Esta propiedad es de gran importancia en las aplicaciones de los aceites esenciales contra ciertos animales, patógenos o parásitos humanos, y la conservación de los productos agrícolas o marinos (Bruni et al. 2004; Sacchetti et al. 2005).

Fototoxicidad: algunos aceites esenciales contienen moléculas fotoactivas (furocumarinas), como el AE *Citrus aurantium* ssp (Bergamia) que contiene psoralenos que se unen al ADN y bajo exposición a la luz ultravioleta producen mono y bi-adductos que son citotóxicos y altamente mutagénicos (Averbeck et al. 1990). Los AEs con moléculas fotoactivas pueden generar reacciones que conducen a la producción de radicales libres, los cuales pueden llegar a causar daños considerables a la membrana celular, el ADN y las proteínas (Averbeck et al. 1990).

3.6.3. Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. *T. vulgaris* es originario de la región del Mediterráneo y países vecinos, del norte de África y partes de Asia, (Hendawy et al. 2010; El-Nekeety et al. 2011). Es una planta utilizada como condimento culinario, sus hojas aromáticas se utilizan frescas o secas como condimento en salsas, sopas, carnes y pescados, aderezos para ensaladas, verduras, productos de confitería, bebidas y sirve como un conservante para alimentos especialmente a causa de su efecto antioxidante (Miladi et al. 2013).

Tradicionalmente, la planta ha sido empleada en la medicina popular por sus propiedades farmacológicas y biológicas como antiespasmódicas, antiséptico, expectorantes, trastornos gastrointestinales y respiratorios (Affonso et al. 2009).

Actualmente se reporta sobre su efecto antibacterianos, antioxidante, conservante de alimentos naturales aumentando su uso en la industria cosmética ha aumentado la importancia económica de este cultivo medicinal en todo el mundo. Experimentos farmacológicos *in vitro* llevados a cabo durante la última década revelan actividades farmacológicas para el aceite esencial de *T. vulgaris*, para los compuestos principales como el timol y carvacrol (Miladi et al. 2013), presentando actividad como antibacterianos (Balushi et al. 2013), antifúngicos, antioxidantes (Lee et al. 2005; Bozin et al. 2007) y mutagénicos (Nostro et al. 2007).

3.7. ANÁLISIS *In silico*

3.7.1. Principio de hibridación molecular. Describe el enfoque experimental y computacional que se debe estimar en el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas con actividad insecticida. Para llevar a cabo este análisis, Lipinski et al. 2001 formularon la regla de los cinco de Lipinski, que consiste en una comparación teórica entre los fragmentos de fármacos ya conocidos y los de la molécula a evaluar, en donde se tiene en cuenta las similitudes entre estos y su estructura química.

Estos parámetros nos sugieren si una molécula tiene o no afinidad, con respecto a la permeabilidad medida por la lipofilidad (mediante el índice de partición octanol/agua) y la solubilidad del fármaco en el organismo. Al analizar las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción,

además de propiedades de toxicidad aceptables para el organismo (ADME-Tox), los parámetros de Lipinski que debe cumplir una molécula para que un fármaco tenga buenas propiedades ADME-Tox son:

- Peso molecular ≤ 500 Da
- Número de donadores de enlaces de Hidrógeno ≤ 5 (-OH, -NH)
- Número de aceptores de enlaces de H ≤ 10 (O, N)
- $\text{LogP} \leq 5$ (Partición Octanol/agua)

También existen otros parámetros para tener en cuenta en el estudio de moléculas y/o fármacos, estos son: el número de enlaces rotables (NER) que mide la flexibilidad de la molécula según el número de enlaces sencillos acíclicos y el área superficial polar de la molécula (PSA) que se refiere a la sumatoria de las superficies de átomos polares (oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo), los valores aceptables son: $\text{NER} \leq 10$ y $\text{PSA} \leq 5$, si la molécula cumple con estos parámetros teóricamente tendrá permeabilidad a través del intestino delgado.

Lipinski encontró que al combinar al menos dos de los parámetros nombrados anteriormente, se obtenía un rango inferior al 10%, lo que significa que si dos de los parámetros están por fuera del rango aceptable es posible que los parámetros ADME-Tox sean bajos, y no cumplan los parámetros de solubilidad y permeabilidad propios de la mayoría de los fármacos (Veber et al. 2002).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biológica y el mecanismo de acción del aceite esencial extraído de *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) frente a *Stegomyia aegypti* (Culicidae).

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la actividad ovicida, larvicida, pupicida, adulticida, repelente y de repelencia a ovoposición del aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a *Stegomyia aegypti*.
- Describir la acción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial de *Stegomyia aegypti*.
- Evaluar la existencia de inhibición de la acetilcolinesterasa en larvas de *Stegomyia aegypti* con la aplicación del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.
- Determinar la existencia de fragmentación de ADN extraído de larvas de *Stegomyia aegypti* cuando se somete a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.
- Relacionar el análisis *In Silico* de los componentes mayoritarios de *Thymus vulgaris* con la acción biocida frente a *Stegomyia aegypti*.

5. JUSTIFICACIÓN

El propósito de este trabajo de investigación se basó en proporcionar información necesaria sobre el efecto insecticida del aceite esencial de *T. vulgaris*, como futuro compuesto natural a ser empleado en los programas de control del vector del dengue *S. aegypti*.

En la actualidad se conocen aproximadamente 3000 especies diferentes de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas, de los cuáles 300 son comercialmente importantes en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y perfumería (Bakkali et al. 2008). Desafortunadamente, son muy pocos los estudios que han realizado pruebas que señalen el destino y modo de acción de los aceites esenciales con actividad contra los insectos y otros organismos (Casida 2009).

Actualmente, la identificación y caracterización de los aceites esenciales, ha permitido establecer una lista de sustancias químicas con actividad farmacológica destacable, las cuales atribuyen a la planta diversas propiedades como: insecticidas y repelentes entre otras. Es así como, basados en las publicaciones acerca de las diversas actividades biológicas que representa el aceite esencial *T. vulgaris*, se hace necesario dilucidar el mecanismo de acción contra *S. aegypti*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL Y MATERIAL BIOLÓGICO

El aceite esencial de *T. vulgaris* fue suministrado por el Centro de Investigación en biomoléculas (CIBIMOL) y el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), adscritos a la Universidad Industrial de Santander.

La extracción del aceite esencial se realizó de cultivos de plantas que crecieron en el Municipio de Sucre (Santander) desde los 150 hasta 1.200 m de altitud, esta zona fue caracterizada por presentar suelos fértiles y condiciones climáticas (precipitaciones, temperatura y humedad) apropiadas para el crecimiento y desarrollo de la planta. La composición química se llevó a cabo utilizando el protocolo reportado por Stashenko et al (2004). El AE fue almacenado a 4°C en las instalaciones del Centro de investigaciones en enfermedades Tropicales (CINTROP) bajo el N° vaucher: 555843.

Los bioensayos se realizaron con individuos de la colonia de *S. aegypti* cepa Rockefeller mantenida en jaulas de cría (40×40×40 cm) en el insectario del CINTROP a una temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad de $70 \pm 5\%$ y fotoperiodo 12:12. Los adultos de *S. aegypti* se alimentaron con una solución azucarada de miel al 10%, la cual se remplazaba día por medio (**Figura 6**). Las hembras se alimentaron una vez por semana, usando ratas tipo raza Wistar WI IOPS AF/Han Las ratas fueron facilitadas por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Figura 6. Alimentación de adultos con solución azucarada al 10% y de hembras con rata tipo Wistar



Las hembras de *S. aegypti* eran alimentadas con la sangre de la rata. Luego se colocaba en el interior de la jaula un dispositivo de oviposición (**Figura 7**). Después de 5 a 7 días de oviposición, se retiraba el papel filtro del contenedor y se dejaban secar los huevos por tres días a temperatura ambiente, para permitir la maduración de los embriones. Posteriormente se estimulaba la eclosión de las larvas sumergiendo los huevos en agua y alimentándolos con alimento para peces. Las larvas eran mantenidas en bandejas plásticas y alimentadas con alimento para peces. Cuando alcanzaban el estadio de pupa en las bandejas plásticas, se seleccionaban en un recipiente y se pasaban a las jaulas de cría de adultos (**Figura 8**).

Figura 7. Dispositivo de oviposición.



Figura 8. Selección de pupas.

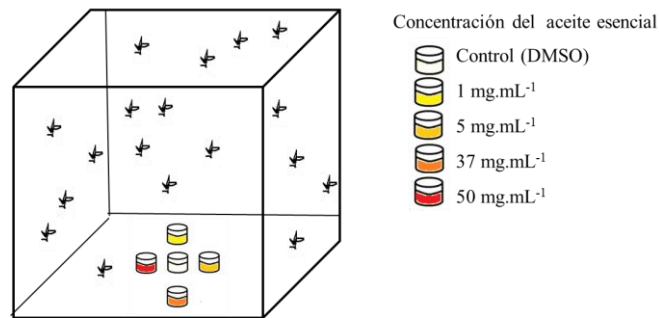


6.2. BIOENSAYOS ACTIVIDAD OVICIDA

Los ensayos de actividad ovicida se realizaron siguiendo el método de Su y Mulla 1998 con algunas modificaciones. Se seleccionaron 20 hembras grávidas y se distribuyeron al interior de una jaula de seguridad de 40x40x40 cm. Al interior de la jaula se colocaron cinco dispositivos de oviposición, cuatro de ellos con las respectivas concentraciones del AE de *T. vulgaris* (1, 5, 37 y 50 mg.mL⁻¹) y

un control (DMSO al 0.5%) (**Figura 9**). Después de aproximadamente 4 horas de la oviposición (HDO) de una de las concentraciones, se seleccionó una muestra de huevos frescos (50-100 huevos en total). Los huevos se mantuvieron separados de acuerdo con cada concentración de AE y se estimularon para eclosionar, sumergiéndolos en agua y alimentándolos con alimento para peces. El procedimiento de recolección de huevos y su posterior eclosión se llevó a cabo diariamente durante un total de cuatro días.

Figura 9. Diagrama de ensayo actividad ovicida.



Tanto para huevos frescos como para huevos embrionados se evaluó el porcentaje de eclosión aplicando la siguiente fórmula (Su y Mulla. 1998):

$$\% \text{ Eclosión huevos} = \frac{\text{Número total de larvas eclosionadas}}{\text{número total de huevos}} \times 100$$

6.3. EFECTOS DE *T vulgaris* SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Para identificar posibles alteraciones en el desarrollo embrionario se siguió el método de Su y Mulla (1998) con algunas modificaciones. Se realizó la aclaración de los huevos ovipositados en las diferentes concentraciones del AE (1, 5, 37 y 50 mg.mL⁻¹). Se usó una solución de Clorox® al 20% durante 10-20 minutos. Luego de realizar el aclaramiento, los huevos se observaron bajo con un

microscopio Nikon H550L de campo claro y se identificaron las etapas embrionarias de acuerdo con (Farnesi 2009; Vargas et al. 2014). Se tomaron fotografías de los embriones que mostraron cambios morfológicos representativos a cada concentración, se examinaron al menos 100 embriones. Los huevos que no eclosionaron después de siete días se consideraron huevos con el embrión muerto.

6.4. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD LARVICIDA

Para los ensayos de actividad larvicida se seleccionaron larvas entre tercer y cuarto estadio. Se evaluaron cinco concentraciones del AE (10, 20, 30, 45, y 58 mg.mL⁻¹) y un control por concentración (DMSO al 0.5 %). Por cada concentración se usaron 50 larvas. La lectura de mortalidad se tomó a las 24 y 48 horas después de la exposición. El ensayo se repitió tres veces en días diferentes y se determinó el porcentaje de mortalidad y las concentraciones letales: CL₅₀ y CL₉₅.

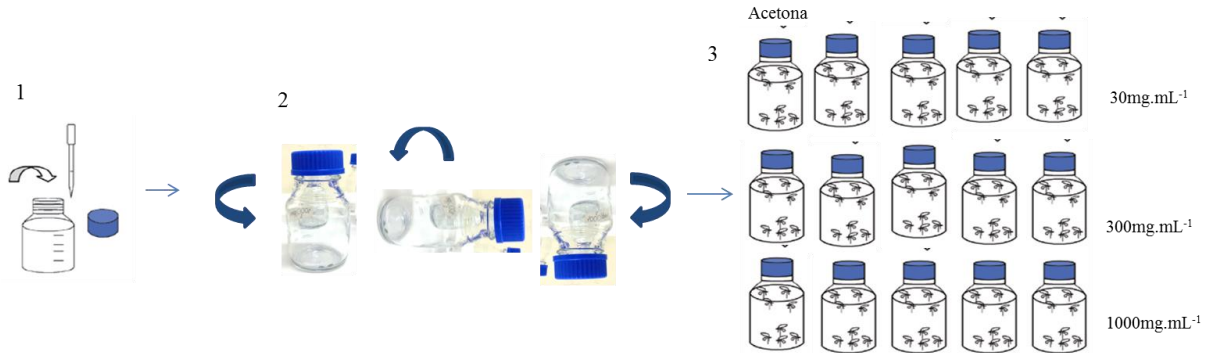
6.5. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD PUPICIDA

Para los ensayos de actividad pupicida se seleccionaron pupas entre 12 y 24 horas después de pasar por el cuarto estadio larval. Se evaluaron tres concentraciones del AE (250, 310 y 390 mg.mL⁻¹) y un control (DMSO al 0.5 %). Para cada concentración se usaron 20 pupas. Los ensayos fueron realizados por triplicado en días diferentes y se determinó el porcentaje de mortalidad en las diferentes concentraciones a las 24 y 48 horas de exposición al AE.

6.6. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD ADULTICIDA

La actividad adulticida se evaluó de acuerdo con el método de botella CDC (Brogdon y McAllister 1998). Botellas de vidrio Wheaton 250 mL se impregnaron con el AE a tres concentraciones (30, 300 y 1000 mg.mL⁻¹) y un control (Acetona). Se usaron 40 hembras por cada concentración. (**Figura 10**). La actividad adulticida se registró inicialmente en 0 a 2 minutos de exposición, y cada 15 minutos a partir de la exposición hasta por 2 horas. La tasa de mortalidad se calculó 24 horas después del bioensayo.

Figura 10. Diagrama de impregnación de botellas. A. Impregnación de la botella con el aceite esencial de *T. vulgaris*. B. Homogenización del aceite esencial. C. Exposición de adultos a cada concentración del AE.



6.7. BIOENSAYOS DE ACTIVIDAD REPELENCIA A LA PICADA DE LOS MOSQUITOS

Los ensayos de actividad repelente en humanos se realizaron usando 20 hembras entre 5-10 días de emergidas de *S. aegypti*, grávidas nulíparas y únicamente alimentadas a base de glúcidos de acuerdo con la metodología propuesta por la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) (2000) y el método ASTM-E951-94 para bioensayos de repelencia.

Este experimento utilizó los brazos de los voluntarios después de su consentimiento informado aprobado por el Comité Ética (**Anexo A**), se marcó un área de 4 cm^2 , el antebrazo derecho se usó para evaluar el AE a una concentración de 1000 mg.mL^{-1} y el brazo izquierdo para el tratamiento de control (Acetona). Luego de 10 minutos (tiempo de secado) después de cada aplicación. Se utilizaron dos dispositivos acrílicos rectangulares ($18 \times 5 \times 4\text{ cm}$) para contener las hembras para el experimento (Cintrop, Diseño 201, **Figura 11**). Los dispositivos tenían dos aberturas, cada uno de 29 mm de diámetro, de modo que una sección del antebrazo del voluntario estaría expuesto a los mosquitos. Se registró el número de picaduras y aterrizajes durante los primeros 2 minutos y en intervalos de 15 minutos hasta la primera picada. Tres réplicas de cada experimento se llevaron a cabo en días diferentes.

Para calcular el porcentaje de repelencia, se usó la fórmula propuesta por Phasomkusolsil y Soonwera (2011a), para cada uno de los intervalos de tiempo (Tawatsin et al. 2001; Thavara et al. 2001).

$$\% \text{ Repelencia} = \frac{\text{Número de picada en control} - \text{Número de picadas en el tratamiento}}{\text{Numero de picada en control}} \times 100$$

Figura 11. Uso de dispositivo en acrílico para ensayo de repelencia. A. Dispositivo en acrílico. B. ubicación del dispositivo en antebrazo. C. Puerta abierta para exposición de área impregnada con el AE a los mosquitos.



6.8. BIOENSAYOS ACTIVIDAD ATRAYENTE Y/O DETERRENTE PARA LA OVIPOSICIÓN

Se evaluó la preferencia de oviposición de hembras nulíparas, grávidas, con el abdomen visiblemente hinchado por la alimentación sanguínea, mediante el uso de dispositivos de oviposición. Los cuales consistieron en vasos de vidrio revestidos con papel filtro Whatman ® # 1, que contenían 30 mL de agua (especificar el tipo de agua) con diferentes concentraciones del aceite esencial (5, 50 y 200 mg.mL⁻¹) y un control (DMSO al 0.5%). Los dispositivos, se distribuyeron en cuatro jaulas de seguridad de 40×40×40x40 con 10 hembras (**Figura 12**).

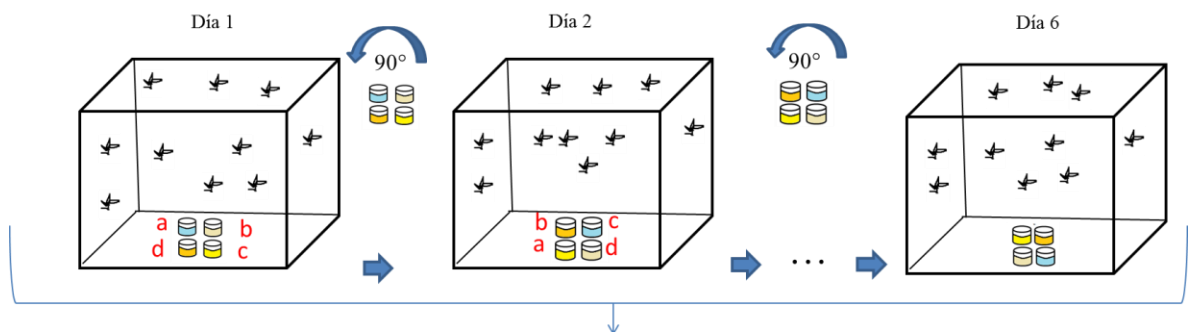
Los vasos se cambiaron cada 24 horas, manteniendo las concentraciones y eran rotados 90° en sentido anti-horario, con el fin de evitar preferencias de la hembra por ovipositar en un lugar particular. Diariamente se registró el número de huevos puestos en cada concentración. El ensayo duro un total de seis días y fue llevado a cabo por triplicado (**Figura 13**)

Figura 12. Jaulas de experimentación con adultos de *S. aegypti*.



Se determinó el índice de actividad de oviposición (IAO), según lo sugerido por Kramer y Mulla (1979), delimitado los valores del IAO en rangos desde -1 a +1. Los criterios para determinar la atracción o la disuasión, fueron los siguientes: los valores positivos indicaron la ocurrencia de más huevos en el tratamiento en comparación con el control, lo que confirma una atracción cuando la puesta de huevos es mayor que en los tratamientos. Menos huevos puestos en el tratamiento en comparación con los controles indicaron que la puesta de huevos es disuadida. Los compuestos con IAO mayores o iguales a 0,3 se consideran atrayentes y compuestos con un IAO menos de o igual a -0,3 se consideran elementos disuasivos.

Figura 13. Diseño de bioensayo de oviposición. Los dispositivos para la oviposición se colocaron en el centro de la jaula. Cada dispositivo contenía los siguientes medios (letras color rojo): a) Control agua, (b) 5 mg.mL⁻¹ de AE, (c) 50 mg.mL⁻¹ de AE, (d) 200 mg.mL⁻¹ de AE.



Conteo de huevos diario por cada concentración del AE, durante 6 días.

6.9. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE LARVAS DE *S. aegypti*

Las mitocondrias se aislaron de larvas entre tercer y cuarto estadio, por centrifugación diferencial de acuerdo a lo descrito por Voss et al. 1961, con algunas modificaciones, utilizándose como medio de aislamiento: D-manitos 250mM, HEPES, a un pH 7.2, EGTA 1mM y BSA 0.1% p/v.

Las larvas fueron procesadas en un homogeneizador Van Potter Elvehjen y la suspensión obtenida se filtró usando lana de vidrio. El material final se centrifugó a $300g \times 5 \text{ min}$ a 4°C . Se descartó el sedimento y se centrifugó el sobrenadante a $8000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ a 4°C . El precipitado obtenido, fue re-suspendido en medio de extracción y se centrifugó a $300 \text{ g} \times 5 \text{ min}$ a 4°C . El sobrenadante se re-suspendió en medio de extracción sin BSA y se centrifugó a $7000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ a 4°C . Finalmente el precipitado resultante se resuspendió en buffer de aislamiento sin BSA y se mantuvo a 4°C hasta su utilización

6.10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES

La concentración de proteína en las mitocondrias se determinó por el método colorimétrico de Bradford (1976). Para esto se usó albúmina como patrón, para realizar las curvas analíticas, disuelta en buffer de fosfato. El ensayo se basa en la formación de un complejo entre el colorante azul de Coomassie 0-250 y los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Las medidas se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro, marca VERSAMAX. Para la cuantificación se realizaron 3 diluciones 1:100, 1:150, 1:200 de la mitocondria obtenida y agua como blanco.

6.11. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXIGENO

Se usaron mitocondrias aisladas de larvas tal como se describió anteriormente, utilizando un medio de incubación compuesto por: HEPES 10mM (pH7.4), EGTA 0,1 mM, manitol 125 mM, KCL 65 mM, suplementadas con glutamato de sodio 5 mM y succinato de sodio 3 mM, fosfato 1.6 mM y ADP 0.6 mM. Se evaluó el efecto de tres concentraciones (27, 32 y 46 mg.mL^{-1}) del aceite esencial

de *T. vulgaris* sobre la cadena respiratoria mitocondrial, obtenidas a partir de las concentraciones letal 10, 20 y 50% en larvas. Para tal fin, se realizaron ensayos sobre la velocidad del consumo de oxígeno en presencia de ADP (estado 3), velocidad del consumo de oxígeno después del agotamiento del ADP (estado 4) y sobre el coeficiente de control respiratorio (CCR). Cada uno de estos parámetros fue evaluado, con dos sustratos independientes, glutamato (5 mM) y succinato (3 mM), adecuados para evaluar el transporte de electrones desde los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial.

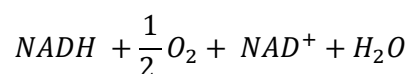
El consumo de oxígeno de las mitocondrias tratadas fue determinado polarográficamente en un oxígrafo, utilizando un electrodo tipo Clark, acoplado a un registrador, marca Hansatech. Los resultados se expresaron en nmol de O₂ consumido × min⁻¹.mg⁻¹ de proteína considerándose la solubilidad del oxígeno en agua a la temperatura usada y a 1 atm (VOSS et al. 1961).

6.12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS MITOCONDRIALES

6.12.1. Preparación de la suspensión mitocondrial para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales. Las suspensiones mitocondriales obtenidas de acuerdo al ítem 6.9, se congelaron a -70°C hasta el momento de su uso, luego fueron fragmentadas a través de ultrasonido durante 10 minutos y mantenidas en baño de hielo durante el desarrollo de los ensayos.

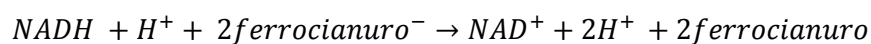
La actividad de las enzimas relacionadas con la cadena transportadora de electrones (NADH deshidrogenasa, NADH oxidasa, succinato deshidrogenasa, succinato oxidasa y NADH citocromo C reductasasa) se determinaron en un espectrofotómetro marca SHIMAZU UV-1800, utilizando el programa UV-Probe 2.33 y polarográficamente en un oxígrafo, marca Hansatech utilizando el programa oxigraph plus. El AE de *Thymus vulgaris* se evaluó a 46 mg.mL⁻¹, siendo incubado durante dos minutos con la proteína mitocondrial antes de inducir la reacción, para todas las enzimas estudiadas.

6.12.2. NADH oxidasa. La actividad de la NADH oxidasa fue determinada por el método de Singer 1974. La velocidad de oxidación del NADH se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente. El sistema de reacción se compuso por tampón fosfato 80 mmol.L⁻¹ (pH 7,4), EDTA 50 μM, NADH 0,17 mM y 1 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28°C y la reacción fue iniciada por la adición de NADH.



Esquema de reacción de NADH. (Singer 1974).

6.12.3. NADH deshidrogenasa. La actividad de la enzima fue determinada por el método espectrofotométrico de Mason et al. 1973, usando ferrocianato como receptor artificial de electrones en la presencia de rotenona, la reacción fue monitoreada a 420 nm. El sistema de reacción estuvo compuesto de tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2.0 mM, NADH 0.2mM, ferrocianato de potasio 600 mM, rotenona 1mM, NaCN 1 mM y 1mg de proteína mitocondrial. La reacción fue iniciada por la adición de ferrocianuro y se monitoreo durante 3 minutos



Esquema de reacción NADH deshidrogenasa. (Singer 1974)

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

6.12.5. Succinato oxidasa. La actividad de esta enzima se determinó con base en la velocidad de consumo de oxígeno, medida polarográficamente en un oxígrafo. El sistema de reacción se compuso por tampón fosfato 80 mM (pH 7,4), succinato 10 mM y 1 mg de proteína mitocondrial. La temperatura se mantuvo controlada a 28°C y la reacción fue iniciada por la adición de succinato (Singer 1974).

6.12.6. Succinato deshidrogenasa. La actividad de la succinato deshidrogenasa fue determinada utilizando DCPIP (2,6-dicloroindofenol) y PMS (5-metilfenazinametil sulfato) como receptores artificiales de electrones. La velocidad de reducción del DCPIP fue monitoreada a 600 nm en un sistema de reacción compuesto por tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4), succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM, NaCN 1 mM, rotenona 1 mM, PMS 1 mM y 2 mg de proteína mitocondrial. Los reactivos presentes en el sistema, excepto el PMS y el DCPIP fueron incubados por 10 minutos a 28°C, la reacción fue iniciada por la adición de DCPIP 180 µM (Toomas 1974).

6.13. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA

La inhibición de la actividad de enzima acetilcolinesterasa (AChE) se determinó utilizando el método colorimétrico de Ellman modificado por López et al (2002). El ensayo se realizó *in vivo* e *in vitro*.

6.13.1. Ensayo *In vitro*: El ensayo se realizó en micro placas de 96 pozos que contenían 100 µL de AChE (Enzima comercial) disuelta en fosfato tampón (8 mM K₂HPO₄, 2,3 mM NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6) y 50µL del AE disuelta en el mismo tampón.

Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 100 µL de la solución de sustrato formada por Na₂HPO₄ 0,1 M, ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB) 0,5 M, yoduro de acetilcolina (ACTI) 0,6 mM en agua Millipore, pH 7,5. Las absorbancias se leyeron en un lector de microplacas Labsystems® (Helsinki, Finlandia) a 405 nm después de 5 minutos.

6.13.2. Ensayo *In vivo*: El ensayo se realizó en microplacas de 96 pozos que contenían 100 µL del homogenizado de larvas disuelto en tampón fosfato (8 mM K₂HPO₄, 2,3 mM NaH₂PO₄, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6) y 50 µL del AE disuelta en el mismo tampón.

Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 100 µL de la solución de sustrato: Na₂HPO₄ 0,1 M, DTNB 0,5 M, ACTI 0,6 mM en agua Millipore, pH 7,5. Las absorbancias se leyeron en un lector de microplacas Labsystems (Helsinki, Finlandia) a 405 nm después de 5 minutos.

El porcentaje de inhibición se calculó usando la ecuación:

$$(\%)\text{Inhibición} = 100 - \left(\frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Control}} \right) * 100$$

Abs Muestra = Absorbancia de la muestra
Abs Control = Absorbancia del control

La concentración a la cual el AE proporciona una inhibición del 50% (IC₅₀) se obtuvo mediante el porcentaje de inhibición frente a la concentración del AE.

6.14. ENSAYOS SOBRE EL EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. vulgaris* EN LA DEGRADACIÓN DEL ADN

La extracción de ADN se realizó de larvas entre tercer y cuarto estadio expuestas a diferentes concentraciones del AE (27,32, 46 y 82 mg.mL⁻¹), usando el kit de extracción, UltraClean® Tissue and Cells DNA Isolation. Para observar si el AE inducía la fragmentación del ADN en las larvas expuestas, se empleó la metodología propuesta por Kumar et al. 2008, con modificaciones y se realizaron tres diseños experimentales de exposición del AE al ADN.

Ensayos:

1. Larvas expuestas a cuatro concentraciones del AE: 27, 32,46 y 82 mg.mL⁻¹, un control negativo (DMSO 0,5%) y un control positivo (Camptotecina 4µM) durante 24 horas.
2. Homogenizado de larvas expuesto a cuatro concentraciones del AE: 27, 32,46 y 82 mg.mL⁻¹ y un control positivo (Camptotecina 4µM) durante la extracción del ADN.
3. Adición directa de cuatro concentraciones del AE: 27, 32,46 y 82 mg.mL⁻¹ y un control positivo (Camptotecina 4µM) sobre el ADN extraído de larvas sin exposición al AE.

El ADN resultante se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1% (100 V) y se tomaron fotografías de cada corrida. Se usó como modelo de interpretación la **Figura 14**. Muerte generada por apoptosis: observación de fragmentación del DNA en forma de “escalera” y muerte por necrosis observación del ADN que forma de "mancha continua” se observa en forma de un extendido continuo (Gavrieli et al. 1992; Matassov et al. 2004) (**Figura 14**).

Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de ADN procedente de cultivo celular. A) Control, B) Fragmentación de ADN apoptótico (forma de escalera), C) Daño al ADN necrótico (forma un extendido continua). https://upload. Apoptotic_ADN_Laddering.png



6.15. Cribado virtual: Análisis *In Silico* de los compuestos mayoritarios Timol y *p*-cimeno

6.15.1. Cálculo de los parámetros de Lipinski. Para la obtención de los parámetros de Lipinski se utilizó el software libre: Molinspiration desarrollado por Novartis: <http://www.molinspiration.com/>.

Tabla 2. Parámetros de Lipinski que deben cumplir los compuestos mayoritarios del AE.

P.M (g/mol)	LogP	NDEH (-OH, -NH)	NAEH (O, N)	NER	PSA Å ²
≤ 500Da	LogP ≤ 5	≤ 5	H ≤ 10	≤ 10	≤ 140 Å ²

Peso molecular (P.M), Partición octanol/agua (LogP), número de dadores de enlaces de hidrogeno (NDEH), número de aceptores de enlaces de hidrógeno (NAEH), número de enlaces rotables (NER) y área superficial polar de la molécula (PSA).

6.15.2. Cálculo de los valores de solubilidad y riesgo de los componentes mayoritarios del AE contra el ser humano. Estos valores se calcularon usando el software libre del programa Osiris Property Explorer desarrollado por Actelion: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>.

Este programa utilizó una base de datos de diferentes moléculas y predijo los fragmentos de aquellas que presentaban riesgo biológico se calculó los parámetros de Lipinski y la solubilidad del compuesto, dando un valor de afinidad para ser fármaco (druglikeness y drug-score), este valor fue calculado por el software tomando las contribuciones de las propiedades individuales (cLogP, P.M, PSA, solubilidad y riesgos de toxicidad). Para la clasificación de riesgo, se utilizó un código de colores establecido en el programa: rojo para riesgo alto, naranja para riesgo medio y verde para riesgo bajo.

6.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados utilizando Statistica v11. Los datos con $p < 0,05$ se consideraron significativos. Todos los datos se tabularon y se sometieron a una prueba de normalidad. Cuando eran normales, se realizó el análisis de varianza (ANOVA). Si la distribución no fue normal, se realizaron pruebas no paramétricas.

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los procedimientos de laboratorio de esta propuesta de investigación, se llevaron a cabo de acuerdo a lo establecido en el artículo 11 de la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, en la cual se calificó como una investigación de riesgo mínimo. Basados en la última actualización del libro “Principles of biomedical ethics” de Beauchamp & Childress (2009), se analizaron los 4 principios éticos en lo referente a este estudio.

1. **Autonomía:** para cumplir con este principio, las personas voluntarias que accedieron a los ensayos de actividad repelente fueron tratadas como *agentes autónomos*. Por tal motivo y teniendo en cuenta el respeto a las personas manejamos un “*consentimiento informado*” de manera que los participantes podían considerar participar o no en el ensayo, minimizando la posibilidad de coerción o influencia indebida. Se les indicó a los participantes que inscribirse en la investigación era un acto voluntario y que podían retirarse del ensayo en cualquier momento, sin penalidad ni pérdida de beneficios.
2. **Beneficencia / No maleficencia:** el presente trabajo de investigación presentó un grado de riesgo mínimo y dentro de los posibles riesgos que podían enfrentar los participantes en la investigaciones fue :

Riesgo Físico: picazón generada por la alimentación del mosquito en el caso en que el aceite no presentara actividad repelente. Presencia de enrojecimiento de la piel y posible alergia. Luego de terminada la prueba los voluntarios recibían limpieza con alcohol al 70% en el área expuesta (4 cm²) y se le aplicó tópicamente loción de **caladryl®** en el área.

3. **Justicia:** en el proyecto de investigación tratamos a los voluntarios de forma justa e imparcial en base a los riesgos y potenciales beneficios asociados con la investigación.

El manejo de los animales como es el caso, de las ratas tipo Wistar WI IOP AF/Ham facilitadas por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander para alimentar la colonia de *Stegomyia aegypti*, cumplió con lo establecido en la Ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

7. RESULTADOS

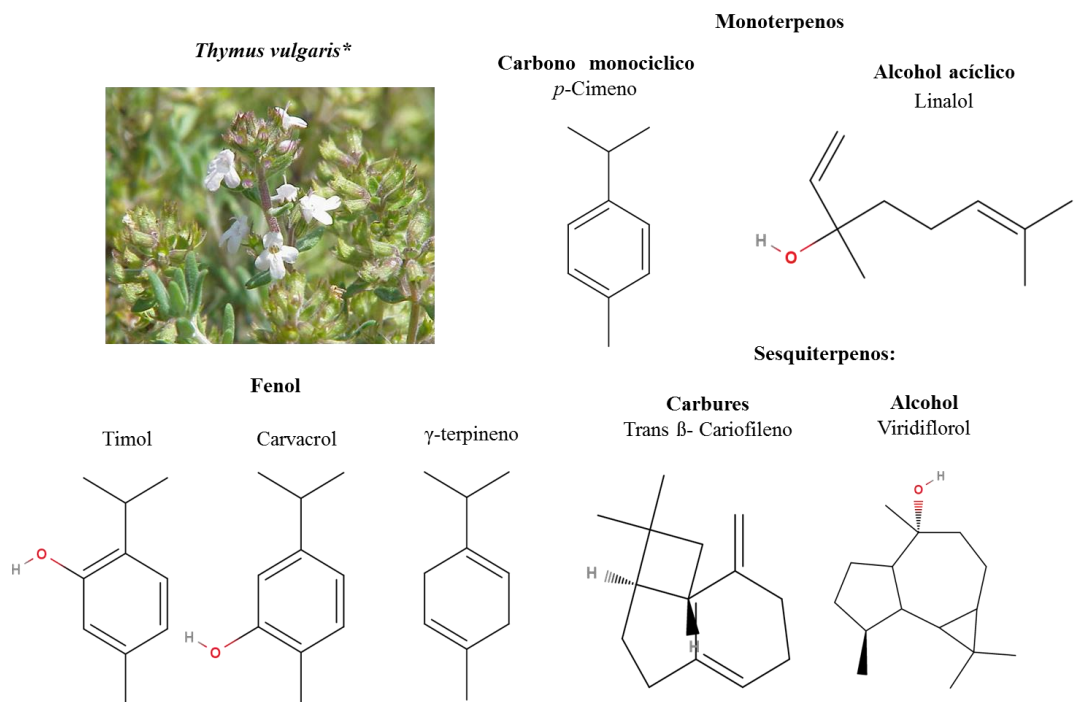
7.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL

En el perfil químico de los extractos del aceite esencial *T. vulgaris*, utilizando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), se identificaron 7 compuestos (**Tabla 3**). Las estructuras químicas de los compuestos se observan en la **Figura 15**. El timol fue el compuesto mayoritario representando el 42% del total de compuestos presentes en el aceite esencial y el compuesto carvacrol fue el menos abundante representando el 2.0%.

Tabla 3. Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris*. Los datos provistos por el CENIVAM.

Compuestos químicos del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	Porcentaje (%)
<i>p</i> -cimeno	26.4
Linalol	2.9
timol	42.0
carvacrol	2.0
γ -terpineno	6.3
trans- β -cariofileno	2.6
Viridiflorol	8.1

Figura 15. Estructuras químicas de los componentes del aceite esencial de *T. vulgaris*. *Planta de *Thymus vulgaris*. (Autor).

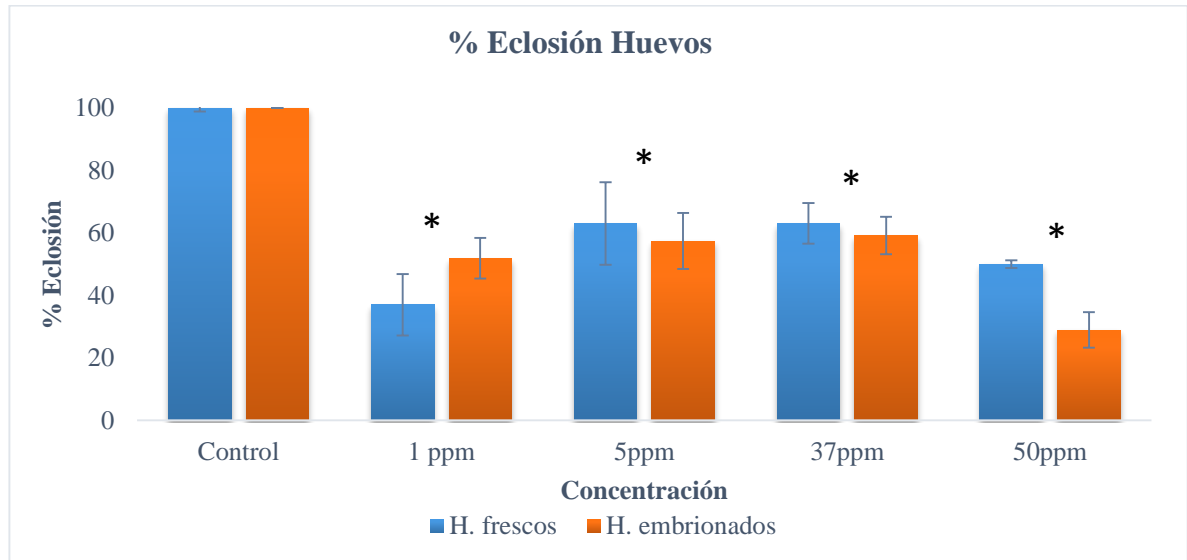


7.2. ACTIVIDAD OVICIDA DEL ACEITE ESENCIAL

El aceite esencial de *T. vulgaris* presentó actividad ovicida en todas las concentraciones evaluadas, inhibiendo el porcentaje de eclosión huevos frescos a las concentraciones de 1, 5, 37 y 50 mg.mL⁻¹ en 63%±1,2, 36%±9,8, 38%±7,3, 50%±1,2, respectivamente.

En huevos embrionados a las mismas concentraciones en 12%±4,1, 42%±9,0, 41%±7,9 y en 50%±5,7 respectivamente, se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las concentraciones con el porcentaje de eclosión tanto en huevos frescos como en huevos embrionados ($p < 0.05$). También se observó una correlación inversa en la exposición de los huevos al AE, al aumentar la concentración se generó una disminución en el porcentaje de eclosión tanto en huevos frescos como en embrionados ($r = -0.617$). En general la inhibición en el porcentaje de eclosión fue más alta en huevos frescos (**Figura 16**).

Figura 16. Porcentaje de eclosión de huevos frescos y embrionados cuando son estimulados a eclosionar en agua libre de cloro y diferentes concentraciones del AE de *T. vulgaris*. Huevos frescos de aproximadamente 4 horas después de la postura. Huevos embrionados de máximo 120 horas. * Diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y el control ($P < 0,05$); prueba de Kruskal-Wallis: $H(4, N = 24) = 15.03955$ $p < 0.003$



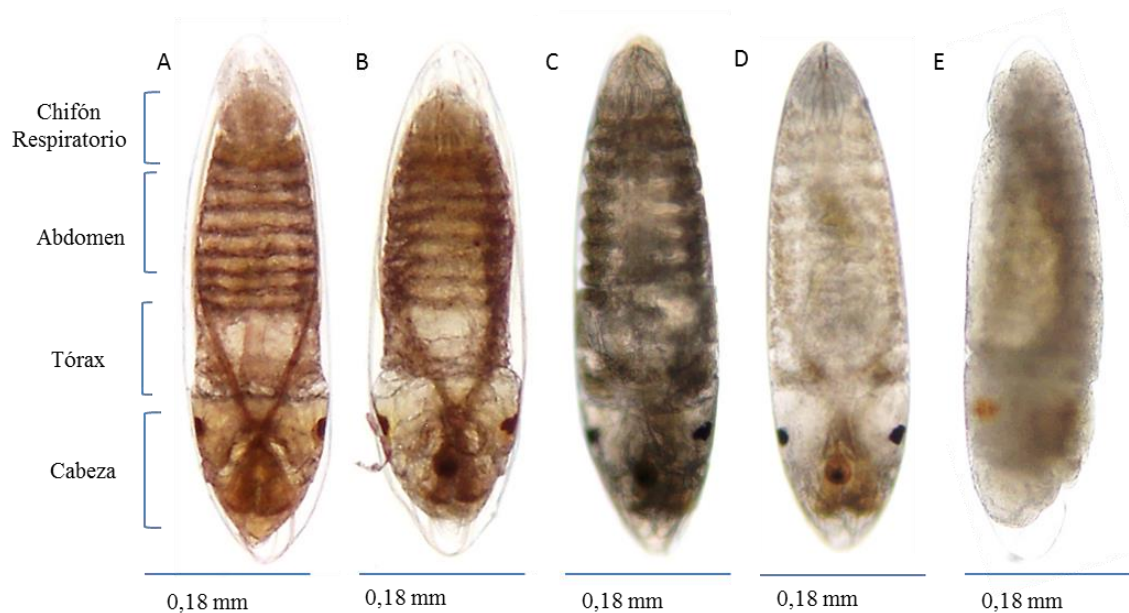
7.3. EFECTO DEL AE SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

El porcentaje de eclosión se determinó hasta 144 horas después de la oviposición (HDO). De esta manera se garantizó que los huevos tuvieran un tiempo razonable para completar el desarrollo embrionario (Rezende et al. 2008b; Farnesi. 2009; Santos et al. 2012). Las alteraciones encontradas en los embriones después de 144 HDO se observan en la **Figura 17**.

En la **Figura 17 (A)** se muestra un embrión control de 96 horas de edad con desarrollo embrionario completo, donde se pueden apreciar todas las características de una larva lista para eclosionar, la cabeza diferenciada, tres segmentos torácicos fusionados, ocho segmentos abdominales y sifón respiratorio con estructuras asociadas (Clements 1992). En la **Figura 17 (B)** se observa un embrión ovipositado a la concentración de 1 mg.mL^{-1} , en el cual no se observan diferentes caracteres morfológicos externos al compararlo con el control. En la **Figura 17 (C)** se puede ver un embrión expuesto a una concentración de 5 mg.mL^{-1} , en donde hay una separación evidente de la cabeza y los

segmentos torácicos. En la **Figura 17 (D)** se muestra un embrión ovipositado después de ser expuesto a una concentración de 37 mg.mL^{-1} el cual carece de segmentación torácica y abdominal. En la **Figura 17 (E)** se observa un embrión expuesto a la concentración de 50 mg.mL^{-1} , el cual es semejante a un embrión que se encuentra en las primeras etapas de desarrollo, sin la formación y el desarrollo de la ranura cefálica, segmentación torácica y abdominal. Lo anterior muestra que el aumento de la concentración del AE genera un retraso en el desarrollo embriológico de *S. aegypti*.

Figura 17. Embriones de huevos de *S. aegypti* expuestos a diferentes concentraciones del AE de *T. vulgaris* que no eclosionaron después de incubación durante 144 horas. (A) Huevo embrionado en agua destilada (control). (B-E) Huevos embrionados. (B) 1 mg.mL^{-1} . (C) 5 mg.mL^{-1} . (D) 37 mg.mL^{-1} . (E) 50 mg.mL^{-1} .



7.4. ACTIVIDAD LARVICIDA

Las cinco concentraciones empleadas en la evaluación de la actividad larvicida del AE registraron valores de mortalidad altos, alcanzando un 75% a las 24 horas a 58 mg.mL^{-1} , mientras que a las 48 horas a esta misma concentración se observó un 80% de mortalidad. Los valores del porcentaje de mortalidad que se obtuvieron para 24 y 48 horas de exposición se encuentran registrados en la **Tabla 4**. También se observa un aumento, en la actividad larvicida del aceite esencial, cuando se aumenta la concentración y el tiempo de exposición.

Tabla 4. Porcentaje de mortalidad de larvas *S. aegypti* expuesta al AE de *Thymus vulgaris* durante 24 y 48 horas de exposición.

Aceite esencial	Concentración (mg·mL ⁻¹)	Porcentaje de mortalidad *	
		24h	48h
<i>T. vulgaris</i>	0	0 ^a	0 ^a
	12	6±0.75 ^a	7±1.1 ^a
	20	8±0.75 ^a	8±1.1 ^a
	30	16±1.4 ^a	17±1.3 ^a
	45	37±2.5 ^a	43±3.2 ^a
	58	75±2.3 ^b	80±2.9 ^c

*La tasa de mortalidad de las réplicas de cada concentración evaluada. Los valores con letra diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas en comparación con el control (P <0,05); b: prueba de Kruskal-Wallis, H (5 N = 19) = 16,23713 p <0.0062; c: prueba de Kruskal-Wallis, H (5, N = 19) = 15,28568 p <0.0092.

Los rangos de los valores de las concentraciones letales al 50% y 95% con sus límites de confianza se muestran en la **Tabla 5**. Los resultados obtenidos de la CL₅₀ y CL₉₅ = 46 y 52 a 24 horas fueron y para 48 horas CL₅₀ y CL₉₅ = 95 y 148 mg·mL⁻¹.

Tabla 5. Actividad larvicida en mg·mL⁻¹ del AE de *T. vulgaris* contra larvas de *S. aegypti*

Aceite esencial (AE)	24 h			48 h		
	CL ₅₀	CL ₉₅	χ ²	CL ₅₀	CL ₉₅	χ ²
<i>T. vulgaris</i>	58.3 (44.40-67.72)	87.6(73.3-114.24)	2.5	51.6(45.1-55.03)	148(102.6- 295.6)	1,07

LC₅₀ es la concentración letal que causa la mortalidad al 50% de las larvas expuestas al tratamiento. LC₉₅ es la concentración letal que causa mortalidad al 95% de las larvas expuestas a tratamiento. El intervalo de confianza se da entre paréntesis. El análisis estadístico fue ajustado al modelo probit (Finney 1971). χ² chi-cuadrado.

7.5. ACTIVIDAD PUPICIDA

El aceite esencial de *T. vulgaris* presentó actividad pupicida. Se observó que el AE presenta un efecto tóxico sobre las pupas en todas las concentraciones evaluadas, con valores de 22 ± 3.3 y $42\pm 5.4\%$ para $250 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 35 ± 4.6 y $53\pm 5.4 \%$ para $310 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 63 ± 4.7 y $72\pm 4.2\%$ a $390 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 24 y 48 horas de exposición, respectivamente. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de $390 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 24 y 48 horas.

El AE generó un efecto similar que aquel observado con las larvas, el porcentaje de mortalidad de pupas aumentó al aumentar la concentración de AE y el tiempo de exposición. La **Tabla 6** contiene los resultados del porcentaje de mortalidad en pupas expuestas al AE durante 24 y 48 horas.

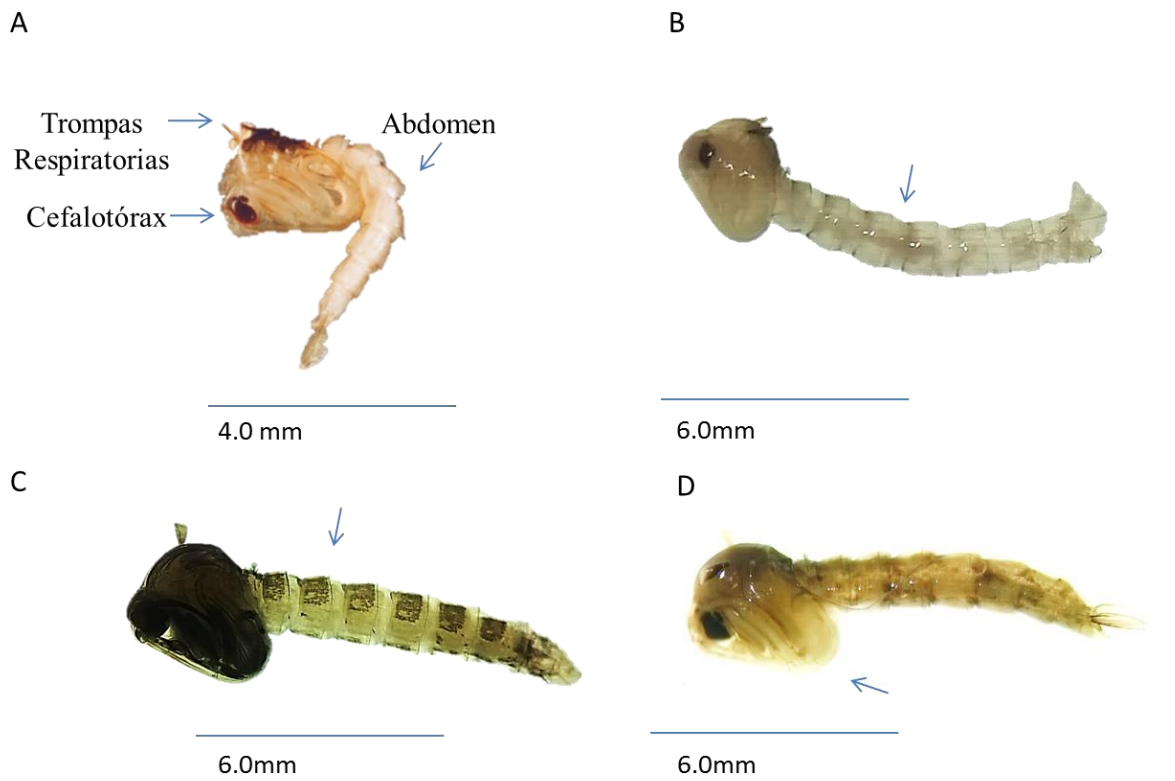
Las pupas muertas a causa de la exposición al AE presentaron varios cambios morfológicos (**Figura 18**). Fue observada una forma extendida, en algunos casos se observó una mielinización incompleta o endurecimiento de la cutícula y un cefalotórax aumentado. Estos cambios morfológicos son muy similares a los observados en pupas expuestas al methopreno y otros compuestos análogos de la hormona juvenil (Ratanatham et al. 1994; Abdelouaheb 2009; Pérez et al. 2011; Ono 2014; Areiza et al. 2014), lo cual sugiere que el AE de *T. vulgaris* tiene un modo de acción similar a estos compuestos.

Tabla 6. Porcentaje de mortalidad en pupas sometidas a tres concentraciones del AE de *T. vulgaris* ($250, 310$ y $390 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Aceite esencial	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Porcentaje de mortalidad* ($\% \pm \text{DS}$)	
		24h	48h
	0	0	0
<i>T. vulgaris</i>	250	22 ± 3.3^a	42 ± 5.4^a
	310	35 ± 4.6^a	53.3 ± 5.4^a
	390	63 ± 4.7^b	72 ± 4.2^c

*Tasa de mortalidad y desviación estándar de las réplicas de cada concentración evaluada. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas en comparación con el control ($P < 0,05$); b: prueba de Kruskal-Wallis: $H(5, N = 12) = 8.970238$ $p < 0.0262$; c: prueba de Kruskal-Wallis: $H(5, N = 12) = 7.425000$ $p \leq 0.0395$.

Figura 18. Cambios morfológicos inducidos por el AE en pupas de *S. aegypti*. A. Pupa normal. Vista lateral, presencia de estructuras adultas visibles dentro de la cutícula de pupa; B. Pupa muerta en forma extendida (flecha azul en abdomen); C. Pupa muerta mielinizada (flecha azul en abdomen); D. Pupa muerta, mielinizada, cefalotórax aumentado (flecha azul).



7.6. ACTIVIDAD ADULTICIDA

El AE presenta alta actividad contra los adultos de *S. aegypti* en todas las concentraciones evaluadas (30, 300 y 1000 mg·mL⁻¹), mostrando un 100% de mortalidad después de 24 horas de exposición. Los resultados obtenidos en la concentración de 30 y 1000 mg·mL⁻¹ fueron estadísticamente significativo comparados con el tiempo de exposición, diferente de los resultados obtenidos para la concentración de 300 mg·mL⁻¹ la cual solo fue estadísticamente significativo entre los 120 minutos y 24 horas de exposición (**Tabla 7**).

Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de adultos de *S. aegypti* después de la exposición a 30, 300 y 1000 mg-mL⁻¹ del AE durante 2, 60, 120 minutos y 24 horas.

Aceite esencial	Concentración (mg-mL ⁻¹)	Porcentaje de mortalidad *			
		0-2 min	60 min	120 min	24 h
	Control	0	0	0	0
<i>T. vulgaris</i>	30	0±0 ^a	80±4.0 ^b	82.5±3.5 ^c	100±0.0 ^d
	300	0±0 ^a	60±4.8 ^b	72.5±3.2 ^e	97.5±0.5 ^f
	1000	18±3.5 ^a	92.5±1.5 ^g	92.5±1.5 ^h	100±0.0 ⁱ

*Tasa de mortalidad y la desviación estándar de las réplicas de cada concentración evaluada. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas en relación con el control (P <0,05); b, c, d : prueba de Kruskal-Wallis: H (3 N = 16) = 10,50000 p <,0148; e, f: prueba de Kruskal-Wallis: H (3, N = 16) = 9,011194 p <=,0291; h,i: prueba de Kruskal-Wallis: H (3, N = 16) = 10,85059 p <=,0126; 10,85059 p =,0126

7.7. ACTIVIDAD REPELENTE

El aceite de *T. vulgaris* presentó efecto repelente a un tiempo máximo de 15 minutos, tiempo durante el cual mostró un 37%±3.5 de protección a la picadura de *S. aegypti*. Estos resultados fueron estadísticamente significativos al compararlos con el control. El porcentaje de repelencia que ejerce el AE de *T. vulgaris* en humanos a una concentración de 1000 mg-mL⁻¹ se encuentra reportado en la **Tabla 8**. Adicionalmente, no se observó irritación o enrojecimiento en la piel de los voluntarios que estuvo expuesta al AE durante y después del ensayo.

Tabla 8. Porcentaje de repelencia de AE de *T. vulgaris* en humanos.

Aceite esencial	Concentración (mg-mL ⁻¹)	Porcentaje de repelencia Aceite esencial * (%±DS)		
		Control	0-2 min	2-15min
<i>T. vulgaris</i>	1000	0±0.0 ^a	100 ±1.7 ^a	37±3.5 ^b

* El porcentaje de repelencia y la desviación estándar (DS) de las réplicas de la concentración evaluada durante 15 minutos, b: prueba de Kruskal-Wallis: H (1 N = 6) = 4.354839 p<=0.0369.

7.8. ACTIVIDAD DETERRENTE DURANTE LA OVIPOSICIÓN DE *S. aegypti*

El AE de *T. vulgaris* se caracterizó por presentar alto efecto deterrente durante la oviposición, a bajas concentraciones. A concentración de 5 mg-mL⁻¹ presentó 78.4%±9 de repelencia y a 200 mg-mL⁻¹ presentó 95.1%±6.9. De manera similar se encontró que para todas las concentraciones evaluadas el índice de la actividad de oviposición (IAO) fueron valores negativos, con rangos desde -0,672 a -0,880, valores que comprueban según los criterios de Kramer y Mulla (1979), que el AE de *T. vulgaris* debe ser considerado como un AE con propiedades disuasivas durante la oviposición (**Tabla 9**).

Tabla 9. Actividad atrayente y/o deterrente de oviposición del aceite esencial de *T. vulgaris* contra *S. aegypti*.

Aceite esencial	Nº Total de Huevos	Concentración (mg-mL ⁻¹)	% R	OAI
	769	0	0±0.0	0
<i>T. vulgaris</i>	151	5	78.4±9.5	-0.672
	159	50	84.0±22.5	-0.657
	49	200	95.1±6.9	-0.880

Valores medios ± DS (desviación estándar), %R: porcentaje de repelencia, OAI: índice de actividad de oviposición.

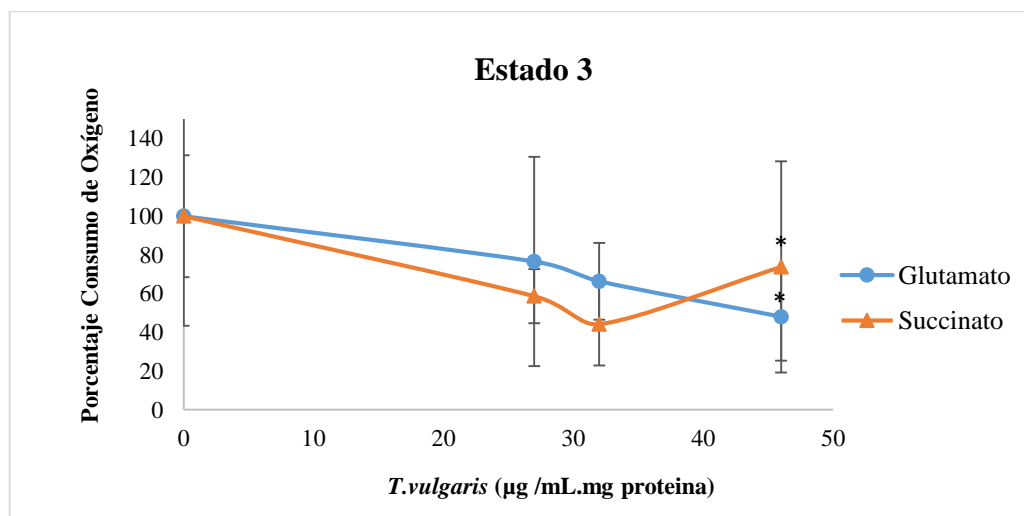
7.9. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. vulgaris* EN LA RESPIRACIÓN

MITOCONDRIAL

7.9.1. Análisis del control respiratorio/ consumo de oxígeno. Las tres concentraciones empleadas del aceite esencial de *T. vulgaris* (26, 32 y 46 mg·mL⁻¹) disminuyeron la velocidad del consumo de oxígeno en presencia de ADP (Estado 3) tanto en mitocondrias energizadas con glutamato como con succinato; para glutamato se reportaron valores de inhibición a 26 mg·mL⁻¹ = 77% ± 54, 32 mg·mL⁻¹ = 66%±20 y 46 mg·mL⁻¹ = 48±23 y para succinato 59%±16, 44%±18, 74 % 31, respectivamente, estos resultados fueron estadísticamente significativos para la concentración mayor (46 mg·mL⁻¹) en los dos sustratos (p<0.05).

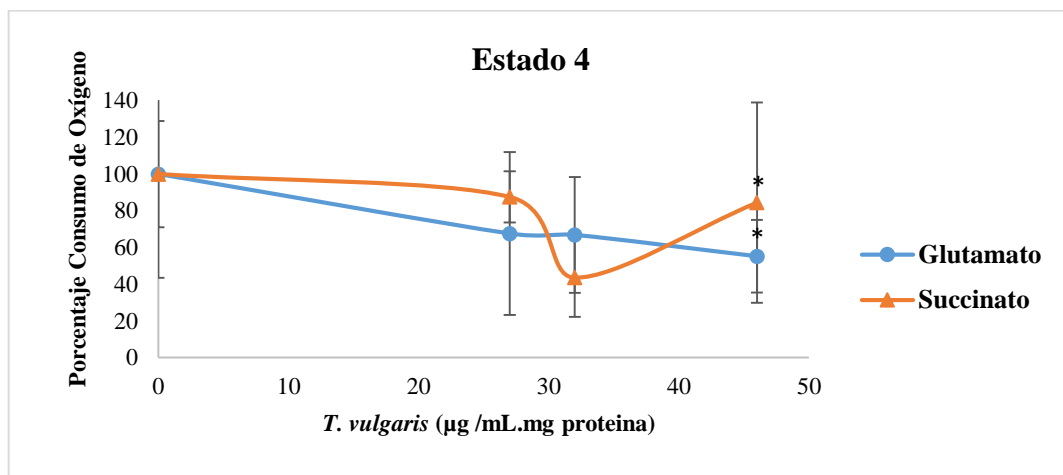
En general se observa una disminución de la velocidad del consumo de oxígeno en el estado 3 mayor para el succinato (52%) que para glutamato (26%), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (**Figura 19**).

Figura 19. Efecto del AE de *T. vulgaris* sobre la velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP en el estado 3. Glutamato (línea azul) y succinato (línea roja). * Diferencias significativas en comparación con el control para cada uno de los sustratos(p<0.05). Prueba de Kruskal-Wallis: H (3 N = 36) = 8,458859 p<=0,0374



El estado 4, después del agotamiento del ADP, se evaluó usando las mismas concentraciones del AE mencionadas anteriormente. Se observó disminución sobre la velocidad del consumo de oxígeno en los sustratos glutamato y succinato, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a partir de la concentración de $46 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pero al realizar la comparación entre los dos sustratos a esta concentración, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, esto debido a que los datos mostraron una gran dispersión aumentando la desviación estándar. Sin embargo, se observa una tendencia a la disminución en la velocidad del consumo de oxígeno en la concentración de $32 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (33 y 56%) para ambos sustratos principalmente con succinato (**Figura 20**).

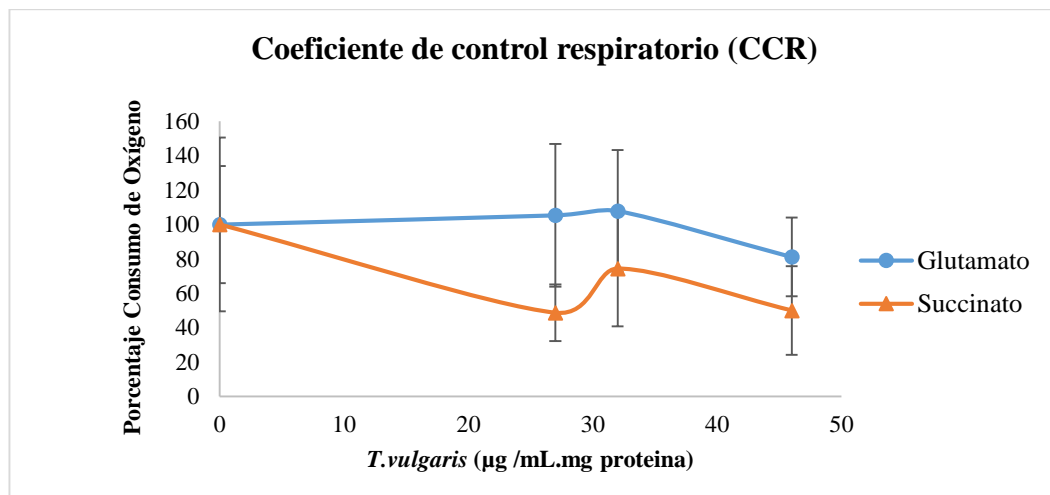
Figura 20. Efecto del AE de *T. vulgaris* sobre la velocidad de consumo de oxígeno en ausencia de ADP (estado 4). Dos sustratos diferentes: glutamato (línea azul) y succinato (línea roja). * Diferencias significativas en comparación con el control ($p < 0.05$). Prueba de Kruskal-Wallis: $H(3, N = 36) = 9.498166$ $p < 0.0234$



En la **Figura 21**, se observa el porcentaje de inhibición del coeficiente de control respiratorio (CCR) para los dos sustratos empleados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los resultados respecto al control. Sin embargo se observa una tendencia a disminuir en el

CCR con succinato, lo que indica el AE altera el consumo de oxígeno de mitocondrias energizadas, principalmente con succinato.

Figura 21. Efecto del AE de *T. vulgaris* sobre el coeficiente de control respiratorio (CCR). No se observaron diferencias significativas en comparacion con el control ($p < 0.05$). Prueba de Kruskal-Wallis: $H(3 N = 36) = 2,732529$ $p < 0,4347$



7.9.2. Efecto del aceite esencial de *T. vulgaris* sobre las enzimas de la cadena respiratoria

7.9.2.1 NADH oxidasa. La adición del AE a una concentración de $46 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, provocó una inhibición de la actividad del 9% en el complejo I, esta diferencia de porcentaje fue estadísticamente significativa respecto al control ($p > 0.05$). Prueba de Kruskal-Wallis: $H(6 N = 36) = 2,732529$ $p < 0,003948$ (**Figura 22**).

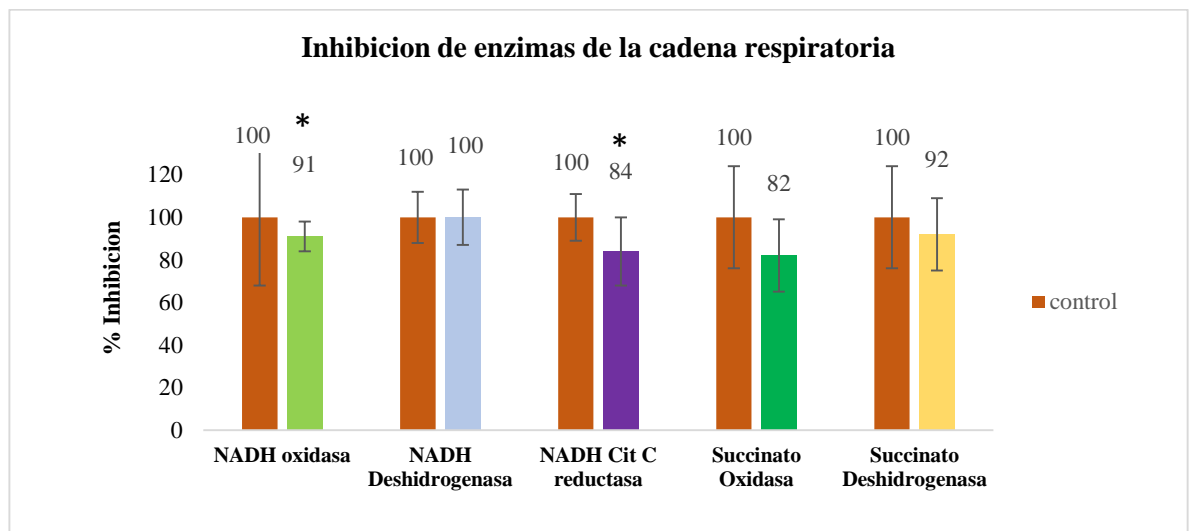
7.9.2.2. NADH deshidrogenasa. Al adicionar el AE en una concentración de $46 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, no se observó ningún efecto inhibitor o activador de esta enzima y no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los resultados con el control ($p > 0.05$). De la **Figura 22**, se puede inferir que el AE de *T. vulgaris* no afecta el complejo I de la cadena respiratoria, lo que implica que la inhibición observada en los resultados de la enzima NADH oxidasa, se debe a inhibiciones en el transporte de electrones a nivel de la ubiquinona, complejo III o IV.

7.9.2.3 NADH Citocromo C reductasa. En los resultados se observó una disminución del 10% de la enzima con respecto al control, valor que fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) Prueba de Kruskal-Wallis: $H(6 N = 36) = 2,732529$ $p < 0,003948$, de lo cual se puede inferir que el AE de *T. vulgaris*, inhibe complejo III (**Figura 22**).

7.9.2.4. Succinato oxidasa. El AE de *T. vulgaris*, generó una inhibición de la enzimas del 18%. Esta inhibición de la enzima no fue estadísticamente significativa respecto al control ($p > 0.05$), esto debido a que los datos mostraron una gran dispersión aumentando la desviación estándar (**Figura 22**).

7.9.2.5. Succinato Deshidrogenasa. El AE de *T. vulgaris* genero una inhibición de la enzimas del 8%. Esta inhibición no fue estadísticamente significativa con respecto al control ($p > 0.05$) (**Figura 22**). Con estos resultados se concluye que el AE no afecta el complejo II de la cadena respiratoria.

Figura 22. Efecto del aceite esencial del *T. vulgaris* sobre las enzimas de la cadena respiratoria. NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa, NADH citocromo C reductasa, succinato oxidasa, succinato deshidrogenasa. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar. * Estadísticamente diferentes del control ($p < 0.05$).

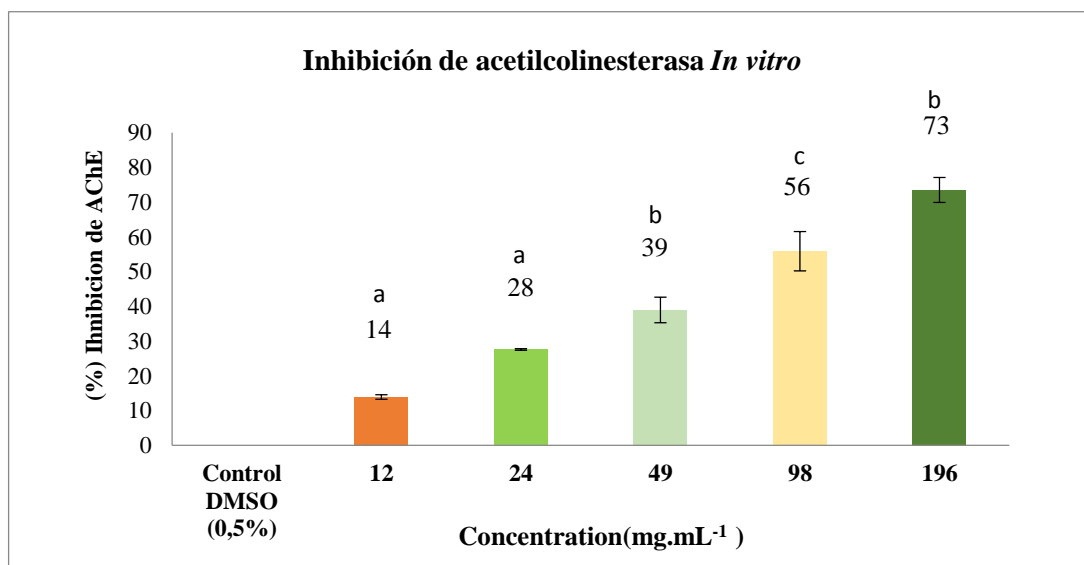


7.10. EFECTO DE *T. vulgaris* EN LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ACETILCOLINESTERASA

Acorde a los resultados, el aceite esencial de *Thymus vulgaris* presenta actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en los ensayos *In vivo* e *In vitro*.

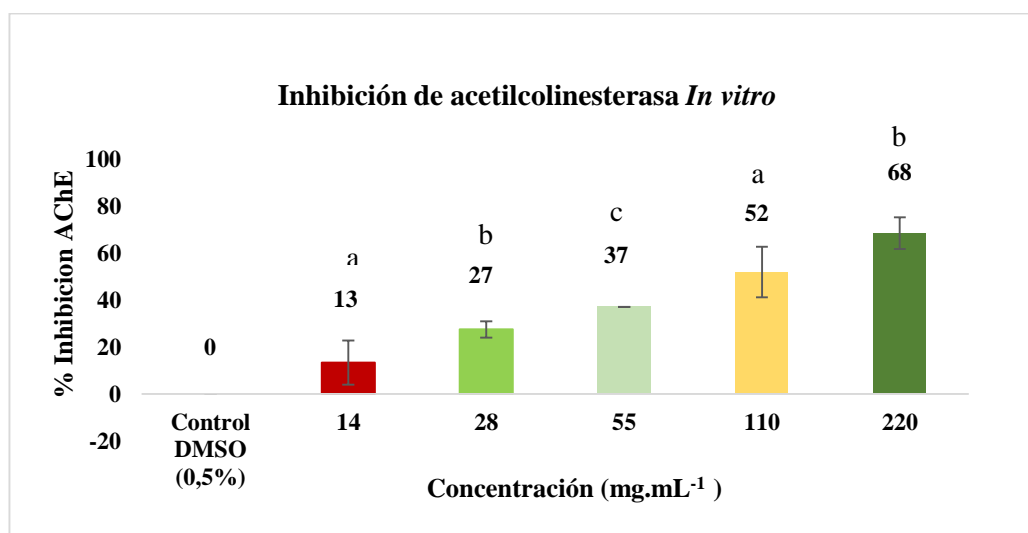
7.10.1. Resultados de ensayo *In vitro*. El aceite esencial generó inhibición enzimática sobre la enzima acetilcolinesterasa para las cinco concentraciones evaluadas: 12, 24, 49, 98 y 196 mg·mL⁻¹. Al aumentar la concentración del AE se observó un aumento en la inhibición de la enzima, inhibiendo: 14% ±0,7 a 12 mg·mL⁻¹, 28 % ± 0,2 a 24mg·mL⁻¹, 39 % ± 3,7 a 49 mg·mL⁻¹, 56 % ± 5,7 a 98 mg·mL⁻¹ y de 73 % ± 3,6 a 196 mg·mL⁻¹. La concentración a la cual el AE proporciona una inhibición del 50% de la enzima acetilcolinesterasa (IC₅₀) fue de 70.61±10 mg·mL⁻¹. Estos resultados fueron estadísticamente diferente del control (**Figura 23**).

Figura 23. Efecto del AE sobre la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) comercial. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en relación al control (P <0,05); a: prueba de Kruskal-Wallis: H (1, N = 6) = 4,500000 p <0. 0339; b: prueba de Kruskal-Wallis: H (1, N = 6) = 4,354839 p <0. 0369, c: prueba de Kruskal-Wallis: H (1, N = 5) = 3,750000 p <0. 0428.



7.10.2. Resultados de inhibición enzimática *In vivo*. Los resultados obtenidos *In vivo* fueron muy similares al obtenido *In vitro*. Se observó inhibición enzimática en todas concentraciones evaluadas (**Figura 24**). Al aumentar la concentración del AE se observó un aumento en la inhibición de la enzima siendo el aumento a partir del 13 % \pm 1,3 a 14 mg.mL⁻¹, 32 % \pm 6,9 a 28 mg.mL⁻¹, 37 % \pm 0,8 a 55 mg.mL⁻¹, 37 % \pm 2,5 a 110 mg.mL⁻¹ y en un 59 % \pm 3,4 a 220 mg.mL⁻¹. Estos valores fueron estadísticamente diferentes del control. La concentración a la cual el AE proporcionó una inhibición del 50% de la enzima (IC50) fue de 167,6 \pm 8 mg.mL⁻¹

Figura 24. Efecto del AE sobre la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en larvas de *S. aegypti*. DMSO 0,5% (Control negativo). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en relación al control (P <0,05); a: prueba de Kruskal-Wallis: H (1 N = 5) = 4,3456657 p <0. 0340; b: prueba de Kruskal-Wallis: H (1, N = 6) = 4,3265359 p <0. 0353, c: prueba de Kruskal-Wallis: H (1, N = 6) = 3,3652454 p <0. 0328.



7.11. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. vulgaris* EN LA DEGRADACIÓN DEL ADN

Las corridas electroforéticas obtenidas de los tres ensayos, mostraron que el AE genera degradación del ADN en larvas expuestas durante 24 horas y sobre el homogenizado de larvas. En la **Figura 25. A)** Ensayo 1, se observa la corrida electroforética del ADN extraído de larvas que fueron expuestas durante 24 horas a cuatro concentraciones del AE. **B)** Ensayo 2, se observa la corrida electroforética

del ADN extraído del homogenizado de larvas expuestas durante 1 hora a cuatro concentraciones del AE. C) Ensayo 3, se observa la corrida electroforética de ADN extraído del larvas expuesto al AE en el momento de la electroforesis. Para los tres ensayos se usaron tres controles positivos con Camptotecina (CPT): CPT^d: camptotecina directa sobre el ADN extraído de larvas, CPT^H: camptotecina sobre el homogenizado de larvas y CPT²⁴: exposición de larvas durante 24 horas a la CPT. Los resultados de los tres ensayos muestran la corrida del ADN característico de muerte por necrosis, se observa el DNA en forma de extendido continuo.

7.12. RESULTADO DEL CRIBADO VIRTUAL DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS

DEL AE DE *T. vulgaris*

7.12.1. Parámetros de Lipinski: los resultados demuestran que timol y *p*-cimeno cumplen con los parámetros de Lipinski (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros de Lipinski obtenidos del programa Molinspiration® para cada uno de los compuestos mayoritarios.

Compuesto mayoritario	P.M (g/mol)	LogP	NDEH	NAEH	NER	PSA (Å ²)
Timol	150.22	3.34	1	1	1	20.23
<i>p</i> -cimeno	134.22	3.90	0	0	1	0.00

7.12.2. Valores de solubilidad y el riesgo de los componentes mayoritarios del AE. Con ayuda del programa Osiris property explorer, se identificó para el compuesto mayoritario timol valores altos de toxicidad con posibles efectos mutagénicos y reproductivos, a diferencia de *p*-cimeno, que expresó valores bajos de toxicidad (Tabla 11), de forma similar, no se obtuvo un valor aceptable del puntaje de fármaco (drug-score) (Tabla 12).

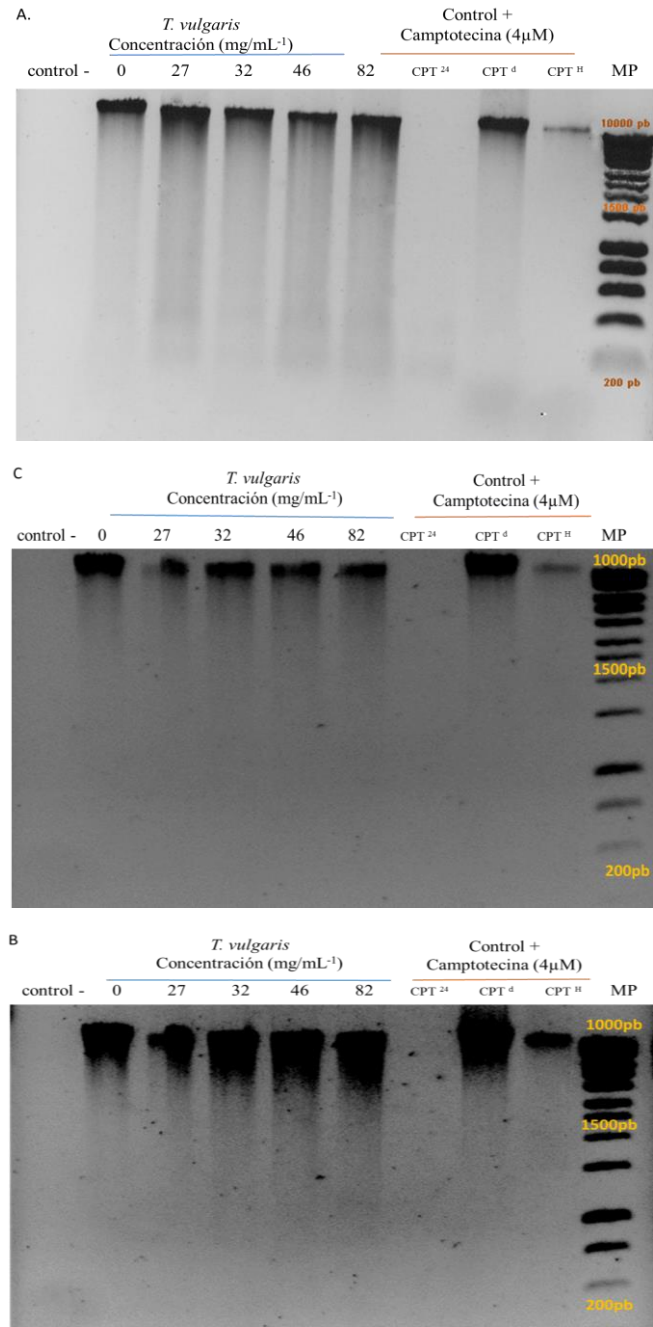
Tabla 11. Valores de toxicidad obtenidos en Osiris® property explorer.

Compuesto mayoritario	Mutagénico	Tumorogénico	Irritante	Efectos Reproductivos
Timol	Alto	Bajo	Bajo	Alto
<i>p</i> -cimeno	Bajo	Medio	Alto	Bajo

Tabla 12. Valores para la obtención de la afinidad de fármaco de Osiris® property explorer.

Compuesto mayoritario	cLogP	Solubilidad	P.M.	TPSA	Drug-likeness	Drug-score
Timol	2.84	-2.54	150.0	20.23	-3.02	0.17
<i>p</i>-cimeno	3.19	-2.83	134.0	0.0	-5.63	0.21

Figura 25. Daño en el ADN por exposición al AE de *T. vulgaris* observada en electroforesis en gel de agarosa (1%). **25.A)** Ensayo 1: ADN extraído de larvas expuestas a cuatro concentraciones del AE durante 24 h; **B)** Ensayo 2: ADN extraído de homogenizado de larvas expuestas a cuatro concentraciones del AE; **C)** Ensayo 3: efecto directo del AE sobre el ADN extraído de larvas. Control positivo: camptotecina (CPT), CPT^d: efecto directo de la CPT sobre el DNA, CPT^H: homogenizado de larvas, CPT²⁴: efecto CPT sobre larvas tratadas durante 24 horas.



8. DISCUSIÓN

Thymus vulgaris es una planta aromática miembro de la familia Lamiaceae, la cual presenta numerosas especies vegetales y variedad en su composición química. Esta diferencia de su composición química está determinada por una serie de factores agrícolas que tienen efecto directo sobre las características cuantitativas y cualitativas, entre estos se incluyen el crecimiento, genética de la planta, el clima y la interacción ambiental (Guillén et al. 1998; Sotomayor 2004; Naghdi et al. 2004).

Thompson et al (2013), informaron que la altitud en la que crece la planta debe ser considerada como un factor importante, que influye en las características fisiológicas y químicas en las especies *Thymus*. Estos autores encontraron una alta correlación entre la altitud y el rendimiento del aceite esencial en la extracción de productos químicos con acción terapéutica, alimenticia o farmacéutica.

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* es caracterizado por ser fuente natural de compuestos fenólicos, estando entre los 10 mejores AEs que presentan propiedades antisépticas, actividad antibacteriana, antimicótica y antioxidante (Letchamo et al. 1995). Las condiciones climáticas fueron favorables para obtener una extracción del AE de calidad de términos en contenidos sustanciales de monoterpenos fenólicos como el timol, lo cual se vio reflejado en los componentes principales, se caracterizaron 7 componentes químicos de los cuales el timol representó el 42% y *p*-cimeno el 26,4%, grupo químico es representativo de la familia Lamiaceae (Piccaglia et al. 1993). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Santos et al (2004), quienes identificaron el timol como el principal constituyente del AE de *T. vulgaris* (Brasil) con un 36-55% y Ghasemi et al (2013) en Iran, identificaron veinti cuatro componentes del AE, de los cuales el timol representó el 33,9-70,3%, lo anterior demuestra que el timol es el componente químico en *T. vulgaris* más representativo.

Thymus vulgaris mostró diversas propiedades contra *S. aegypti* las cuales se relacionan a continuación:

Actividad ovicida

El AE de *T. vulgaris* presentó actividad ovicida en huevos de *S. aegypti* a diferentes concentraciones del AE, estos resultados fueron comparables con estudios reportados anteriormente en donde se relacionan AEs con propiedades ovicidas sobre mosquitos de importancia médica (Tripathi et al. 2004; Elango et al. 2010; Govindarajan et al. 2011; Phasomkusolsil y Soonwera 2012; Cheah et al. 2013). También se observó retraso en el desarrollo embriológico, después de 144 horas de la oviposición a partir de concentraciones del AE entre 37 y 50 mg.mL⁻¹, demostrando la acción del AE para afectar el embrión, esto se podría atribuir a un aumento del estrés fisiológico y la capacidad de penetración del AE a través del corión (Rezende et al 2008; Vital et al. 2010).

Actividad larvicida

El AE ejerce actividad contra larvas de tercer y cuarto estadio en *S. aegypti* a bajas concentraciones del AE a 46 mg.mL⁻¹ ejerció la CL₅₀ y 52 mg.mL⁻¹ la concentración CL₉₅ después de 24 horas de exposición. De manera similar Masebo et al (2009), reportaron la actividad de *T. vulgaris* en larvas de *S. aegypti* con valores próximos de CL₅₀:34 mg.mL⁻¹ y CL₉₀:58 mg.mL⁻¹ después de 24 h de exposición; Rodríguez et al (2013), también comprobaron el efecto de *T. vulgaris* en *S. aegypti* después de 24h de exposición, observando valores de las concentraciones letales 50 y 90 próximas a aquellas obtenidas en nuestra investigación.

Otros estudios también describen la actividad del AE de *T. vulgaris* sobre el mosquito *Ochlerotatus caspius* (Diptera:Culicidae) con efecto a concentraciones de 156 mg.mL⁻¹ para obtener la CL₅₀ después de 24 horas de exposición; en este estudio es destacado el AE de *Thymus* con más potencial larvicida dentro de los AEs estudiados (Knio et al. 2008). Pavela (2009), reportó la actividad biológica de *Thymus* contra larvas de tercer y cuarto estadio de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) con CL₅₀=61 mg.mL⁻¹ después de 24 horas de exposición.

La actividad larvicida del genero *Thymus* también es observada en otras especies como lo reportado por Amer y Mehlhorn (2006a), que presentaron la actividad larvicida de *Thymus serpyllum* (Lamiaceae) contra *S. aegypti* reportando valores de CL₅₀=105 mg.mL⁻¹ después de 24 horas de exposición. En general a partir de los resultados obtenidos en esta investigación, así como la de otros

autores, se indica que el AE de *T. vulgaris* presenta acción biológica contra larvas de *S. aegypti*, como un potencial en la producción de nuevos larvicidas.

Actividad Pupicida

Debido a que actualmente no hay registro en la literatura en donde se reporte el efecto de *T. vulgaris* contra pupas de *S. aegypti*, no fue posible comparar los datos obtenidos en este estudio. Sin embargo los resultados obtenidos en las pupas expuestas al AE, sugieren que puede actuar por contacto, al ejercer efecto pupicida en *S. aegypti* en concentraciones mayores de 250 mg.mL⁻¹.

Estudios reportados contra pupas de *S. aegypti* usando otros AEs muestran que a concentraciones más bajas presentan actividad, como el efecto de *Argemone subfusiformis* L (Papaverales: Papaveraceae) y *Tagetes patula* L (Asterales: Asteraceae), que exhiben un porcentaje de mortalidad de pupas del 100% a una concentración a 160 mg.mL⁻¹ después de 24 horas de exposición (Vidal et al. 2008). Sin embargo se resalta el efecto que genera el AE de *T. vulgaris* en las pupas expuestas, presentando cambios morfológicos muy similares a los observados en pupas expuestas al metopreno y otros compuestos análogos de la hormona juvenil (Ratanatham et al. 1994; Abdelouaheb 2009; Pérez et al. 2011; Ono 2014; Areiza et al. 2014), lo cual sugiere que el AE de *T. vulgaris* tenga un modo de acción similar a estos compuestos.

Actividad adulticida

En cuanto a la actividad que ejerce el AE en adultos de *S. aegypti*, se observó el 100% de mortalidad a las 24 horas de exposición a partir de la concentración de 30 mg.mL⁻¹, este efecto se puede atribuir al componente mayoritario timol, el cual se ha reportado que actúa como un compuesto neuroactivo, al afectar el sistema nervioso del insecto, penetrando de manera eficiente la cutícula y los tejidos excitables conllevando a la muerte (Waliwitiya et al. 2009).

El efecto adulticida contra *S. aegypti* es similar a los estudios reportados contra insectos deferentes a *S. aegypti* como *Tetranychus urticae* (Prostigmata: Tetranychoidae), *Bemisia tabaco* (Homoptera: Aleyrodidae), *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) y *Sitophilus oryzae* (Coleoptera:

Curculionidae) (Isman et al. 2001; Isman 2006; Amer y Mehlhorn 2006; Knio et al. 2008; Aslan et al. 2004; Saroukolai et al.2010; Chintalchere et al. 2013).

Actividad repelente

El aceite de *T. vulgaris* generó efecto repelente en humanos, para un tiempo máximo de protección de 15 minutos, tiempo durante el cual mostró un $37\% \pm 3.5$ de protección a la picadura de *S. aegypti*. Sin embargo, el porcentaje de protección observado contra *S. aegypti* es bajo comparado con el reportado para este AE contra otros mosquitos como *Culex pipiens pallens* que fue mayor al 70 % por más de una hora (Choi et al. 2002; Park et al. 2005; Pitarokili et al. 2011). No obstante, esto no descarta el uso de *T. vulgaris* como repelente, ya que su nivel de protección podría ser mejorado a través de la mezcla con otros AEs y/o su formulación que potencialicen su acción (Barnard 1999).

Actividad deterrente durante la oviposición de *S. aegypti*

Thymus vulgaris mostró alto efecto deterrente sobre hembras de *S. aegypti* expuestas a bajas concentraciones del AE, con valores de $78.4\% \pm 9$ y $95.1\% \pm 6.9$ de repelencia a 5 y 200 mg.mL⁻¹. De igual forma, se observó que el AE presenta propiedades disuasivas. Estos resultados indican que hembras grávidas de *S. aegypti* son sensibles a la composición química del AE, los cuales al degradarse dentro del medio actúan de forma independiente o de sinérgica inhibiendo la oviposición (El-gendy et al. 2012). La actividad deterrente del AE es debida a los dos componentes mayoritarios, timol y *p*-cimeno, de los cuales existen registros del alto efecto deterrente y disuasivo en hembras de *S. aegypti* (Waliwitiya et al. 2009).

El sistema sensorial del insecto puede detectar una amplia gama de compuestos volátiles en el ambiente que le informan sobre aspectos cualitativos, como fuente de alimento, sitios de oviposición adecuados (Navarro et al. 2009), estos aspectos son fundamentales por que determinan la aptitud individual, la proliferación de la especie, la densidad de población y la dispersión en las diferentes áreas geográficas del vector (Spencer et al. 2002; Waliwitiya et al. 2009). Bajo esta perspectiva se puede indicar que el AE de *T. vulgaris* se comporta como un semioquímico altamente efectivo contra el vector, actuando sobre los sitios de oviposición.

Efecto en la respiración mitocondrial

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* cuando se expone a diferentes concentraciones en mitocondrias aisladas de larvas, genera disminución en la velocidad del consumo de oxígeno, tanto en mitocondrias energizadas con glutamato como con succinato, disminuyendo el control respiratorio (CCR).

El mecanismo por el cual se ve afectado el CCR, es por la inhibición de la enzima NADH citocromo C reductasa, que afecta directamente el paso de electrones de la cadena respiratoria en el complejo III.

Este comportamiento del AE es similar al observado en acaricidas como los metoxiacrilatos y los 2-hidroxinaptoquinonas y en insecticidas como hidramethylnon amidinohidrazona, que actúan sobre el sitio de oxidación del quinol (Q). Estos resultados sugieren que los componentes del AE, actúan como inhibidores de los sustratos del sitio Q (Hollingshaus 1987).

La inhibición del complejo III, afecta el paso de los electrones en la cadena respiratoria y esto conlleva a alteraciones en el potencial de membrana y disminución en la síntesis de ATP, lo que sugiere que el AE posiblemente también actúa como un desacoplador de la membrana mitocondrial, aumentando la permeabilidad. Iliis (2013), reportó la inhibición de la fosforilación oxidativa por compuestos como monoterpenos y sesquiterpenos, los cuales pueden desestabilizar la membrana y afectar la permeabilidad, por que actúan como compuestos hidrófobos, estos resultados son comparables con lo obtenido para el AE de *T. vulgaris* que está constituido por monoterpenos y sesquiterpenos. En general la variedad de los compuestos mayoritarios del AE, le confieren actividad inhibitoria sobre la bioenergética mitocondrial.

Efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de Acetilcolinesterasa

Otro mecanismo por el cual el AE afecta el insecto, es a través de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Experimentalmente se observó que esta enzima fue inhibida en larvas tratadas con el AE y en la enzima comercial. Estos datos se pueden comparar con lo registrado en la literatura por Watoo & Tapanee (2014), quien determinó el porcentaje de inhibición de la acetilcolinesterasa *In vitro*, para 29 aceites esenciales, reportando para el AE de *Thymus vulgaris* un porcentaje de inhibición enzimático de $35,88\% \pm 3,63$ a una concentración de 120 mg.mL^{-1} . Nuestros resultados evidenciaron porcentajes de inhibición próximos a este valor con la ventaja de ser menores las

concentraciones del AE. *In vitro*: 39% en 49 mg.mL⁻¹ e *In vivo*: 37% en 55 mg.mL⁻¹. La variabilidad observada en la actividad inhibitoria de la AChE se puede atribuir a la complejidad química del AE asociada con la interacción entre los componentes mayoritarios presentes. La posible interacción entre las diferentes proporciones de monoterpenos y sesquiterpenos podría ser importante en la determinación del potencial inhibitorio de la enzima, sin embargo se requiere más estudio.

Efecto del aceite esencial en la degradación del ADN

La mortalidad que se observó en larvas tratadas por el AE durante 24 horas se debe a muerte por necrosis, estos resultados se observan en las corridas electroforéticas en geles de agarosa que muestran daño en el ADN (Nagata et al.1998). Los resultados están estrechamente relacionados con un desequilibrio en la homeostasis mitocondrial, por la inhibición del complejo III, la posible pérdida del potencial de membrana, la depleción de la energía celular, daño en los lípidos de membrana y/o perdida de la función de bombas iónicas o canales homeostáticos por los compuestos fenólicos.

Estos resultados, tienen relación con la alteración que genera el AE en la mitocondria, como se vio anteriormente, el AE es capaz de inhibir el complejo III de la cadena respiratoria, que posiblemente genera, la disminución de la función de las bombas ATP y puede llevar a la apertura de los canales en la membrana citoplasmática o permeabilidad de la misma permitiendo la entrada de cationes que llevan al hinchamiento celular y posterior ruptura de membrana (Toro et al. 2010). Con la inhibición de los complejos de cadena respiratoria, se aumenta el estrés en la célula por la escasez de O₂, y la disminución del ATP, genera una falla energética, que es una de las causas de necrosis a nivel celular (Arpa et al. 1994; Circu 2010; Chou et al. 2013)

Cribado virtual de los compuestos mayoritarios del AE de *T. vulgaris*: Timol y *p*-cimeno.

Los compuestos mayoritarios analizados cumplen con los parámetros de Lipinski, esto significa que la actividad biológica que presentan, tiene mayor efectividad vía oral, lo que se confirma con los otros parámetros de biodisponibilidad obtenidos; NER de 1(\leq 10) y el PSA entre 0-20.0 Å² mayores o iguales a 140 Å², indicando según datos teóricos que tendrían la facilidad de transporte por absorción intestinal en el momento de uso en seres humanos. Sin embargo se observó que los compuestos

mayoritarios como el timol y *p*-cimeno al evaluarse por el programa Osiris property explorer, identificaron altos valores de toxicidad con posibles efectos mutagénicos, reproductivos e irritantes. Estos resultados apesar de ser una aproximación teorica se deben tener en cuenta al momento del uso en humanos.

Cabe resaltar que los riesgos anteriormente mencionados son un aporte teorico que resultó de la comparación con estructuras de farmacos similares, los fragmentos que le atribuyen estas características a las moléculas pueden ser modificados por síntesis química sin afectar su actividad. Los resultados obtenidos sobre la actividad de *Thymus vulgaris* contra *S. aegypti*, pueden sugerir al AE como un candidato para el control del vector, generando conocimiento para formular un método capaz de controlar y reducir las poblaciones de mosquitos en el futuro (Prajapati et al. 2005).

9. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Thymus vulgaris* presentó actividad biológica sobre los huevos, larvas pupas y adultos de *Stegomyia aegypti*.
- El aceite esencial de *Thymus vulgaris* presentó propiedades repelentes y disuasivas durante la oviposición.
- El aceite esencial de *Thymus vulgaris* generó efecto repelente en humano.
- El aceite esencial de *Thymus vulgaris* Inhibió la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en larvas de *Stegomyia aegypti* expuestas al AE.
- El aceite esencial de *Thymus vulgaris* generó inhibición del complejo III de la cadena respiratoria mitocondria, produciendo alteraciones en el potencial de membrana que podría conllevar a la disminución de síntesis de ATP.
- El aceite esencial de *Thymus vulgaris*, presentó degradación del ADN de larvas expuestas durante 24 horas al AE.
- El aceite esencial de *Thymus vulgaris* cumplió con los Parámetros de Lipinsk, pero los dos componentes mayoritarios (timol y *p*-cimeno) presentaron alto riesgo irritante, mutagénico y efectos reproductivos.

10. RECOMENDACIONES

- Se aconseja realizar ensayos experimentales de evaluación de todos los compuestos mayoritarios para comprobar la citotoxicidad.
- En pupas se debe realizar ensayos de comparación de la actividad de algunos de sus componentes, tanto individualmente como en combinaciones de dos componentes mayoritarios, para atribuir los cambios morfológicos observados en este estudio.
- Realizar formulaciones con el AE, para mejorar el porcentaje de protección a través de la mezcla con otros AEs con actividad repelente.
- Estudiar el potencial de membrana en la mitocondria, para verificar si el AE se comporta como un desacoplador.

11. PARTICIPACION EN CONFERENCIAS Y PASANTIAS

- **LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA (SOCOLEN)**

Sharon Smith Vera; Elena Stashenko; Débora Rebedechi; Thalita Bastida-Vieira; Mario Antonio Silva; Jonny Edward Duque. Efecto enzimático y bioactividad *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) en *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae). Presentado en el 41 congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN) en Cali, del 15 al 18 de julio de 2014.

Sugey Ortiz Serrano; Natalia Ríos; Sharon Smith Vera; Ruth Castillo; Jonny Edward Duque. Alteración del desarrollo de *Stegomyia aegypti* (Diptera: Culicidae) con el aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* (Poaceae). Presentado en el 41 congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN) en Cali del 15 al 18 de julio de 2014.

- **THE AMERICAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATIONAMCA (AMCA)**

Sharon Sharon Vera; Elena S. Stashenko; Jonny E. Duque. Bioactivity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L against *Stegomyia aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Attended AMCA 's81 st Annual meeting. March 29- April, 2015. New Orleans, Lousiana, USA.

- **PASANTIA DE INVESTIGACION**

Pasantía de investigación en el Laboratorio de Entomología Medica y Veterinaria, del Departamento de Zoología (Universidad Federal de Paraná). Brasil. Del 18 de Abril de 2014 al 11 de Mayo de 2014.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDELOUAHEB, A., ASSIMA, R. 2009. Larvicidal Activity of a Neem Tree Extract (*Azadirachtin*) Against Mosquito Larvae in the Republic of Algeria JJBS Jordan Journal of Biological Sciences 2.
- AFFONSO, R.V., RIBEIRO, B.H., CELSO, L.S. & SATO, A. 2009. Influence of Growth Regulators in Biomass Production and Volatile Profile of in Vitro Plantlets of *Thymus vulgaris* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57 (14): 6392–95. doi:10.1021/jf900816c.
- AL-BALUSHI, A.H., MARYAM, A., SOHAIL, M.D., SADRI, S.A., AFAF, W., QASIM, A.R., & ALABRI, A.A. 2013. Antibacterial and cytotoxic activities of thymus vulgaris leaves grown in oman 4 (11): 4253–57.
- AMER, A., MEHLHORN, H. 2006a. Larvicidal effects of various essential oils against Aedes, Anopheles, and Culex larvae (Diptera, Culicidae). Parasitol Res 99:466–472
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). 2000. Laboratory testing of non-commercial repellent formulations on the skin, ASTM-E951-94.
- ARBOLEDA, L., BUENO, L. 2013. Diseño y construcción de una trampa domiciliaria para captura y muerte del vector del dengue: *Aedes aegypti*. Disertación de pregrado en Diseño industrial. Universidad Industrial de Santander.
- AREIZA, M. M., NOUZOVA, C.A., & NORIEGA, F.G. 2014. Ecdysis Triggering Hormone Ensures Proper Timing of Juvenile Hormone Biosynthesis in Pharate Adult Mosquitoes Insect Biochemistry and Molecular Biology 54: 98–105. doi:10.1016/j.ibmb.2014.09.006.
- ARPA, J.Y., CAMPOS, M., GUTIÉRREZ-MOLINA, A., CRUZ-MARTÍNEZ, J., ARENAS, A.B., CAMINERO, .P.C., MORALES, P.B. 1994. Benign Mitochondrial Myopathy with Decreased Succinate Cytochrome C Reductase Activity. Acta Neurologica Scandinavica 90 (4): 281–84.
- ASLAN, İ., HIKMET, Ö., ÖNDER, Ç. & FIKRETTİN, Ş. 2004. Toxicity of Essential Oil Vapours to Two Greenhouse Pests, Tetranychus Urticae Koch and Bemisia Tabaci Genn. Industrial Crops and Products 19 (2): 167–73. doi:10.1016/j.indcrop.2003.09.003.

AVERBECK, D., AVERBECK, S.L., DUBERTRET, A.R. & MORLIÈRE, P. 1990. Genotoxicity of Bergapten and Bergamot Oil in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 7 (2–4): 209–29. doi:10.1016/1011-1344(90)85158-S.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D. & IDAOMAR, M. 2008. Biological Effects of Essential Oils. A Review. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2): 446–75. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.

BEAUCHAMP, T.L. & CHILDRESS, J.F. 2009. *Principles of Biomedical Ethics*. 6^a ed. New York: Orxford University Press. 2.

BELINATO, T.A., ADEMIR, J.M., PEREIRA, J.B., TAMARA, N.L.C., AFRÂNIO P.A., & VALLE, D. 2009. Effect of the Chitin Synthesis Inhibitor Triflumuron on the Development, Viability and Reproduction of *Aedes aegypti*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (1): 43–47.

BHATT, S.P., GETHING, W., OLIVER, J., BRADY, P.M., FARLOW, W., MOYE, A.L., DRAKE C.J. 2013. The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature* 496 (7446):504–7. doi:10.1038/nature12060.

BEN, A.A., COMBES, S., PREZIOSI, B.L., GONTARD, N., CHALIER, P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *J. Appl. Microbiol.* 43, 149–154.

BARNARD, D.R. 1999. Repellency of essential oils to mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 36 (5): 625–29.

BOZIN, B., NEDA, M.D., ISIDORA, S. & JOVIN, E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of *Rosemary* and *Sage* (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (19): 7879–85. doi:10.1021/jf0715323.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. p. 248-254

- BRAGA, I.A. & VALLE, D. 2007. *Aedes aegypti*: Inseticidas, Mecanismos de Ação E Resistência. *Epidemiologia E Serviços de Saúde* 16 (4): 179–293.
- BRATHWAITE, D., OLIVIA, J.L., SAN MARTÍN, R.H., MONTOYA, J., ZAMBRANO, B. & DAYAN G.H. 2012. The history of dengue outbreaks in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87 (4): 584–93. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0770.
- BROGDON, M.C. J. 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14 (2): 159-64.
- BRUNI, R., MEDICI, A., ELISA, A., FANTIN, C., MUZZOLI, M.V., DEHESA. M., ROMAGNOLI C. & SACCHETTI, G. 2004. Chemical composition and biological activities of ishpingo Essential oil, a traditional ecuadorian spice from ocotea quixos (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) Flower Calices. *Food Chemistry* 85 (3): 415–21. doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.019.
- BURT, S. 2004. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in Foods a Review. *International Journal of Food Microbiology* 94 (3): 223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- CARSON, C.F., BRIAN, J.M. & RILEY, T. 2002. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-Kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (6): 1914–20.
- CARSON, C.F., & RILEY, T.V.2003. Non-Antibiotic therapies for infectious diseases. *Communicable diseases intelligence. Quarterly Report* 27 Suppl: S143–46.
- CARVALHO, A., FONTENELE, U., MACIEL, M.V., ARAGÃO, C.A., LACERDA M.I., BRAGA, B.M. & FONTENELE, R.E. 2003. Larvicidal Activity of the Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham against *Aedes aegypti* Linn. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (4): 569–71.
- CASIDA, J.E. & GARY, Q. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual Review of Entomology* 43 (1): 1–16. doi:10.1146/annurev.ento.43.1.1.

- CASIDA, J.E., & QUISTAD, G.B. 2004 Organophosphate toxicology: safety aspects of non-acetylcholinesterase secondary targets. *Chem.Res. Toxicol.* 17, 983–998.
- CASIDA, J.E. 2009. Pest Toxicology: The primary mechanisms of pesticide action. *Chemical Research in Toxicology* 22 (4): 609–19. doi:10.1021/tx8004949.
- CELIS, C. 2007. Estudio Comparativo de la composicion y actividad biologica de los aceites esenciales.pdf. Disertación de pregrado en química. Universidad Industrial de Santander.
- CHEAH, S.X., TAY, J.W., CHAN, L.K. & JAAL, Z. 2013. Larvicidal, oviposition, and ovicidal effects of *Artemisia annua* (Asterales: Asteraceae) against *Aedes aegypti*, *Anopheles sinensis*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 112(9): 3275- 3282.
- CHINTALCHERE, J. M., LAKARE, T. & PANDIT, R.S. 2013. Bioefficacy of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Eugenia caryophyllus* against housefly, *Musca domestica* L.
- CHOI, W.S., BYEOUNG, S.P., SAE-KWANG, K. & SUNG-EUN, L. 2002. Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 18 (4): 348–51.
- CHOU, S.T., HSIN, Y.P., JAW, C.H., CHIH, C.L. & YING, S. 2013. *Achillea millefolium* L. Essential oil inhibits LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production in RAW 264.7 Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences* 14 (7): 12978–93. doi:10.3390/ijms140712978.
- CIRCU, M.L. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine* 48 (6): 749–62. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.
- CORBEL, M.S., BONNET, J.F., GROLLEAU, J.H., & LAPIED, E. 2006. Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *NeuroToxicology* 27 (4): 508–19. doi:10.1016/j.neuro.2006.01.011.
- CORRALES, A. E. & LAYA, H.O. 2012. New Perspectives on Dengue Pathogenesis. *Acta Médica Costarricense* 54 (2): 75–85.

COSENTINO, S., TUBEROSO, C.I.G., PISANO, B., SATTA, M., MASCIA, V., ARZEDI, E.P.F. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. J. Appl. Microbiol. 29, 130–135.

CROTEAU, R. 1987. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. Chemical Reviews 87 (5): 929–54. doi:10.1021/cr00081a004.

COX, S.D., MANN, C.M., MARKHAM, J.L. 2001 Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Appl. Microbiol. 91, 492–497.

CURTIS, H., SUE, B.N., SCHNEK, A. & FLORES, G. 2006. Invitación a la biología (6ªed.). Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana S. A.

DALE, H.H. 1914. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. J Pharmacol Exp Ther 6: 147-190.

DICKE, M.Y. & SABELIS, M.W. 1998. Infochemical terminology: should it be on cost- benefit analysis rather than origin of compound? Functional Ecology 2: 131:139

DINOR, O., ANNIBAL, P., BACILA, M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1961, 4, 48-51.

DORMANS, J.D., DEANS, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88, 308–316.

DOLAN, M.C., DIETRICH, G., PANELLA, A., MONTENIERI, J.A., & KARCHESY, J.J. 2007. Biocidal activity of three wood essential oils against *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae), *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae), and *Aedes aegypti*; (Diptera: Culicidae). Journal of Economic Entomology 100 (2): 622–25. doi:10.1603/0022-0493(2007)100[622:BAOTWE]2.0.CO;2.

DUA, V.K., KUMAR, A., AKHILESH, C. & KUMAR, S. 2013. Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn.(Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. Parasit Vectors 6: 30.

ELANGO, G., RAHUMAN, A.A., BAGAVAN, A., KAMARAJ, C., ZAHIR, A.A., RAJAKUMAR, G., MARIMUTHU, S. & SANTHOSHKUMAR, T. 2010. Studies on effects of indigenous plant extracts on malarial vector, *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Tropical Biomedicine* 27(2): 143-154.

EL-GENDY, N.A. & SHAALAN, E.A. 2012. Oviposition deterrent activity of some volatile oils against the filaria mosquito vector *Culex pipiens*. *Journal of Entomology* 9(6): 435-441.

EL-NEKEETY, A.A., MOHAMED, S.R., HATHOUT, A.S., HASSAN, N.S., ALY, S.E., ABDEL, W.M. A. 2011. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats, *Toxicon*, 57(7–8): 984–991.

FARNESI, L.C., ADEMIR, J.M., VALLE, D., REZENDE, G.L. 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol104 (1):124-126.

FONSECA, G.I., QUIÑONES, M.L., LENHART, A. & BROGDON, W.G. 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Management Science* 67 (4): 430–37. doi:10.1002/ps.2081.

GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S.A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 119 (3): 493–501. doi:10.1083/jcb.119.3.493

GHASEMI, P.A., MASOUD, H. & FATEMEH, T.G. 2013. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 48: 43–48. doi:10.1016/j.indcrop.2013.04.004.

GIRALDO, G.I., PÉREZ, M., MORALES, C.A. & OCAMPO, C.B. 2008. Evaluation of the triflumuron and the mixture of *Bacillus thuringiensis* plus *Bacillus sphaericus* for control of the immature stages of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Catch Basins. *Biomedica* 28 (2): 224–33.

GOVINDARAJAN, M., MATHIVANAN, T., ELUMALAI, K., KRISHNAPPA, K. & ANANDAN, A. 2011. Ovicidal and repellent activities of botanical extracts against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, and *Anopheles stephensi*. (Diptera: Culicidae). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1(1): 43-48.

GUEVARA, O.E., ARMENGOL, G., CRICKMORE, N., ORDUZ, S. 2004. Expresión de la toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis serovar. israelensis* en *Asticcacaulis excentricus*, para el control de larvas acuáticas de dípteros de la familia Culicidae. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. VI, núm. 1, pp. 24-30 Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia

GUILLEN, M.D. & MANZANOS, M.J. 1998. Study of the composition of the different parts of Spanish *Thymus vulgaris* L. plants. Food Chemistry, 63, 373–383.

GUZMÁN, G.O., BRATHWAITE, D.E., HUNSPERGER, E., KOURI, G., ROMEO M. R., RODRIGUEZ, R.P. & SAN-MARTÍN E. 2013. Dengue in the American Region. An Update. <http://blog.tropika.net/tropika/files/2011/07/dengue-by-guzman-et-al-jun2011.pdf>.

GUZMAN, M.G., HALSTEAD, S.B., BUCHY, H.A., FARRAR, J., GUBLER, D.J. HUNSPERGER, E. 2010. Dengue: A Continuing global threat. Nature Reviews Microbiology 8: S7–16. doi:10.1038/nrmicro2460.

HAJHASHEMI, V., ALIREZA, G. & BADIE, S. 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. Journal of Ethnopharmacology 89 (1): 67–71. doi:10.1016/S0378-8741(03)00234-4.

HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86, 985-990.

HENDAWY, S.F., EZZELDIN, A., AZIZ, E.E. & OMER E.A: Productivity and oil quality of *Thymus vulgaris* under organic fertilization condition, Ozean Journal of Applied Sciences, 2010; 3(2): 203.

HOLLINGSHAUS, J.G.1987. Inhibition of mitochondrial electron transport by hydramethylnon: a new amidinohydrazone insecticide. Pestic Biochem Physiol 27:61–70

- HUNT, D.A., TREACY, M.F. 1998. Pyrrole insecticide: a new class of agriculturally important insecticides functioning as uncouplers of oxidative phosphorylation. In: Ishaaya I, Degheele D. Insecticides with novel modes of action. New York: Springer. p. 138-51
- ILIS, A. 2013. Biological Activities of selected Mono and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine, Universitat Wien, pp. 1-93
- ISMAN, M.B., WAN, A.J., PASSREITER, C.M. 2001. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm. *Spodoptera Lituta*. *Fitoterapia* 72, 65–68.
- ISMAN, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 4566.
- KERR, J.F.R., WYLLIE, A., CURRIE, A. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *British Journal of Cancer* 26 (4): 239–257. doi:10.1038/bjc.1972.33. ISSN 0007-0920. PMC 2008650. PMID 4561027
- KLOWDEN, M.J. 2013. *Physiological Systems in Insects*. Academic Press.
- KNIO, K. M., USTA, S.D., ZOURNAJIAN, H. & KREYDIYYEH, S. 2008. Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. *Bioresource Technology* 99 (4): 763–68. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.026.
- KOOLMAN, J., & KLAUS, R. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd ed., rev. and enl. Flexibooks. Stuttgart ; New York: Thieme.
- KRAMER, L.W. & MULLA, S.M. 1979. Oviposition attractants and repellents of mosquitoes: oviposition responses of *Culex* mosquito to organic infusions. *Environ Entomol* 8: 1111-1117.
- LASANSKY, A. 1971. Nervous function at the cellular level: glia. *Annual Review of Physiology* 33 (1): 241–56. doi:10.1146/annurev.ph.33.030171.001325.

LAU, K.W., HAN, L.L., CHEE, D.C. & MOHD, S.A. 2010. Residual bioefficacy of diflubenzuron against larvae of dengue vector, *Aedes aegypti* (Linnaeus) in Kuala Lumpur, Malaysia. In 2nd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering, 311–13. http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5648876.

LAUGHLIN, C.A., MORENS, D.M., CASSETTI, M.C., COSTERO-SAINT, D.A., SAN MARTIN, J.L., WHITEHEAD, S.S. & FAUCI, A.S. 2012. Dengue research opportunities in the Americas. *Journal of Infectious Diseases* 206 (7): 1121–27. doi:10.1093/infdis/jis351.

LEE, S.J., KATUMI, U., TAKAYUKI, S. & KWANG-GEUN, L. 2005. Identification of volatile Components in Basil (*Ocimum Basilicum L.*) and Thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 91 (1): 131–37. doi:10.1016/j.foodchem.2004.05.056.

LE GOFF, G., BRENGUES, C. & VINCENT, R. 2013. *Stegomyia* mosquitoes in Mayotte, taxonomic study and description of *Stegomyia Pia* N. Sp. *Parasite* 20: 31. doi:10.1051/parasite/2013030.

LETCHAMO, W., XU, H.L., GOSSELIN, A. 1995. Variations in photosynthesis and essential oil in thyme. *J. Plant Physiol.* 147, 29–37

LEYVA, M., DOMINGO, M.J.E., TACORONTE, M.C.M. & TIOMNO, O. 2012. Essential Plant oils and insecticidal activity in *Culex quinquefasciatus*. INTECH Open Access Publisher. http://cdn.intechopen.com/pdfs/28263/InTecessential_plant_oils_and_insecticidal_activity_in_culex_quinquefasciatus.

LIPINSKI, C.A., LOMBARDO, F., DOMINY, B.W., FEENEY, P.J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), 3–26.

LÓPEZ, S., BASTIDA, J., VILADOMAT, F. & CODINA, C. 2002. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some amaryllidaceae alkaloids and narcissus extracts. *Life Sciences* 71 (21): 2521–29.

MARTÍNEZ-TORRES, E. 2008. Dengue. *Estudios Avanzados* 22 (64): 33–52. doi:10.1590/S0103-40142008000300004.

MASSEBO, F.T., MEKURIA, E. & TEFAYE, B. 2009. Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles aranoensis* patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia. African Journal of Biotechnology. 26 (5), 1345-1350

MASON, T.L., POYTON, R. & WHARTON, D.C. 1973. Cytochrome c oxidase from Bakers' Yeast. The Journal of biological chemistry, 284(4), 1346-1354.

MASSOULIÉ, J., PEZZEMENTI, L., BON, S., KREJCI, E., VALLETTE, M. 1993. Molecular and cellular biology of cholinest-erases. Prog Neurobiol 41:31-91

MEDLOCK, J.M., SNOW, K.R. & LEACH, S. 2005. Potential transmission of west Nile Virus in the British Isles: an ecological review of candidate mosquito bridge vectors. Medical and Veterinary Entomology 19 (1): 2–21.

MEINERT, R., SCHÜZ, J., KALETSCH, U., KAATSCH, P., MICHAELIS, J. 2000. Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register-based casecontrol, study in Germany. *Am J Epidemiol*; 151:639-646.

MILADI, H., RIHAB, B.S., DONIA, M., ZOUARI, S., BAKHROUF, A. & AMMAR, E. 2013. Essential oil of *Thymus vulgaris*; L. and *Rosmarinus officinalis* L: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. Natural Science 05 (06): 729–39. doi:10.4236/ns.2013.56090.

Molecular property explorer: Osiris property explorer, Thomas Sander, disponible en: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>.

Molinspiration cheminformatics, calculation of molecular properties and prediction of bioactivity, disponible en: <http://www.molinspiration.com/>.

MONCADA, S. 2010. Mitochondria as pharmacological targets: mitochondria as pharmacological targets. British Journal of pharmacology 160 (2): 217–19. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00706.x.

MATASSOV, D.1., KAGAN, T., LEBLANC, J., SIKORSKA, M., ZAKERI, Z. 2004. Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. Methods Mol Biol. 282:1-17. PMID: 15105553

- NAGATA, S., ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOYAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391 (6662): 43–50. doi:10.1038/34112
- NAGHDI, B.H., DARAB, Y., SAJED, M.A. & FATEMEH, N. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in Thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 19 (3): 231–36. doi:10.1016/j.indcrop.2003.10.005.
- NARAHASHI, T., ZHAO, X., IKEDA, T., NAGATA, K. 2007. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human & Experimental Toxicology* 26 (4): 361–66. doi:10.1177/0960327106078408.
- NAVARRO, M.A., MARQUES, A.F. & DUQUE, J.E. 2009. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of culicidae. *Revista Brasileira de Entomologia*. 53(1): 1-6.
- NISHIURA, J.T., POLLY, H. & KATHRYN, R. 2003. Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *Journal of Medical Entomology* 40 (4): 498–507. doi:10.1603/0022-2585-40.4.498.
- NOSTRO, A., ROCCARO, A.S., BISIGNANO, G., MARINO, A., CANNATELLI, M.A., PIZZIMENTI, F.C., LUIGICIONI, P., PROCOPIO, F. & BLANCO, A.R. 2007. Effects of oregano, carvacrol and *Thymol* on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Journal of Medical Microbiology* 56 (4): 519–23. doi:10.1099/jmm.0.46804-0.
- OCHOA, G. & ARRIVILLAGA, J. 2009. *Bacillus thuringiensis*: avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Boletín de Malariología y salud ambiental* 59: 181–91.
- ONO, H. 2014. Ecdysone differentially regulates metamorphic timing relative to 20-hydroxyecdysone by antagonizing juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 391 (1): 32–42. doi:10.1016/j.ydbio.2014.04.004.

PARK, B.S., WON-SIK, C., JEONG, H.K., KAP, H.O.K., & SUNG-EUN, L. 2005. Monoterpenes from *Thyme* (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. Journal of the American Mosquito Control Association. 21(1): 80–83. doi:10.2987/8756-971X(2005)21[80:MFTTVA]2.0.CO;2.

PHASOMKUSOLSIL, S., SOONWERA, M. 2011a. Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* Say. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine: S113-S118.

PHASOMKUSOLSIL, S., SOONWERA, M. 2011b. Efficacy of herbal essential oils as insecticide against *Aedes aegypti* Linn *Culex quinquefasciatus* say and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison). Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health 42(5): 1083-1092.

PHASOMKUSOLSIL, S., SOONWERA, M. 2012. The effects of herbal essential oils on the oviposition- deterrent and ovicidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Tropical Biomedicine 29(1): 138-150.

PHASOMKUSOLSIL, S., SOONWERA, M. 2013. Efficacy of thai herbal essential oils against three immature stages of *Aedes aegypti* (Linn), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Topclass Journal of Herbal Medicine 2(2): 25-35.

PRAJAPATI, V., TRIPATHI, A.K., AGGARWAL, K.K. & KHANUJA, S.P.S. 2005. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. Bioresource Technology 96(16): 1749-1757.

PAVELA, R., 2009. Larvicidal Property of Essential Oils against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). Industrial Crops and Products 30(2): 311–15. doi:10.1016/j.indcrop.2009.06.005.

PAVELA, R. 2015. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. Industrial Crops and Products 76: 174–87. doi:10.1016/j.indcrop.2015.06.050.

PÉREZ, H.M., GOODMAN, W.G., SCHAFELLNER, C., MARTINI, A., SEHNAL, F. & EIZAGUIRRE, M., 2011. Control of larva pupal adult molt in the moth *sesamia nonagrioides* by

juvenile hormone and ecdysteroids. *Journal of Insect Physiology* 57 (5): 602–7. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.01.017.

PICCAGLIA, R., MAROTTI, M., GIOVANELLI, E., DEANS, S.G. & EAGLESHAM, E. 1993. Antibacterial and antioxidant properties of mediterranean aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 2, 7–50.

PITAROKILI, D., MICHAELAKIS, A., KOLIOPOULOS, G., GIATROPOULOS, A. & TZAKOU, O. 2011. Chemical composition, larvicidal evaluation, and adult repellency of endemic greek *Thymus* essential oils against the mosquito vector of West Nile virus. *Parasitology Research* 109 (2): 425–30. doi:10.1007/s00436-011-2271-1.

QINFAN, L., LIHUI, Z., ZHI, M., XIANGYA, K., FANGFANG, W., HONG, Z. & YONGHUA, W. 2011. Probing structural features and binding Mode of 3-arylpyrimidin-2,4-diones within housefly γ -aminobutyric acid (GABA) receptor. *International Journal of Molecular Sciences* 12 (12): 6293–6311. doi:10.3390/ijms12096293.

RAMÍREZ, J.A. & LACASAÑA, M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor* 4 (2): 67–75.

RATANATHAM, S., ROJANASUNAN, W. & SUCHART, U. 1994. Morphological aberrations induced by methoprene, a juvenile hormone, in *Anopheles durus* S.S. (Diptera: Culicidae). *J. Sci.Soc.Thailand*.

RATTAN, R.S. 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* 29 (9): 913–20. doi:10.1016/j.cropro.2010.05.008.

REINERT, J.F., HARBACH, R.E. & KITCHING, I.J. 2004. Phylogeny and classification of *Aedini* (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society* 142 (3): 289–368.

REINERT, J.F., HARBACH, R.E. & KITCHING, I.J. 2009. Phylogeny and classification of tribe *Aedini* (Diptera: Culicidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 157, 700–794.

REZENDE, G.L., ADEMIR, J.M., GENTILE, C., FARNESI, L.C., PELAJO, M.M., PEIXOTO, A.A. & VALLE, D. 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Developmental Biology* 8 (1): 82. doi:10.1186/1471-213X-8-82.

RODRÍGUEZ, M.M., BISSET, J.A., HERNÁNDEZ, M., LEYVA, R.Y., PÉREZ, I.O., FUENTES, L.I. & CACERES, C.L. 2011. Impacto operacional del uso de insecticidas en larvas de *Aedes aegypti* en la Habana. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 63 (1): 81–86.

RODRIGUEZ, Y.C., MARTÍNEZ, E.F., FLORES, A.E., WAKSMAN, N.T. & SALAZAR, A.R. 2013. Larvicidal and cytotoxic activities of extracts from 11 native plants from Northeastern Mexico. *Journal of Medical Entomology* 50 (2): 310–13. doi:10.1603/ME12056.

SACCHETTI, G., MAIETTI, S., MUZZOLI, M.V., SCAGLIANTI, M., MANFREDINI, S., RADICE, M. & BRUNI, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91 (4): 621–32. doi:10.1016/j.foodchem.2004.06.031.

SADANANDANE, C., BOOPATHI, P.S. & JAMBULINGAM, P. 2012. Efficacy of three formulations of diflubenzuron, an insect growth regulator, against *Culex quinquefasciatus* say, the vector of *Bancroftian filariasis* in India. *The Indian Journal of Medical Research* 136 (5): 783.

SAMIDURAI, K., JEBANESAN, A., SARAVANAKUMAR, M., GOVINDARAJAN, I. & PUSHPANATHAN, P. 2009. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Pemphis acidula forst.* (Lythraceae) against filarial and dengue vector mosquitoes. *Acad J Entomol* 2 (2): 62–66.

SAN MARTIN, J.L., BRATHWAITE, O., ZAMBRANO, B., SOLORZANO, J.O., BOUCKENOOGHE, A., DAYAN, G.H. & GUZMAN, M.G. 2010. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82 (1): 128–35. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0346.

SANTACOLOMA, L., CHAVES, B. & BROCHERO, H.L. 2010. Susceptibility of *Aedes aegypti* to DDT, Deltamethrin, and Lambda-Cyhalothrin in Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública* 27 (1): 66–73.

SANTOS, A.C., PANSERA, M.R., PAROUL, N. & MOYNA, P. 2004. Composition of *Thymus vulgaris* L. from South Brazil.pdf. Journal of Essential Oil Research: JEOR.

SANTOS, D.L., SANTANA, M.K., NAPOLEÃO, T.E., NOVAIS, G.K., BARROSO, C., NAVARRO, M.A. & GUEDES, M.P. 2012. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of moringa oleifera lectin on *Aedes aegypti*. Edited by Immo A. Hansen. *PLoS ONE* 7 (9): e44840. doi:10.1371/journal.pone.0044840.

SAROUKOLAI, A.T., MOHARRAMIPOUR, S. & HADI, M., ESHKATALSADA, T. 2010. Insecticidal properties of *Thymus persicus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae*. Journal of Pest Science 83 (1): 3–8. doi:10.1007/s10340-009-0261-1.

SHEPARD, D.S., COUDEVILLE, L., HALASA, A., ZAMBRANO, B. & DAYAN, G.H. 2011. Economic impact of dengue illness in the Americas. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 84 (2): 200–207. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0503.

SIEGEL, G.J., AGRANOFF, B.W., MOLINOFF, P.B. 1989. Basic Neurochemistry. Raven Press Ltd., New York, USA, p 984.

SILVA, J., WORKU, S.M. SOUSA, V.G., DUARTE, M.I., MACHADO, L. & MATOS, J.A. 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. Journal of Ethnopharmacology 89 (2-3): 277–83.

SILVA, J. & MENDES, J. 2007. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. 40 (6): 612–16.

SILVA, W.J., DÓRIA, A.A., MAIA, R.T., NUNES, R.S., CARVALHO, G.A., BLANK, A. F., ALVES, P.B., MARÇAL, R. M., & CAVALCANTI, C.H. 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresource technology 99 (8): 3251–55. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.064.

SINGER, P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and alfa-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem. Anal.* 1974, 22,123-175.

SOMLO, M. 1965. Induction des lactico-cytochrome c reductases (d-et-l-) de la levure aerobie par les lactates (d-et-l-). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*, 97 (2), 183-201. doi:10.1016/0304-4165(65)90083-8

SOTOMAYOR, J.A. 2004. Estudio sobre plantas aromaticas de los géneros *Salvia* y *Thymus*, espontáneas en el Sureste Ibérico, para su establecimiento como cultivo. Doctoral Thesis. University of Murcia, Departamento de Biología Vegetal (Botánica), Murcia (Spain).

SPENCER, M., BLAUSTEIN, L. & COHEN, J.E. 2002. Oviposition habitat selection by mosquitoes and consequences for population size. *Ecology* 83(3): 669-679.

STASHENKO, E., JARAMILLO, B., MARTÍNEZ, J. 2004. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography* 1025: 93-103.

SU, T. & MULLA, M.S. 1998. Ovicidal activity of neem products (Azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14, 204–209.

TAWATSIN, A., WRATTEN, S., SCOTT, R., THAVARA, U., TECHADAMRONGSIN, Y. 2001. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *Journal of Vector Ecology* 76-82.

THAVARA, U., TAWATSIN, A., CHOMPOOSRI, J., SUWONKERD, W., CHANSAG, U., ASAVADACHANUKORN, P. 2001. Laboratory and field evaluations of the insect repellent 3535 (ethyl butylacetylaminopropionate) and Deet against mosquito vectors in Thailand. *Journal of American Mosquito Control Associated* 17: 190-195.

THOMPSON, J.A., CHARPENTIER, G., BOUGUET, F., CHARMASSON, S., ROSET, B., BUATOIS, P. & GOUYON, P. 2013. Evolution of a genetic polymorphism with climate change in a

mediterranean landscape. Proceedings of the National Academy of Sciences 110 (8): 2893–97. doi:10.1073/pnas.1215833110.

THOOMAS, P.S. 1974. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and a-glycerophosphate dehydrogenases. Methods of biochemical analysis, 22, 123-175.

TIKAR, S.N., MENDKI, M.J., CHANDEL, K., PARASHAR, B. D. & PRAKASH, S. 2008. Susceptibility of immature stages of *Aedes (Stegomyia) aegypti*; vector of dengue and chikungunya to insecticides from India. Parasitology Research 102 (5): 907–13. doi:10.1007/s00436-007-0848-5.

TRIEPELS, R.H., VAN, L.P., TRIJBELS, J.M. & SMEITINK, J.A. 2001. Respiratory chain complex I deficiency. American Journal of Medical Genetics 106 (1): 37–45. doi:10.1002/ajmg.1397.

TRIPATHI, A.K., PRAJAPATI, V., AHMAD, A., AGGARWAL, K.K. & KHANUJA, S.P. 2004. Piperitenone oxide as toxic, repellent, and reproduction retardant toward malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). Journal of Medical Entomology 41(4): 691-698.

TORO, G. J., YEPES, S. M. & PALACIOS, E. 2010. Neurología (2 ed.). Bogotá: Manual Moderno Ltda

VARGAS, H.C., FARNESI, L.C., MARTINS, R.J, VALLE, D. & LAZZARO, R.G. 2014. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. Journal of Insect Physiology 62: 54–60. doi:10.1016/j.jinsphys.2014.02.001.

VASUDEVAN, D. & VAIDYANATHA, N. 2011. Text of Biochemistry for Medical Students. <http://pdfsr.com/isbn/9786070041204>.

VEBER, D.F., JOHNSON, S.R., CHENG, H.Y., SMITH, B.R., WARD, K.W., KOPPLE, K.D. 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. Journal of medicinal chemistry, 45(12), 2615–23.

VERA, S.S., ZAMBRANO, D.F., MENDEZ-SANCHEZ, S.C., RODRIGUES, F.S., STASHENKO, E., DUQUE, J.E. 2014. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitology Research 113(7): 2647-2654

VIDAL, J., CARBAJAL, A., SISNIEGAS, M., & BOBADILLA, M. 2008. Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* ownb. y *Tagetes patula* sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. Revista Peruana de Biología 15 (2): 103–10.

VITAL, G.L., REZENDE, L., ABREU, J., LEMOS, J.A., ITABAJARA, S.V. & LOGULLO, C. 2010. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. BMC Developmental Biology 10 (1): 25.

VOSS, A.P., CAMPELLO, B.M. 1961. The respiration chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria, Biochem. Biophys. Res. Commun.p. 135-142.

WALIWIYIYA, R., KENNEDY, C.J., & LOWENBERGER, C. 2009. Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans-anethole and *Rosemary oil* to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Pest Management Science 65 (3): 241-248. (3): 241–48. doi:10.1002/ps.1675.

WATOO, P. & TAPANEE, H. 2014. Survey of acetylcoliesterase inhibitory activity in essential oil derived from aromatic plants. 65 (3): 241-248.

WHO. Guidelines for drinking-water quality, 3rd ed., incorporating first addendum. Geneva, World Health Organization. 2006 (disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html; accedido en octubre 2008).

WHO. Dengue ad dengue severe. Factsheet N° 117. Revised September 2013. Geneva, World Health Organization, 2013.

ZARI, T. 2012. Bioactivity of plant essential oils. In medicinal plants: Biodiversity and Drugs, Cpitulo 19:601–21. Taylor & Francis Group, LLC.

ANEXOS

Anexos A. Consentimiento informado



ESCUELA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

Código del participante _____

Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Thymus vulgaris* (Labiatae) frente a *Stegomyia aegypti*

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Con base en los principios establecidos en la Resolución 008430 de Octubre de 1993 por la cual se establecen las normas para la investigación en salud en Colombia, específicamente en el Artículo 15, en lo relacionado con el Consentimiento informado.

Le vamos a dar información sobre el proyecto de investigación titulado: Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Thymus vulgaris* (Labiatae) frente a *Stegomyia aegypti* y a invitarle a participar de esta investigación.

Su participación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Tanto si elige participar o no, puede leer la siguiente información. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes.

Puede que haya algunas palabras que no entienda. Por favor, me indica según le informo para darme tiempo a explicarle. Si tiene preguntas más tarde, puede preguntarme a mí, o a miembros del equipo.

El experimento que vamos a realizar, permite evidenciar el efecto repelente del aceite esencial de *Thymus vulgaris* extraído de plantas contra *Stegomyia aegypti* (Mosquito).

Durante el ensayo se expondrán los dos antebrazos del voluntario. Inicialmente se aplicara el aceite esencial de *Thymus vulgaris* y el control (Acetona) en cada uno de los antebrazos; en una región de aproximadamente 2x2 cm², se dejara secar durante dos minutos. Sucesivo a esto, se colocaran en cada uno de los antebrazos, un dispositivo que contienen 10 mosquitos (hembras) libres de patógenos. El ensayo dura 60 minutos o hasta la primera picada del mosquito en el área donde fue aplicado el aceite esencial.

Puede ocurrir que el aceite esencial tenga efectos no deseados y experimente lo siguiente:

- Reacción alérgica local a la picadura del mosquito: Puede causar eritema, formación de pápula que pica en el lugar de la picadura del mosquito.
- Reacción alérgica local por la aplicación del aceite esencial y/o acetona: Puede causar escozor, resequedad y/o eritema en el área donde se aplicó cada compuesto.

Las acciones que se tomaran en el caso de producirse alguna reacción alérgica serán: Lavar con abundante agua y jabón los antebrazos, limpiar el área con alcohol al 70%. Para aliviar el picor y para evitar el rascado, se aplicara tópicamente loción de **caladryl**® en el área afectada para evitar erosionar la piel y producir infección.

10:54 am
25/03/15

Paola J. J. J.
25/03/15



ESCUELA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

Código del participante _ _ _ _

Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Thymus vulgaris* (Labiatae) frente a *Stegomyia aegypti*

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Es posible también, que las picaduras puedan causar problemas que no conocemos o en un caso más extremo, se presente el síndrome de Skeeter, el cual se describe como una reacción de hipersensibilidad intensa con fiebre, relacionada a los alérgenos por la saliva de lo mosquito. Las acciones que se tomaran para tratar esta condición principalmente serán, el uso de antihistamínicos y la remisión al área de atención medica situada dentro de la sede Guatiguará. Sin embargo, le haremos un seguimiento y mantendremos un registro de cualquier efecto no deseado o cualquier problema

Usted tiene el derecho de hacer cualquier pregunta concerniente a los riesgos conocidos/potenciales de este estudio en cualquier momento. Si tiene alguna pregunta con respecto a sus derechos como paciente de investigación, comuníquese con el Comité de Ética en Investigación Científico de la Universidad Industrial de Santander, en horas hábiles al teléfono: 6344000 ext.3208, o enviar correo electrónico a: comitedeetica@uis.edu.co

Se solicita su autorización para que las muestras y datos obtenidos en este estudio puedan ser utilizados en otros estudios y laboratorios, con previa aprobación del Comité de Ética en Investigación Científico de la Universidad Industrial de Santander, comuníquese con el Comité de Ética en Investigación Científico de la Universidad Industrial de Santander para realizar dichos estudios.

- ¿Acepta usted participar en este estudio voluntariamente? () Si () No
- Acepta que los datos y las muestras de este estudio puedan ser utilizados en estudios posteriores, previa aprobación de un comité de ética, si se requiere?
() Si () No

La resolución 008430/93 del Ministerio de Salud Nacional exige consignar el nombre del participante, su firma o huella digital, su identificación personal. Requiere también la firma de dos testigos con su nombre, dirección y fecha de firma, y que indique su parentesco con el participante. El responsable de obtener el consentimiento informado debe firmar y consignar sus datos de identificación persona, lugar y fecha de la obtención del consentimiento.

Con fecha de _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se le aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a su participación en la investigación, usted acepta participar en la investigación titulada:

Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Thymus vulgaris* (Labiatae) frente a *Stegomyia aegypti*



ESCUELA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

Código del participante _____

Manifestaciones semioquímicas y mecanismo de acción de *Thymus vulgaris* (Labiatae)
frente a *Stegomyia aegypti*

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre de participante: _____

Firma del participante: _____

Cédula de ciudadanía: _____

Dirección: _____ Tel: _____

Nombre del testigo 1: _____

Firma del testigo 1: _____

Cédula de ciudadanía: _____

Dirección: _____ Tel: _____

Relación que guarda con el participante _____

Nombre del testigo 2: _____

Firma del testigo 2: _____

Cédula de ciudadanía: _____

Dirección: _____ Tel: _____

Relación que guarda con el participante _____

Datos del Investigador responsable del proyecto:
Doctor Jonny Edward Duque Luna
Profesor de la Universidad Industrial de Santander
Facultad de salud
Escuela de Medicina Teléfono: 6455693 Celular: 3176578399 Email: jonedulu@uis.edu.co

Firma: _____

Contacto Comité de Ética: para preguntas o aclaraciones acerca de los aspectos éticos de esta investigación puede comunicarse con el Comité de Ética para la Investigación Científica de la UIS, en horas hábiles al teléfono: 6344000 ext.3208, o enviar correo electrónico a: comitedeetica@uis.edu.co