Alteración de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa en presencia de aceites esenciales con actividad insecticida en *Aedes Aegypti*.

Nicolás Muñoz Medina

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

Jonny Edward Duque Luna

Doctor en ciencias biológicas con énfasis en entomología médica

Codirector

Diana Lizeth Urbina Duitama

Magister en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2025

Contenido

Introducción 13

1. Objetivos 15

1.1 Objetivo general 15

1.2 Objetivos específicos 15

2. Marco de referencia 16

2.1 Aedes aegypti 16

2.2 Alternativas de remplazado para los insecticidas convencionales 19

2.3 Mecanismos de acción de insecticidas 24

2.4 Enzima acetilcolinesterasa (AChE) 26

2.5 Mitocondria 27

2.5.1 Cadena respiratoria mitocondrial 28

2.5.2 Complejo I 29

2.5.3 Complejo II 30

2.5.4 Complejo III 32

2.5.5 Complejo IV 33

2.5.6 Complejo V 34

3. Metodología 35

3.1 Material Biológico 35

3.2 Homogenización de larvas y cuantificación de proteínas totales 36

3.3 Elaboración de los Aceites esenciales 36

3.4 Determinación de la actividad enzimática mitocondrial 37

3.4.1 NADH oxidasa 37

3.4.2 Succinato oxidasa..... 38

3.4.3 NADH deshidrogenasa. 38

3.4.4 Succinato deshidrogenasa. 39

3.4.5 Succinato Citocromo C reductasa..... 40

3.4.6 Citocromo C oxidasa..... 40

3.5 Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa 41

3.6 Análisis estadístico..... 42

4. Resultados..... 43

5. Discusión..... 51

6. Conclusiones..... 68

Referencias..... 70

7. Anexos 88

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1 *Ciclo de vida del mosquito Aedes aegypti* 16

Figura 2 *Comparación de los diferentes estadios de larva de Aedes Aegypti* 17

Figura 3 *Distribución mundial de Aedes aegypti* 18

Figura 4 *Insecticidas más utilizados* 20

Figura 5 *Hidrólisis de la acetilcolina (ACh) por la enzima acetilcolinesterasa (AChE)* 27

Figura 6 *Representación gráfica de la Mitocondria* 28

Figura 7 *Cadena respiratoria mitocondrial* 29

Figura 8 *Complejo I* 30

Figura 9. *Complejo II.* 31

Figura 10 *Complejo III.* 32

Figura 11 *Complejo IV* 33

Figura 12. *Complejo V* 34

Figura 13 *Flujograma de la metodología.* 35

Figura 14 *Reacción de Ellman* 42

Figura 15 *% de actividad promedio de la NADH oxidasa en presencia de aceites esenciales* ... 44

Figura 16. *% de actividad promedio de la succinato oxidasa en presencia de aceites esenciales* 45

Figura 17 *% de actividad promedio de la NADH deshidrogenasa en presencia de aceites esenciales* 46

Figura 18 *% de actividad promedio de la succinato deshidrogenasa en presencia de aceites esenciales* 47

Figura 19 *% de actividad promedio de la succinato citocromo c reductasa en presencia de aceites esenciales* 48

Figura 20 *% de actividad promedio de la citocromo c oxidasa en presencia de aceites esenciales* 49

Figura 21 *Efecto de los aceites esenciales sobre la actividad de la acetilcolinesterasa sobre larvas de Aedes aegypti* 50

Figura 22 *Efecto de Steiractinia aspera sobre la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.* 52

Figura 23 *Efecto de Turnera difussa sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.* 55

Figura 24 *Efecto de Calycolpus moritzianus sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.* 57

Figura 25 *Efecto de Piper aduncum sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.* 60

Figura 26 *Efecto de Elaphandra quinquenervis sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.* 62

Figura 27 *Efecto de Hyptis dilatata sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.* 64

Figura 28 *Efecto de Lippia origanoides sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.* 66

Lista de Ecuaciones

Pág.

Ecuación 1 *Esquema de la oxidación de NADH.* 38

Ecuación 2 *Esquema de la oxidación del succinato.* 38

Ecuación 3 *Esquema de reacción de NADH deshidrogenasa.* 39

Ecuación 4 *Esquema de reacción de succinato deshidrogenasa.* 39

Ecuación 5 *Esquema de reacción de Citocromo C reductasa.* 40

Ecuación 6 *Esquema de reacción de Citocromo C oxidasa.* 41

Anexos

Pág.

Anexo 1 *Chemical characterization of essential oils from collected plants studied in this work* 88

Resumen

Título: Alteración de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa en presencia de aceites esenciales con actividad insecticida en *Aedes Aegypti.*

Autor: Nicolás Muñoz Medina**

Palabra Clave: Aceite esencial, *Aedes Aegypti*, CTE mitocondrial.

Descripción:

Debido al considerable aumento poblacional de mosquitos *Aedes aegypti*, y, por ende, el aumento de enfermedades virales, se han intensificado las investigaciones para el control de esta plaga. Sin embargo, el desarrollo de insecticidas químicos, no han sido del todo beneficiosos, ya que desde hace varios años se ha reportado resistencia a dichos insecticidas por una mala aplicación, por lo tanto, los insecticidas derivados de productos naturales han ofrecido una alternativa interesante en el control poblacional de los mosquitos. El CINTROP, anteriormente corroboró que los siete aceites, *Steiractinia aspera*; *Turnera diffusa*; *Calycolpus moritzianus*; *Piper aduncum*; *Elaphandra quinquenervis*; *Hyptis dilatata*; *Lippia origanoides (*Quimiotipo carvacrol+*p*-cimeno) presentaron actividad insecticida, por lo que el objetivo de este proyecto fue contribuir con el posible mecanismo de acción de estas siete sustancias evaluados en la cadena transportadora de electrones mitocondrial (CTE) y la acetilcolinesterasa. Todos los aceites evaluados presentaron un porcentaje de actividad de la NADH y succinato oxidasa significativamente menor con respecto al control (actividad de la CTE en ausencia de aceites esenciales). Se midió la actividad de enzimas determinantes en el transporte de electrones, tales como la citocromo c oxidasa, la cual presentó alteraciones en presencia de los aceites *H. dilatata* y *L. origanoides*; NADH deshidrogenasa fue alterada únicamente por *H. dilatata*, succinato

deshidrogenasa exhibió una inhibición en presencia de los aceites *S. aspera* y *T. difussa*; y la enzima succinato citocromo c reductasa presentó alteraciones en presencia de los aceites *C. moritzianus*, *P. aduncum* y *E. quinquenervis*. La descripción del posible mecanismo de acción de estos aceites esenciales insecticidas, representan un aporte en la búsqueda y diseño de mejores métodos de control vectorial.

Abstract

Title: *Alteration of the mitochondrial respiratory chain and acetylcholinesterase in the presence of essential oils with insecticidal activity in Aedes Aegypti.*

Author: Nicolás Muñoz Medina**

Key Words: Essential oil, *Aedes Aegypti,* Mitochondrial CTE.

Description:

Due to the considerable increase in the population of *Aedes aegypti* mosquitoes and, consequently, the increase in viral diseases, research has been intensified to control this pest. However, the development of chemical insecticides has not been entirely beneficial since, for several years, resistance to these insecticides has been reported due to poor application. Therefore, insecticides derived from natural products have offered an interesting alternative in the control of the mosquito population. CINTROP previously confirmed that the seven oils, *Steiractinia aspera; Turnera diffusa; Calycolpus moritzianus; Piper aduncum; Elaphandra quinquenervis; Hyptis dilatata; Lippia origanoides* (Chemotype carvacrol+p-cymene) presented insecticidal activity, so the objective of this project was to contribute with the possible mechanism of action of these seven substances evaluated in the mitochondrial electron transport chain (ETC) and acetylcholinesterase. All the evaluated oils presented a significantly lower percentage of NADH and succinate oxidase activity compared to the control (ETC activity in the absence of essential oils). The activity of determining enzymes in electron transport was measured, such as cytochrome c oxidase, which presented alterations in the presence of *H. dilatata* and *L. origanoides* oils; NADH dehydrogenase was altered only by *H. dilatata*, succinate dehydrogenase exhibited an inhibition in the presence of *S. aspera* and *T. difussa* oils; and the enzyme succinate cytochrome c reductase showed

alterations in the presence of *C. moritzianus, P. aduncum* and *E. quinquenervis* oils. The description of the possible mechanism of action of these insecticidal essential oils represents a contribution to the search and design of better vector control methods.

Introducción

Las enfermedades transmitidas por los insectos son de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Elston, D. M., 2004). El *Aedes aegypti,* una especie de artrópodo hematófago, es el principal transmisor de los arbovirus: Dengue (DENV), Zika (ZIKV) y Chikunguña (CHIKV), por lo tanto, es objeto de investigaciones para control de su propagación, teniendo como estrategia principal, el uso de insecticidas sintéticos (Borrero-Landazabal et al., 2018).

Sin embargo, el problema con estos productos es que su aplicación a largo plazo y su uso extensivo, han resultado en la acumulación de residuos en los alimentos, el agua, el suelo y, a su vez, provocando efectos adversos para la salud humana y los ecosistemas. Además, varios estudios reportan que el uso indiscriminado de estas sustancias químicas induce la resistencia en los insectos (Mossa et al., 2018; Elumalai et al., 2012; Grisales, 2013).

Como consecuencia de lo anterior, la comunidad científica ha puesto sus esfuerzos en sustituir estos productos químicos de origen sintético por alternativas más seguras; los productos naturales, extraídos de las plantas, han sido foco de estudio dado el sistema defensivo que estas presentan, de manera natural, contra múltiples insectos. Además, se ha demostrado que su uso para la creación de sustancias insecticidas, presentan un efecto amigable al medio ambiente, siendo no tóxico para los mamíferos.

A comparación de los productos sintéticos, la efectividad de los productos naturales como insecticidas, radica en que los insectos, no generan resistencia hacia estos, debido a que estos compuestos poseen múltiples componentes que le permiten atacar múltiples dianas farmacológicas. Entre los más destacados se encuentran los aceites esenciales, que han

presentado un efecto insecticida sobre el vector *Aedes aegypti* (Batish et al., 2008; Garcia & Pérez 2009).

Un beneficio de los aceites esenciales es que su composición diversa de metabolitos secundarios le permite presentar una mayor dificultad al vector para generar resistencia hacia este. Además, presentan una actividad incrementada con respecto a los compuestos individuales (Zoubiri & Baaliouamer, 2014). Los aceites esenciales sirven como ingredientes bioactivos en formulaciones de insecticidas (Chaudhari, 2021).

El Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) se ha centrado en el estudio de la actividad insecticida de una gran variedad de aceites esenciales, en el que sobresale la acción biocida de *Salvia officinalis (*Lamiaceae), dónde se reportó: daño del ADN, inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) y alteraciones enzimáticas mitocondriales (Castillo et al., 2019; Borrero et al., 2018; Borrero et al., 2020).

Con base en lo anterior, el objetivo principal de este trabajo de investigación es el estudio del mecanismo de acción los aceites *Steiractinia aspera*; *Turnera diffusa*; *Calycolpus moritzianus*; *Piper aduncum*; *Elaphandra quinquenervis*; *Hyptis dilatata*; *Lippia origanoides (*Quimiotipo carvacrol+*p*-cimeno) previamente evaluados en el laboratorio y que presentaron actividad insecticida, ya que un conocimiento de su mecanismo de acción puede ayudar a predecir el espectro de actividad en los microorganismos. Esta información también se puede utilizar para derivatizar estratégicamente las moléculas para reducir la toxicidad del huésped, aumentar la afinidad o promover la absorción. Siendo el foco principal en las dianas farmacológicas; la acetilcolinesterasa y las proteínas de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, en larvas de mosquito *Aedes aegypti*.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Contribuir con el posible mecanismo de acción de siete sustancias insecticidas de origen natural con actividad insecticida, *Steiractinia aspera*; *Turnera diffusa*; *Calycolpus moritzianus*; *Piper aduncum*; *Elaphandra quinquenervis*; *Hyptis dilatata*; *Lippia origanoides (*Quimiotipo carvacrol+*p*-cimeno) sobre larvas (L4) de *Aedes aegypti*.

1.2 Objetivos específicos

Determinar el efecto de siete aceites esenciales con actividad insecticida, Steiractinia aspera; Turnera diffusa; Calycolpus moritzianus; Piper aduncum; Elaphandra quinquenervis; Hyptis dilatata; Lippia origanoides (Quimiotipo carvacrol+p-cimeno) sobre la actividad de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, en larvas (L4) de Aedes aegypti.

Evaluar el efecto neurológico de siete aceites esenciales con actividad insecticida, Steiractinia aspera; Turnera diffusa; Calycolpus moritzianus; Piper aduncum; Elaphandra quinquenervis; Hyptis dilatata; Lippia origanoides (Quimiotipo carvacrol+p-cimeno) sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en larvas (L4) de Aedes aegypti.

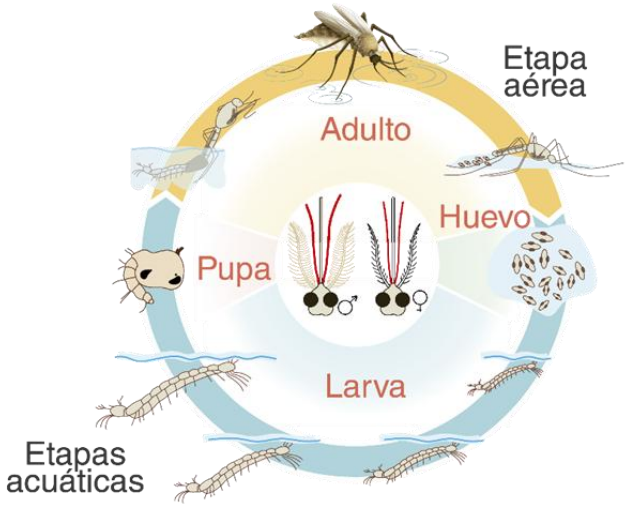
2. Marco de referencia

2.1 Aedes aegypti

Aedes aegypti es un insecto holometábolo, es decir, su ciclo de vida abarca una metamorfosis completa con un estado de huevo, cuatro estadios de larva (L1-L4), pupa y adulto (ver Figura 1) (Zettel & Kaufman, 2013).

Figura 1

Ciclo de vida del mosquito Aedes aegypti



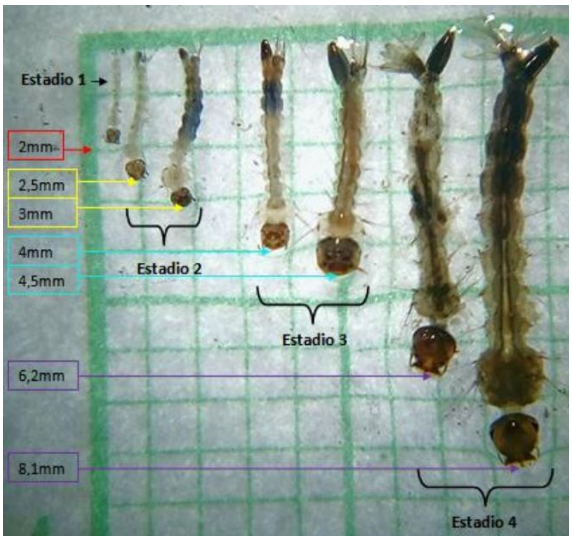
Tomado de (Vidal et al., 2017).

Este ciclo de vida es completado en dos ambientes diferentes, las larvas y las pupas se desarrollan en hábitats acuáticos, mientras que los huevos y los mosquitos adultos se desarrollan en un ambiente terrestre. El ciclo de vida de estos artrópodos inicia con la obtención de sangre de vertebrados (principalmente humanos) por parte de las hembras, esto con la finalidad de alcanzar el hierro (Fe) necesario para lograr completar los nutrientes para la maduración de los huevos. Los huevos son depositados en superficies húmedas, en mayor medida donde se logre almacenar

agua. Inicialmente se ven de color blanco, pero en cuestión de minutos pasan a un color negro brillante (Zettel & Kaufman, 2013; Geris et al., 2012). Los huevos eclosionan en agua conduciendo a los cuatro estadios larvarios; primero (2mm), segundo (3mm), tercero (4mm) y cuarto (8mm) (ver Figura 2).

Figura 2

Comparación de los diferentes estadios de larva de Aedes Aegypti

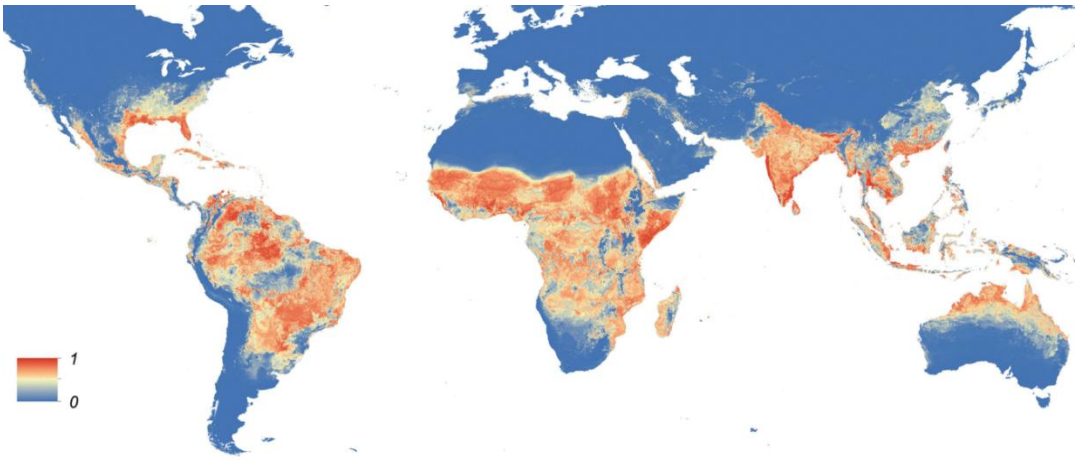


Tomado de (Cruz, 2017).

Los mosquitos *Aedes aegypti* son los principales vectores de los virus del Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Chikunguña (CHIKV), entre otros (Centers for Disease Control and Prevention, Mosquito Life Cycle, 2012). En la actualidad esta especie se ha logrado establecer por todo el mundo encontrándose en los países mediterráneos, países tropicales y subtropicales incluyendo su país de origen, África; donde se cree que su llegada a diversas partes del mundo se debe a la entrada como polizones en barcos esclavistas durante los siglos XVI y XVII (ver Figura 3) (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)).

Figura 3

Distribución mundial de Aedes aegypti



Nota. El mapa muestra la probabilidad de ocurrencia. Tomado de (Kraemer et al., 2015).

Los virus transmitidos por estos artrópodos son conocidos como arbovirus y son actualmente una de las mayores amenazas de salud pública en el mundo; esto es debido a que son generadores de enfermedades virales que resultan relevantes tanto en mortalidad como en morbilidad (Campbell et al., 2015). Debido a que el listado de arbovirus registrados es amplio, se clasifican en diferentes familias, siendo las más importantes, el virus del dengue (DENV) y el Zika (ZIKV) pertenecientes a la familia de *Flaviviridae*, y el virus de chikunguña (CHIKV) perteneciente a la familia *Togaviridae* (Blitvich, 2016).

El virus del dengue (DENV) y sus cuatro serotipos son los patógenos arbovirales que se presentan en casi todos los países con ambientes tropicales o subtropicales, poniendo en riesgo de infección a casi un tercio de la población humana mundial (Weaver & Vasilakis, 2009; Campbell et al., 2015). Son causantes de la fiebre del dengue (DF), una enfermedad autolimitada

que dura de 2 a 10 días, sin embargo, si la dolencia progresa, se desarrolla la fiebre hemorrágica del dengue (DHF) que puede poner en peligro al portador (Weaver & Vasilakis, 2009).

Anualmente se reportan más de 1,1 millones de casos por Chikunguña (CHIKV) y 220 mil casos por zika (ZIKV) en América Latina (Colón et al., 2017; Yactayo et al., 2016). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud reportó 156 casos de chikunguña (CHIKV) y 160 casos de Zika (ZIKV) (Instituto Nacional de Salud, 2020). A su vez, en abril del 2016 la organización panamericana de la salud confirmó la presencia del virus del Zika (ZIKV) en 35 países (Organización Panamericana de la Salud, 2020).

En la actualidad no existe cura para ninguna de las enfermedades virales anteriormente nombradas y gracias a los cambios climáticos a nivel global, la expansión de poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* podría causar un daño a la población humana. Por ende, las enfermedades transmitidas por estos vectores constituyen una importante causa de muerte, carga de morbilidad, un estancamiento en el desarrollo socioeconómico y una carga para los servicios de salud. Es de vital importancia avanzar en el estudio de estos vectores, ya que no han podido ser controlados de manera eficaz y permanente (Iwamura et al., 2020). La estrategia ideal mientras se logran obtener vacunas o tratamientos farmacológicos efectivos para el humano, es el enfoque en el estudio, diseño y la fabricación de insecticidas que permitan el manejo de la población de estos mosquitos.

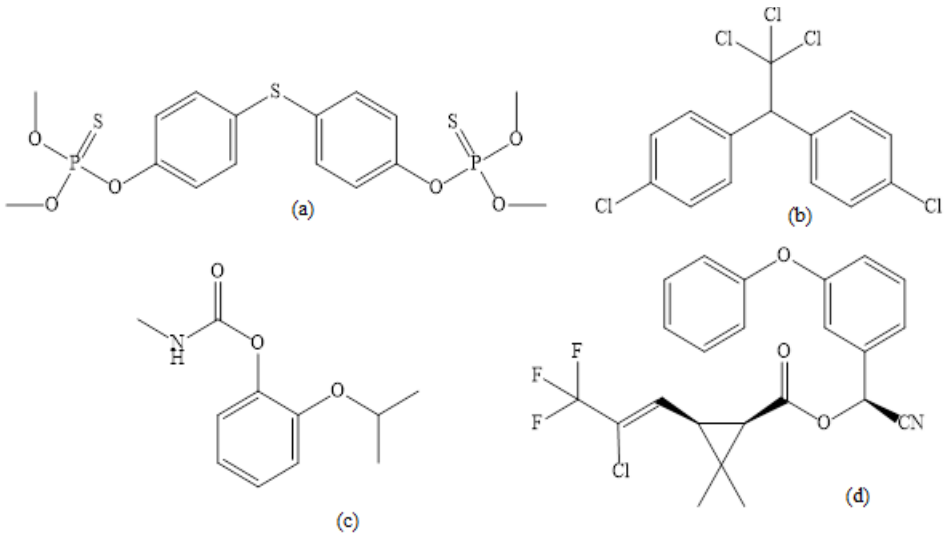
2.2 Alternativas de remplazado para los insecticidas convencionales

Los insecticidas son una estrategia ampliamente usada para el control poblacional de *Aedes aegypti*. Los más utilizados son los: organofosforados, como el Temefos (a) (Grisales et al., 2013), los organoclorados, como el DDT (b) (Aguirre et al., 2015), los carbamatos, como el

Propoxur (c) (Ocampo et al., 2011) y, por último, los Piretroides, como el Lambda Cialotrina (d) (Ocampo et al., 2011) (ver Figura 4).

Figura 4

Insecticidas más utilizados



Nota. Temefos (a), DDT (b), Propoxur (c), Lambda Cialotrina (d).

Los insecticidas organoclorados, impiden la transmisión normal del impulso nervioso afectando los axones de las neuronas, además de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias (Ponce et al., 2006). Los piretroides afectan tanto el sistema nervioso central como el periférico, estimulando inicialmente las células nerviosas y produciendo repetidas descargas además de eventuales casos de parálisis (Ponce et al., 2006). La actividad insecticida de los compuestos organofosforados y carbamatos se asocia con su capacidad para inhibir la enzima Acetilcolinesterasa (AChE) (Borrero et al., 2018). El problema con estos compuestos radica en que ocasionan daños irremediables; su uso constante provoca que el vector genere resistencia

hacia el insecticida, siendo esta una de las principales amenazas para la eficacia de los programas de control de vectores (Borrero et al., 2018).

Recientemente, se han desarrollado insecticidas con menos toxicidad y menos persistentes en el medio ambiente, como los neonicotinoides y las oxadiazinas. (Isman, 2015). Sin embargo, estudios han revelado que *Aedes aegypti* ha adquirido resistencia hacia los insecticidas sintéticos más utilizados (organofosforados, los organoclorados, los carbamatos, los piretroides) (Melo et al., 2010; Diniz et al., 2014; Grisales et al., 2013).

Finalmente, los insecticidas de origen vegetal (extractos de plantas, aceites esenciales y/o metabolitos secundarios) han sido de especial interés debido a la gran biodiversidad de especies que se encuentran en el mundo. Por lo tanto, los insecticidas derivados de productos naturales ofrecen una favorable gama de nuevos compuestos más seguros para el control de mosquitos, y para los diferentes ecosistemas. La mezcla sinérgica de sus compuestos activos induce varios mecanismos de acción y da como resultado una menor resistencia.

Las plantas producen una variedad de sustancias químicas que cumplen funciones no esenciales en ellas, permitiendo que la ausencia de estas, no sean letales para el organismo. Entre estos compuestos activos se incluyen los terpenos, alcaloides, amidas, esteroides, flavonoides, furanocromonas, fenilpropanoides, derivados del fenol, lignanos, neolignanos, naftoquinonas, ácidos grasos y sus derivados. Los metabolitos secundarios, son parte de un conjunto de moléculas orgánicas que poseen ciertas características únicas, y actúan en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (Swain 1973; Levin 1976; Cronquist 1977; Ringuelet & Viña, 2013; Bennett & Wallsgrove, 1994). De acuerdo con los principios activos de los metabolitos secundarios, son agrupados de la siguiente manera:

Terpenoides, existen alrededor de 25.000 metabolitos secundarios pertenecientes a este grupo. Derivan del compuesto IPP (Isopentenil difosfato) y se forman por la ruta del ácido mevalónico. Hacen parte de una extensa variedad de tipos de plantas y poseen una actividad biológica importante, entre las que se encuentran los aceites esenciales (AEs) (Croteau & Kutchan 2000; Goodwin 1971).

La toxicidad de los terpenos contra *Aedes aegypti* puede asociarse con su propiedad no polar; esta propiedad aumenta la capacidad del compuesto para penetrar la cutícula de las larvas hidrofóbicas y las vuelve más tóxicas para el insecto a diferencia de los compuestos polares. Se han identificado alrededor de 8.000 compuestos fenólicos conocidos que son sintetizados por dos rutas, la ruta del ácido shikímico o por la del malonato/acetato (Croteau & Kutchan 2000; Lincoln & Eduardo 2006). Son conocidos alrededor de 12.000 alcaloides, su estructura presenta uno o más grupos nitrógeno y son sintetizados a partir de aminoácidos.

Estos compuestos presentan una gran diversidad química (Croteau & Kutchan 2000; Robinson 1981). El alcaloide girgensohnina, un metabolito de N-cianometilpiperidina presente en el arbusto *Girgensohnia oppositiflora* (Amaranthaceae), exhibió propiedades anti-AChE in vitro moderadas (IC50 = 93 μM) (Rueda, Andrés G., 2018; Carreño Otero, Aurora L., 2014; Silvério M. 2020).

Sin embargo, los aceites esenciales (AE) han llamado la atención de los investigadores debido a que poseen componentes aromáticos derivados del fenol y componentes alifáticos, capaces de aportar propiedades de olor y sabor, además, le confieren a la planta mecanismos de defensa contra diferentes plagas, e incluso, las protege de las diferentes temperaturas, ya que actúan como antibacterianos, antivirales y antifúngicos (Regnault, Catherine,.2012).

Dentro de la variedad de compuestos, están los metabolitos vegetales secundarios lipófilos y altamente volátiles, que pueden separarse físicamente de otros componentes vegetales o del tejido. Según lo define la Organización Internacional de Normalización (ISO), el término "aceite esencial" se reserva para ''un producto obtenido a partir de materia prima vegetal, ya sea por destilación con agua o vapor, o del epicarpio de frutos cítricos mediante un proceso mecánico, o por destilación seca", es decir, únicamente por medios físicos (Turek, 2013).

Se ha reportado la concentración letal (CL50) a 24 horas de aceites esenciales extraídos de plantas colombianas: *Steiractinia aspera* (42.4 µg/mL); *Turnera difusa* (70.9 µg/mL); *Calycolpus moritzianus* (55.8 µg/mL); *Piper aduncum* (61.9 µg/mL); *Elaphandra quinquenervis* (59.8 µg/mL); *Hyptis dilatata* (61.1 µg/mL); *Lippia origanoides (*Quimiotipo carvacrol+*p*-cimeno) (73.3 µg/mL) (Duque J, 2023). Los aceites esenciales pueden ser sintetizados por todos los órganos de la planta por ejemplo: flores (bergamota, *Citrus bergamia*), hojas (limoncillo, *Citronella*; eucalipto, *Eucalyptus*), madera (sándalo, *Santalum*), raíces (pasto vetiver, *Chrysopogon zizanioides*), rizomas (jengibre, *Zingiber officinale*; Cúrcuma, *Curcuma longa*), frutos (anís, *Pimpinella anisum*), semillas (nuez moscada, *Myristica fragrans*) y se almacenan en células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares (Bakkali, 2008).

Se clasifican de acuerdo con sus componentes mayoritarios en compuestos terpénicos, sesquiterpenoides y fenilpropanoides, además de ser ampliamente utilizados como bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitarios e insecticidas (Bakkali, 2008). Los monoterpenos presentes en los AE pueden contener terpenos que son hidrocarburos (α-pineno), alcoholes (mentol, geraniol, linalol, terpinen-4-ol, *p*-mentano-3,8 diol), aldehídos (cinamaldehído, cuminaldehído), cetonas (tujona), éteres (1,8-cineol) y lactonas (nepetalactona) (Regnault, 2012). Dada la

compleja mezcla de compuestos activos, estas sustancias pueden actuar de manera sinérgica como una defensa, atacando así múltiples dianas biológicas y, por ende, dificultando que los mosquitos generen resistencia hacia estos (Pavela, 2019).

Trabajos recientes muestran que, en las células eucariotas, los aceites esenciales pueden actuar como prooxidantes que afectan las membranas celulares internas y los orgánulos como las mitocondrias. En algunos casos, los cambios en el potencial redox intracelular y la disfunción mitocondrial inducida por los aceites esenciales pueden asociarse con su capacidad para ejercer efectos anti-genotóxicos. Estos hallazgos sugieren que, al menos en parte, los efectos beneficiosos encontrados de los aceites esenciales se deben a efectos prooxidantes a nivel celular (Bakkali, F,.2008). Existen múltiples estudios en dónde se evalúa la actividad insecticida de diferentes aceites esenciales (Vera et al., 2014; Dias et al., 2015; Matasyoh et al., 2011; Zoubiri & Baaliouamer, 2014; Pavela, 2019).

2.3 Mecanismos de acción de insecticidas

Los mecanismos responsables de la resistencia a los insecticidas son complejos e incluyen cambios de comportamiento y/o fisiológicos. En los mosquitos, la resistencia está asociada con la modificación del sitio objetivo y la resistencia metabólica; la resistencia del sitio objetivo conlleva mutaciones que conducen a una alteración del sitio objetivo y resistencia a los insecticidas químicos; la resistencia metabólica, implica alteraciones en la expresión de una compleja serie de enzimas y vías de desintoxicación, cuyos mecanismos no son conocidos. La resistencia metabólica se produce a través de una mayor biodegradación del insecticida, generalmente a través de la sobreproducción de enzimas de desintoxicación como P450, glutatión S-transferasas (GST) y carboxi/colinesterasas (CCE). De ellas, las enzimas P450 son la

principal familia de enzimas asociadas con la resistencia a la mayoría de los insecticidas (David, J.P., 2013; Rodolphe, 2008; Hilary, 2011).

Estos mecanismos son producto de mutaciones en el genoma del mosquito, dada la extensa exposición a dosis subletales de los insecticidas (Liu, 2015). El interés en resolver esta problemática, ha llevado a la búsqueda de nuevas herramientas que presenten múltiples mecanismos de acción y/o diferentes dianas farmacológicas: entre esas, existen las herramientas biológicas que controlan la etapa adulta, estas se basan en el comportamiento, como la Técnica del Insecto Estéril (TIE), la Técnica del Insecto Incompatible (IIT) y la Liberación de Insectos portadores de un gen Letal Dominante (RIDL), que implican la esterilización de insectos mediante irradiación química natural. Otra técnica aplicada frente al estadio adulto es el uso de hongos entomopatógenos, como los *Entomophthorales, Hypocreales* y *Pezizales* (Less, 2015; Alphey, .2013).

Los insecticidas organofosforados y carbamatos actúan inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa. Los piretroides y algunos organoclorados se dirigen a los canales de sodio. Los ciclodienos y policloroterpenos se dirigen a los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Hemingway, 2000). Un enfoque biológico es el uso de bacterias entomopatógenas (*Bacillus thuringiensis israelensis* y *Bacillus sphaericus*), que actúan mediante la acción tóxica de sus esporas dañando el epitelio intestinal de las larvas (Silvério, 2020). La completa comprensión de los mecanismos de acción de los insecticidas de origen natural es aún incierta, por lo que son necesarias más investigaciones en este campo de estudio. Sin embargo, se han propuesto y probado varios mecanismos. La mayoría de los estudios sobre mecanismos de acción se han centrado en la etapa larvaria, particularmente en la alimentación y/o el contacto. En el caso del contacto puede implicar inhibición enzimática, toxicidad para el sistema nervioso,

alteración endocrina y para la ingestión, la acción suele ser a través de toxicidad digestiva, entre otros mecanismos dependiendo del sitio objetivo (Braga, 2007).

La rápida acción tóxica de los aceites esenciales contra el insecto indica un posible modo de acción neurotóxico (Moshe, 2002). Los fitoquímicos pueden actuar en los sistemas colinérgico, GABA, mitocondrial y octopaminérgico. Dado estos múltiples mecanismos de acción, el desarrollo de resistencia por parte del vector *Aedes aegypti* hacia estos extractos vegetales presenta mayor dificultad (Rameshwar, 2010; Gomes, 2018).

El comité de Acción de Resistencia de los Insecticidas (IRAC), clasificó los mecanismos de acción de diferentes insecticidas comerciales según los tipos dianas: nervios y músculos, el crecimiento y desarrollo, la respiración mitocondrial, el intestino medio y dianas no conocidas. El presente proyecto de grado centrará su interés en las principales dianas farmacológicas: la mitocondria y la enzima acetilcolinesterasa, ya que son pieza clave para el control poblacional del vector *Aedes aegypti*.

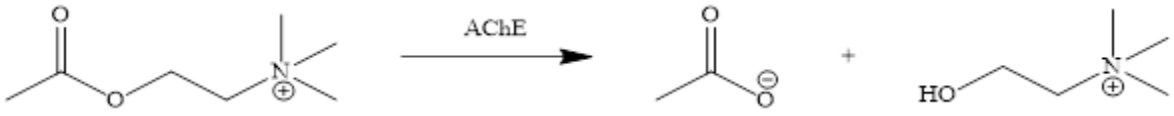
2.4 Enzima acetilcolinesterasa (AChE)

La acetilcolinesterasa (AChE) funciona en los sistemas nerviosos central y periférico, junto con el receptor acetilcolina, en la transmisión de potenciales de acción a través de sinapsis neuromusculares y nerviosas; esta enzima pertenece al grupo de las hidrolasas, por lo que su tarea fisiológica es la destrucción hidrolítica del neurotransmisor catiónico acetilcolina (ACh), siendo la responsable de la regulación de su concentración. La hidrólisis del neurotransmisor ACh produce la formación del ion acetato y el nutriente colina (ver Figura 5). La reacción de hidrólisis logra detener de manera efectiva la señal, formando moléculas de acetilcolina capaces de volverse a utilizar en otra señal. La inhibición de está enzima, por ejemplo, utilizando el

insecticida carbamato, Propoxur, provoca el acaparamiento de acetilcolina, lo que ocasiona la hiperestimulación de los receptores nicotínicos y muscarínicos, logrando así la interrupción de la neurotransmisión y generando ataxia, que significa la pérdida total de la coordinación en el sistema neuromuscular y eventualmente la muerte del mosquito (López & Pascual-Villalobos, 2010; Quinn, 1987).

Figura 5

Hidrólisis de la acetilcolina (ACh) por la enzima acetilcolinesterasa (AChE)



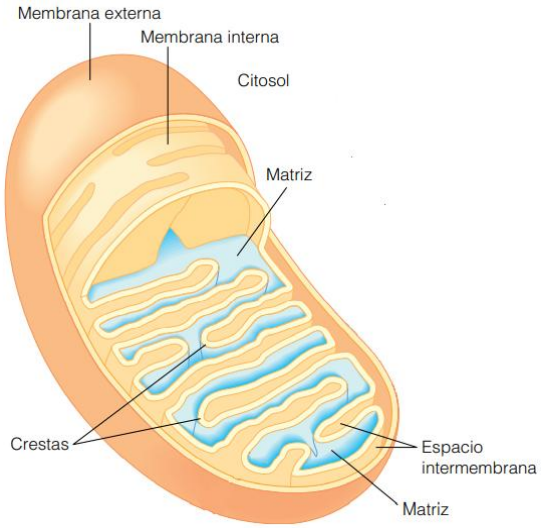
2.5 Mitocondria

Las mitocondrias o cómo son frecuentemente llamadas ¨centrales energéticas¨ son orgánulos celulares eucariotas encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la activación celular mediante un proceso denominado respiración celular. Estas organelas actúan como centrales energéticas, sintetizando ATP a partir de la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos (Detmer & Chan, 2007; Youle & Bliek 2012).

Presenta un papel muy importante en el metabolismo celular, ya que, además de sintetizar y mantener los niveles de ATP en la célula, es la encargada de regular los mensajeros secundarios como el Ca^{2+} y las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Zorov et al., 2006; Sims & Muyderman, 2010).

Figura 6

Representación gráfica de la Mitocondria



Tomado de (Mathews et al., 2002).

2.5.1 Cadena respiratoria mitocondrial

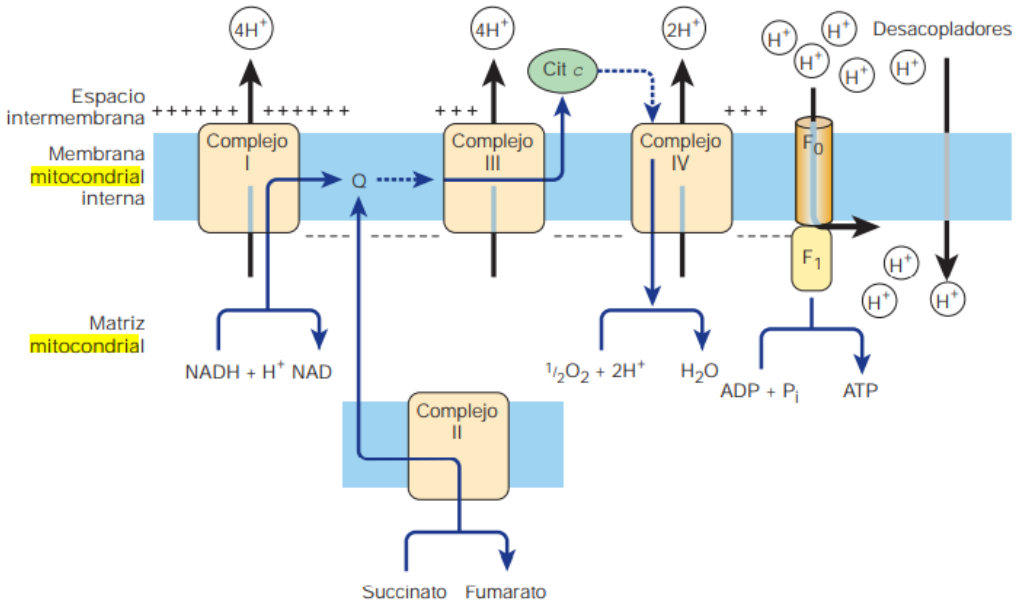
La cadena respiratoria mitocondrial está conformada por complejos enzimáticos presentes en la membrana interna, involucrados en la transferencia de electrones al oxigeno por medio de bombas de protones redox-impulsadas y el uso de los gradientes eléctricos y de protones en la síntesis de ATP. Está compuesta por cinco complejos, en donde los cuatro primeros son los encargados del flujo de electrones, y el quinto, el encargado de la síntesis de ATP. El complejo I y el complejo II reciben electrones de la oxidación del NADH y del succinato, y luego los pasan a un transportador electrónico lipídico, la coenzima Q. El complejo III oxida la forma reducida de la coenzima Q y reduce a su vez al citocromo c, un transportador electrónico proteico que también puede desplazarse por el interior de la membrana interna.

Para finalizar, el complejo IV acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del O_2 a agua. La energía liberada por estas reacciones exergónicas crea un gradiente de protones a

través de la membrana interna, al bombearse los protones hacia el espacio intermembrana, los protones vuelven a entrar luego en la membrana a través de un canal especifico en el complejo V. La energía liberada por este proceso exergónico impulsa la síntesis endergónica de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

Figura 7

Cadena respiratoria mitocondrial



Tomado de (Murray, 2009).

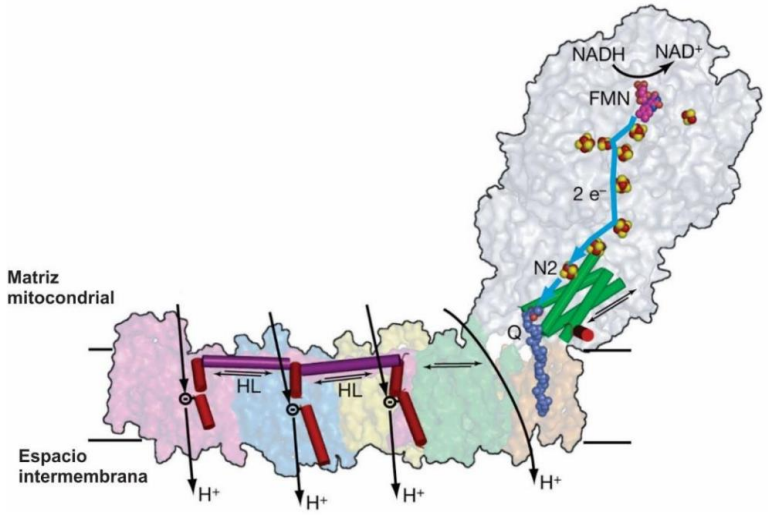
2.5.2 Complejo I

La NADH: ubiquinona oxidorreductasa o complejo I (ver Figura 8) es un gran complejo multienzimático, con un tamaño aproximado de 1.000 kDa. Su estructura posee una forma de L con un gran dominio en la membrana, con alrededor de 60 hélices transmembrana, y un dominio hidrófilo. El complejo I es el encargado de captar dos electrones del NADH, oxidándolo a NAD^+ y reducir la flavina mononucleotica (FM) a $FMNH_2$, mediante una secuencia de clusters hierro-

azufre que únicamente reciben un electrón, llevándolo hasta la ubiquinona, terminando en la formación de ubiquinol (QH_2). Aparte del transporte electrónico, el complejo I bombea protones a través de la membrana, gracias a una bomba de protones redox-impulsada, generando así un gradiente electroquímico siendo la estequiometria aceptada $2H^+/e^-$ (Hatefi 1985; Carroll & Fearnley 2003; Letts et al., 2016).

Figura 8

Complejo I



Tomado de (Gué et al., 1997)

2.5.3 Complejo II

La succinato deshidrogenasa (SDH): Succinato coenzima Q reductasa o complejo II (ver **Figura 9**), es un complejo proteico propio de la membrana interna mitocondrial; participa en el ciclo del ácido tricarboxilico, sin embargo, no tiene la capacidad de conservar energía redox como un potencial químico (Ishaaya, Nauen, & Horowitz, 2007; Mathews et al., 2002).

La enzima está compuesta de cuatro subunidades, dos hidrofílicas y dos hidrofóbicas:

Succinato deshidrogenasa subunidad A (SDHA). Es una flavoproteína (Fp) hidrofílica que tiene unida covalentemente como cofactor una molécula de FAD. También contiene el sitio de unión del succinato.

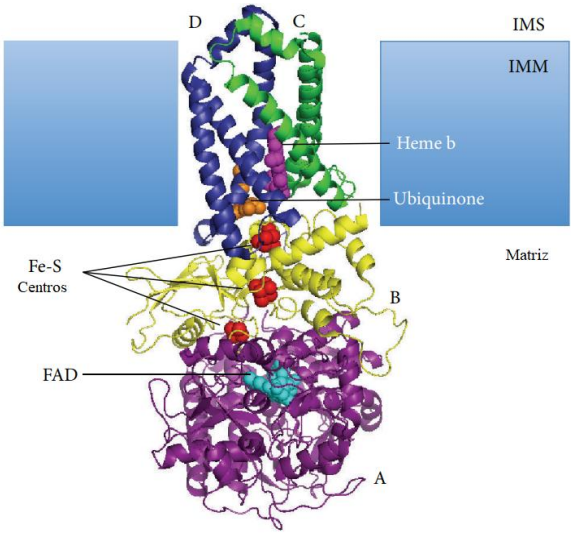
Succinato deshidrogenasa subunidad B (SDHB). También hidrofílica, contiene tres clústers de hierro-azufre: 2Fe-2S, 4Fe-4S y 3Fe-4S.

Succinato deshidrogenasa subunidad C (SDHC). Hidrofóbica. Une el complejo proteico a la membrana de la mitocondria.

Succinato deshidrogenasa subunidad D (SDHD). Hidrofóbica. Une el complejo proteico a la membrana de la mitocondria.

Figura 9.

Complejo II.



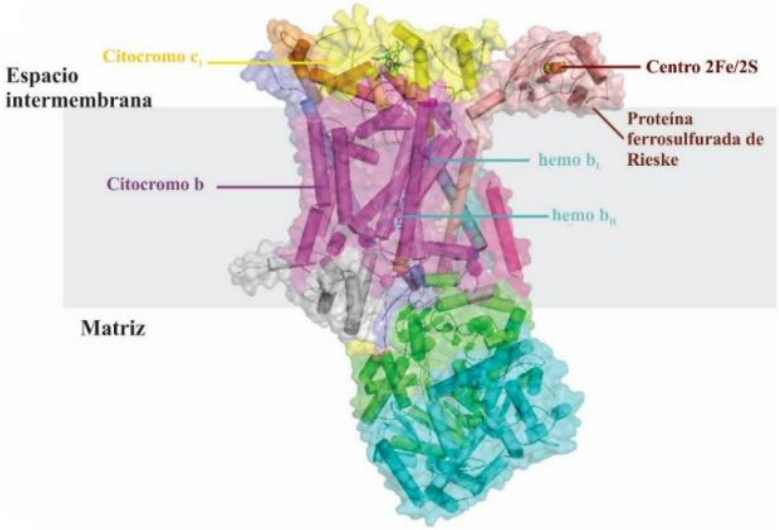
Tomado de (Her & Maher, 2015).

2.5.4 Complejo III

El citocromo bc_1: Ubiquinona-citocromo c-oxidorreductasa o complejo III (ver Figura 10) consta de 11 o 12 subunidades, posee una masa de 490 kDa; el complejo cataliza el transporte de electrones del ubiquinol al citocromo c y a su vez actúa como una bomba de protones redox-impulsada, presentando una relación estequiometría de $4H^+/2e^-$. El mecanismo de reacción de este complejo se le denomina ciclo de la ubiquinona, en el que la molécula de ubiquinol (QH_2) es oxidada, por lo que un electrón es donado hacia la proteína Rieske, para, posteriormente, ser dirigidos hacia el citocromo c. Un electrón es transferido a una molécula de ubiquinona Q, reduciéndose a ubiquinol. (Yu et al., 2013; Gao et al., 2003).

Figura 10

Complejo III.



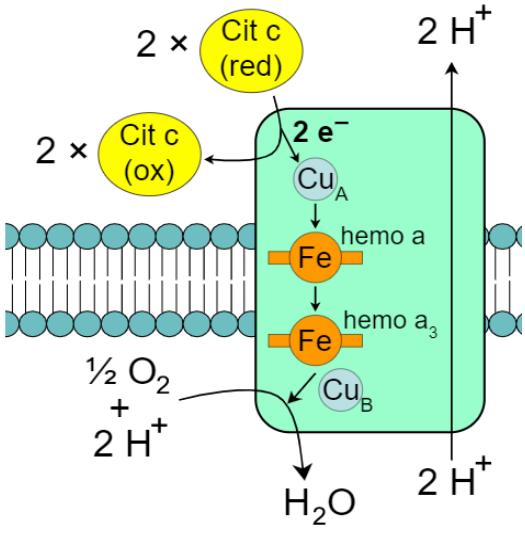
Tomado de (Mulkidjanian, 2010)

2.5.5 Complejo IV

El citocromo aa_3: citocromo c oxidasa o complejo IV es la última enzima perteneciente a la cadena transportadora de electrones (ver Figura 11). Esta recibe un total de 4 electrones de las moléculas de citocromo c presentes. El ferrocitocromo c (el citocromo c reducido) reduce el oxígeno en dos moléculas de agua, teniendo al complejo como catalizador de la reacción. Además, un paso de protones a través de la membrana genera un potencial electroquímico de protones, que es aumentado por el bombeo transmembrana de protones redox-impulsado desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana con estequiometría de $2H^+/2e^-$; la enzima ATP sintasa emplea esa energía para la síntesis de ATP (Mathews et al., 2002; Brunori, Antontni, Malatesta, Sarti, & Wilson, 1987; Tsukihara 1995).

Figura 11

Complejo IV



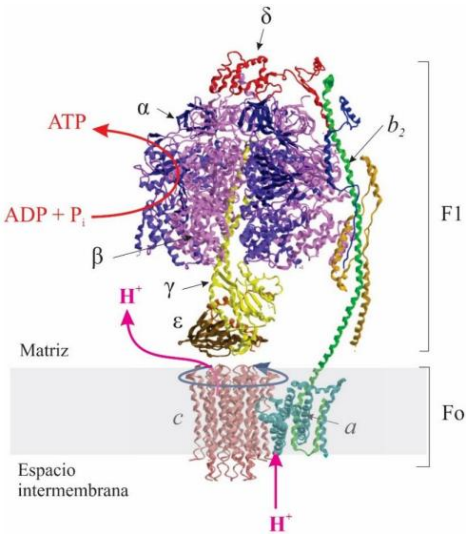
Tomado de (Rich, 2017).

2.5.6 Complejo V

La F1Fo-ATPasa: Complejo ATP sintasa o complejo V, es una enzima transmembranal que cataliza la síntesis de ATP celular a partir de ADP, fosfato inorgánico (Pi) y la energía suministrada por un flujo de prones (H^+). La ATP sintasa es una de las proteínas más abundantes en la tierra, y la síntesis de ATP es la reacción química que más sobresale en el mundo biológico. La ATP sintasa actúa de forma independiente respecto a la cadena transportadora de electrones. Posee un diámetro de 10 nm y se compone de dos complejos principales: un rotor incorporado en la membrana mitocondrial interna (Fo), un dominio catalítico hidrofílico que sobresale de la membrana (F1). Estos dos complejos se asocian mediante interacciones electrostáticas. El componente Fo está formado por las subunidades a, b_2 y $c_{10\text{-}14}$. La parte F1 consta de las subunidades α_3, β_3, γ, δ y ε. Además, la parte principal del complejo F1 está formada por los tres dímeros αβ (Mathews et al., 2002; Yoshida2001, Muneyuki, & Hisabori, 2001).

Figura 12.

Complejo V



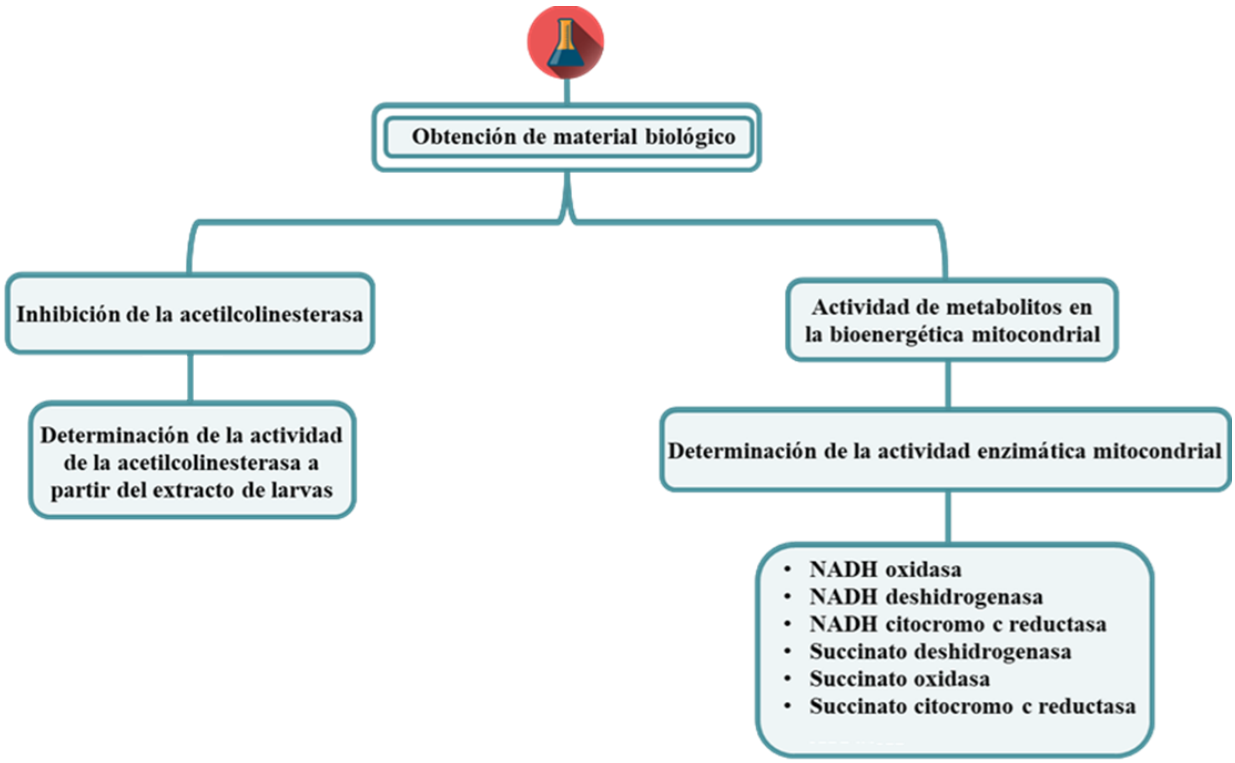
Tomado de (Nesci et al., 2017).

3. Metodología

La Figura 13 muestra un flujograma de la metodología aplicada en el presente trabajo de investigación, seguido, se detalla uno a uno el protocolo realizado.

Figura 13

Flujograma de la metodología.



3.1 Material Biológico

Fueron empleadas larvas *Aedes aegypti* cepa Rockefeller del laboratorio de Entomología Médica del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la UIS. Los individuos permanecieron en condiciones de colonia a una temperatura de 25±5 °C, humedad relativa de 70±5% y fotoperiodo de 12:12. Los zancudos adultos, se alimentaron con una solución de miel al 10%. Empleando la sangre de ratas albinas (*Rattus norvegicus*) tipo Winstar

WI IOPS AF/Han, facilitadas por el bioterio de la facultad de salud de la Universidad Industrial de Santander, cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, fueron alimentadas las hembras para la producción de huevos.

La recolección de huevos se realizó en cada jaula de cría, colocando contenedores plásticos con papel filtro humedecido, los cuales se retiraron cada 8 días. Los huevos se sumergieron en agua libre de cloro, logrando de esta manera su eclosión al estadio de pupa, que posteriormente pasaron al estadio de larva, alimentándose con concentrado para peces TetraMin Tropical Flakes®. Una vez las larvas alcanzaron el estadio L4, fueron separadas empleando una pipeta Pasteur y se transfirieron a vasos de plástico para su posterior uso.

3.2 Homogenización de larvas y cuantificación de proteínas totales

Se seleccionaron aproximadamente 100 larvas (L4), las cuales se filtraron con tela de tul y se depositaron en un tubo de homogenización con 1500 mL de medio de isotónico (BSA 0.1%, EGTA 1 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2, Sacarosa 250 mM). Se homogenizaron haciendo uso de un triturador de tejidos Potter-Elvenhjem. El resultante fue filtrado a través de una jeringa de vidrio con el fin de eliminar los residuos del exoesqueleto. La cuantificación de la proteína total se realizó mediante el método de Bradford.

3.3 Elaboración de los Aceites esenciales

Todos los especímenes botánicos utilizados para detectar la actividad insecticida fueron recolectados de diferentes lugares de Colombia con autorización del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS) a través de su Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios

Ecosistémicos y acceso a recursos genéticos y productos derivados para el programa Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM (Resolución 4 de junio 0812 2014). El proceso de extracción fue realizado por el "Centro de Investigación en Biomoléculas—CIBIMOL y Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Plantas Tropicales Aromáticas y Medicinales—CENIVAM".

Se obtuvieron AE de diferentes plantas nativas de América mediante hidrodestilación asistida por microondas. Teniendo que los aceites que presentaron mayor actividad fueron: *Steiractinia aspera*; *Turnera diffusa*; *Calycolpus moritzianus*; *Piper aduncum*; *Elaphandra quinquenervis*; *Hyptis dilatata*; *Lippia origanoides (*Quimiotipo carvacrol+*p*-cimeno).

3.4 Determinación de la actividad enzimática mitocondrial

El efecto de los aceites esenciales sobre los complejos enzimáticos relacionados con la cadena respiratoria fue determinado en un espectrofotómetro, Multiscan GO (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU) manipulando el programa Skanlt, y polarográficamente en un oxígrafo de alta resolución (Oxygraph-2k OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria).

3.4.1 NADH oxidasa

La actividad de la enzima se determinó polarográficamente por el método de Singer (Singer 1974). Utilizando un oxímetro O2K con instrumento de respirometría Oroboros de alta resolución a una temperatura de 28 °C se analizó el medio de reacción compuesto por un buffer fosfato 80 mM (pH 7.4), EDTA 50 µM y 0.1 mg/mL de proteína mitocondrial. La adición del NADH 0,2 mM dio inicio a la reacción. Teniendo que la tasa de oxidación se expresó mediante la relación de consumo de oxígeno.

Ecuación 1

Esquema de la oxidación de NADH.

$$NADH \rightarrow NAD^+ + 2e^- + H^+$$

3.4.2 Succinato oxidasa

La actividad de la enzima se determinó polarográficamente por el método de Singer (Singer 1974). El seguimiento de la velocidad de consumo de oxígeno dada por la oxidación del succinato al fumarato se realizó con un oxímetro O2K con instrumento de respirometría Oroboros de alta resolución a una temperatura de 28 °C. El medio de reacción está compuesto por un buffer fosfato 80 mM (pH 7.4), EDTA 50 µM y 0.1 mg/mL de proteína mitocondrial. La adición del succinato de sodio 10 mM dio inicio a la reacción. Teniendo que la velocidad de oxidación se cuantificó con base en la velocidad de consumo de oxígeno.

Ecuación 2

Esquema de la oxidación del succinato.

$$Succinato + \frac{1}{2}O_2 + 2H^+ \rightarrow Fumarato + H_2O$$

3.4.3 NADH deshidrogenasa.

La actividad de la enzima se evaluó espectrofotométricamente por una adaptación del método de Singer (Singer 1974). En un medio de incubación se adicionó una solución de buffer fosfato 50 mM (pH 7,4), KCN 1 mM, rotenona 1 mM, NADH 0.2 mM, EDTA 2 mM y 0,1 mg/mL de proteína homogeneizada, el cual fue incubado durante 10 minutos a una temperatura

de 28°C para lograr una activación completa. Terminado el tiempo, la reacción da inicio con la adición de ferrocianuro de potasio 0,6 mM un receptor artificial de electrones. La oxidación de NADH por la enzima NADH deshidrogenasa fue monitoreada a 420 nm y la concentración del ferrocianuro de potasio reducido fue determinada mediante su coeficiente de extinción molar.

Ecuación 3

Esquema de reacción de NADH deshidrogenasa.

$$NADH + ferrocianuro\ de\ potasio\ (oxidado) \rightarrow NAD^{+} + ferrocianuro\ de\ potasio\ (reducido)$$

3.4.4 Succinato deshidrogenasa.

La actividad de la enzima se evaluó espectrofotométricamente por una adaptación del método Singer (Singer 1974). En un medio de incubación se adicionó una solución de buffer fosfato 50 mM (pH 7,4), KCN 1 mM, rotenona 1 mM, succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM y 0,1 mg/mL de proteína homogeneizada, el cual fue incubado durante 10 minutos a una temperatura de 38°C para lograr una activación completa. Pasado el tiempo, rápidamente se agregaron los receptores artificiales de electrones, fenazina metosulfato (PMS) 1 mM y 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP) 60 µM, para dar inicio a la reacción. El seguimiento de la velocidad de reducción del DCPIP se supervisó a 600 nm.

Ecuación 4

Esquema de reacción de succinato deshidrogenasa.

$$Succinato + DCPIP\ (oxidado) \rightarrow Fumarato + H^{+} + DCPIP\ (reducido)$$

3.4.5 Succinato Citocromo C reductasa

La actividad de la enzima se estimó mediante el protocolo descrito por Somlo (Somlo 1965). Se registró la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm tras bloquear la cadena respiratoria con KCN y rotenona. Se usó un medio de reacción compuesto por solución tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, 0.1 mg/mL de proteína mitocondrial, rotenona 1 µM, KCN 1 mM y succinato de sodio 5 mM incubado a 28 °C durante diez minutos. La reacción dio inicio con la adición de citocromo c oxidado 40 µM. La concentración del citocromo c reducido se estimó mediante su coeficiente de extinción molar (ε redox) 19.8 $mM^{-1}cm^{-1}$ a 550 nm aplicando la Ley de Beer.

Ecuación 5

Esquema de reacción de Citocromo C reductasa.

$$2\ citocromo\ c\ (oxidado) + 2H + QH_2 \rightarrow 2\ citocromo\ c\ (reducido) + 4H + Q$$

3.4.6 Citocromo C oxidasa

La actividad de la enzima fue determinada espectrofotométricamente por el método de Mason (Mason 1973). En un medio de incubación compuesto por una solución tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) y EDTA 2 mM, 0.1 mg/mL de proteína mitocondrial. La adición de citocromo c reducido 30 µM dio inicio a la reacción. La concentración del citocromo c oxidado se determinó mediante su coeficiente de extinción molar redox (ε redox) 19.8 $mM^{-1}cm^{-1}$ a 550 nm aplicando la Ley de Beer.

Ecuación 6

Esquema de reacción de Citocromo C oxidasa.

$$4\ citocromo\ c\ (reducido) + 8H + O_2 \rightarrow 4\ citocromo\ c\ (oxidado) + 4H + 2H_2O$$

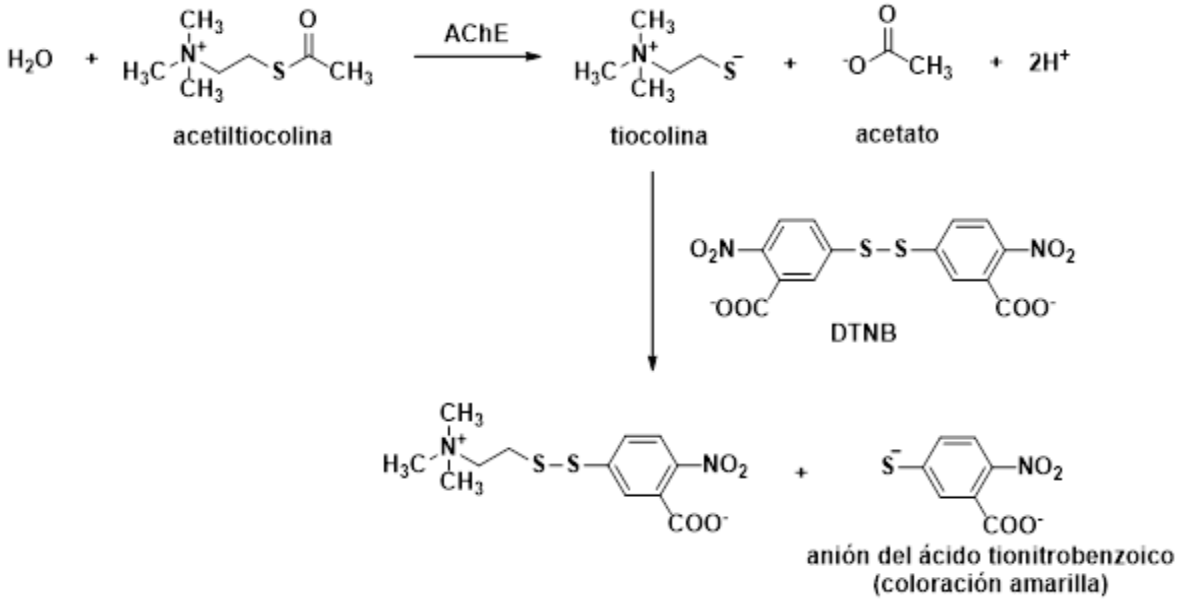
3.5 Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa

El efecto del AE sobre la actividad de la AChE se evaluó mediante el método colorimétrico descrito por Ellman (Ellman 1961). El ensayo mide la tasa de formación de la tiocolina generada por la hidrólisis de acetilcolina, la cual reacciona con el reactivo de Ellman, DTNB (5,5′-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico), teniendo que el cromóforo formado presenta un máximo de absorbancia a 410 nm. La CL50 de cada AE se evaluó en 0,1 mg/mL de proteína mitocondrial en los estados larvarios L3/L4.

Se realizaron tres pruebas independientes por triplicado sobre las larvas homogeneizadas. Para el experimento se utilizaron tampones PBS y la larva homogeneizada se añadió a una placa de 96 pocillos con un volumen final de 200 µL. Se incubó con agitación suave durante 10 min y se añadió el reactivo de Ellman para iniciar la reacción mientras se monitoreaba con un Termo Scientifc™ Fotómetro de microplacas Multiskan™ FC. Los resultados se registraron como la velocidad de reacción máxima.

Figura 14

Reacción de Ellman



Tomado de (Ellman et al., 1961).

3.6 Análisis estadístico

Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado en tres ensayos independientes. Los datos obtenidos fueron registrados en una hoja de datos de Excel discriminada para cada prueba. Los resultados fueron analizados usando GraphPad Prism. Todos los datos tabulados se les aplico estadística descriptiva (promedio, desviación estándar, error) y fueron sujetos a test de normalidad. Todos los datos presentaron distribución normal, se les aplicó un ANOVA y posteriormente un test Tukey. Se estableció la significancia estadística con valores de $p \leq 0.05$

4. Resultados

Para describir un posible mecanismo de acción de los siete aceites esenciales que presentaron actividad larvicida, se evaluó el efecto, sobre dos dianas importantes como; la cadena transportadora de electrones (CTE) mitocondrial y la acetilcolinesterasa.

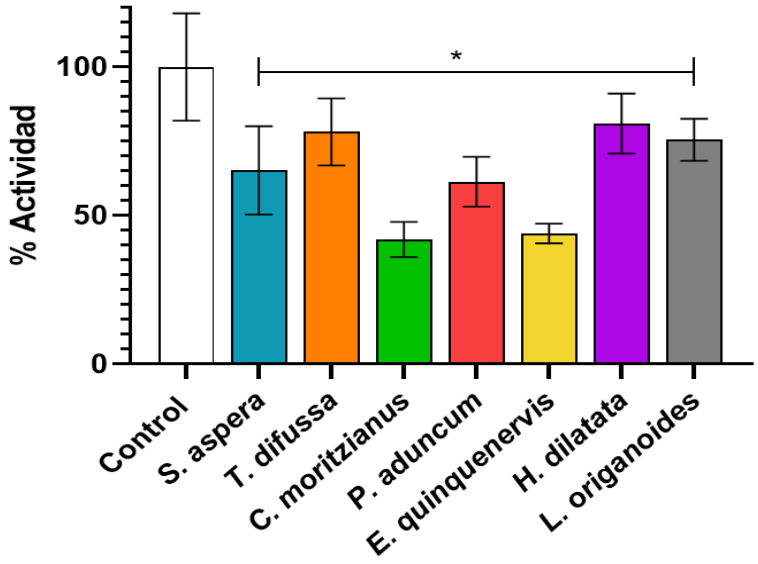
Todos los ensayos se realizaron a partir de larvas de *Aedes aegypti* homogenizadas y se realizaron tres ensayos independientes por triplicado en cada caso.

Inicialmente, se cuantificó el consumo de oxígeno en presencia de cada uno de los aceites en su concentración letal 50 que se determinó en el laboratorio anteriormente (Duque, 2023) con la adición de sustratos oxidables, como lo son el NADH y el succinato, con el fin de evidenciar si presentaban una disminución significativa en la actividad de toda la CTE.

En la Figura 15, se muestra el porcentaje de actividad de la NADH oxidasa para cada uno de los aceites evaluados. Este valor se calculó a partir de la medición del consumo de oxígeno y se expresó sobre la cantidad de proteína (0,1 mg de proteína). Los resultados fueron normalizados con respecto al control que corresponde al 100% de la actividad, el cual tuvo un valor promedio de actividad de 509,62±91,96 (pmol O_2/s*mL) /0,1 mg de proteína, que corresponde a la respiración en presencia del sustrato NADH, sin agregar algún aceite esencial. Todos los aceites presentaron valores inferiores de actividad con respecto al control y al realizar el análisis estadístico, todos los aceites presentaron diferencias significativas. Esto quiere decir, que todos los aceites alteraron la transferencia de electrones a lo largo de la CTE, en presencia de NADH. Como este sustrato se oxida en el complejo I de la CTE, la alteración pudo ocurrir tanto en el complejo I, como el III o el IV.

Figura 15

% de actividad promedio de la NADH oxidasa en presencia de aceites esenciales

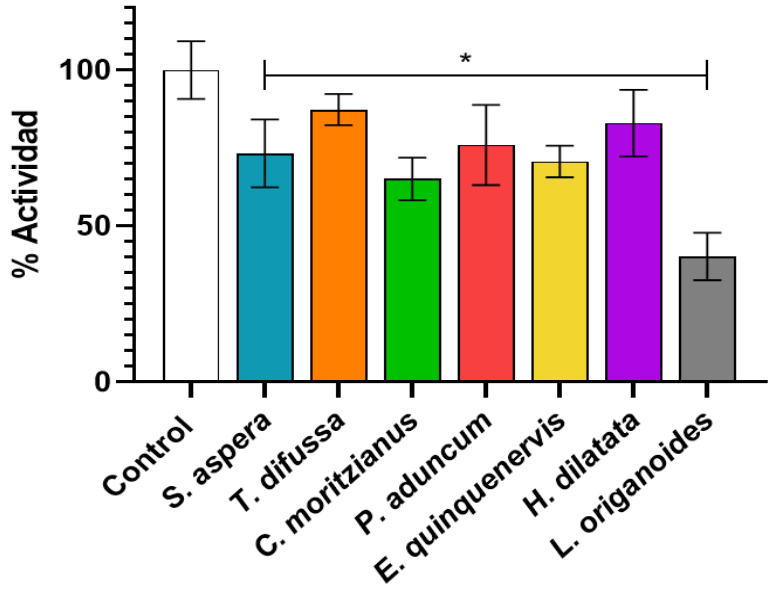


Nota. El control (100%) corresponde a 509,62±91,96 (pmol O2/s*mL) /0,1 mg de proteína. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control $p<0,05$.

En la Figura 16, se presentan los resultados del porcentaje de actividad de la succinato oxidasa en presencia de cada uno de los aceites esenciales evaluados. Los resultados fueron normalizados con respecto al control que corresponde al 100% de la actividad, el cual tuvo un valor promedio de 620,55±57,61 (pmol O_2/s*mL)/0,1 mg de proteína. Se evidencia que todos los aceites presentaron una disminución estadísticamente significativa sobre la actividad de la CTE en presencia del sustrato succinato. Lo cual indica que estos aceites pueden alterar la CTE en los complejos mitocondriales II, III o IV. En la figura también es evidente que el aceite de *L. origanoides* presentó la disminución más importante con respecto a los demás aceites, con una disminución de más del 50% de la actividad.

Figura 16.

% de actividad promedio de la succinato oxidasa en presencia de aceites esenciales



Nota. El control (100%) corresponde a 620,55±57,61(pmol O2/s*mL)/0,1 mg de proteína.

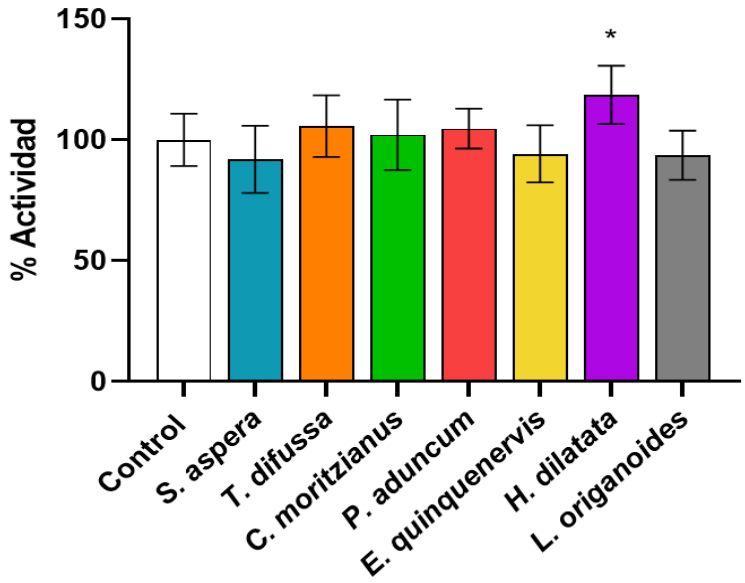
Con base en los resultados de la Figura 15 y la Figura 16, donde todos los aceites presentaron disminución de la actividad sobre algún complejo de la CTE mitocondrial, se realizaron los ensayos sobre los complejos proteicos mitocondriales I y II, que tienen la función de iniciar la transferencia de electrones mediante la oxidación de los sustratos NADH y succinato, de esta manera se puede identificar sobre cual enzima ocurre la alteración específicamente y explicar los resultados anteriores.

La Figura 17 muestra los resultados de la actividad de la NADH deshidrogenasa, en el cual se midió la actividad del complejo I, donde el NADH se oxidó por la acción de este complejo, y los electrones fueron transferidos al ferrocianuro de potasio. El valor promedio para el control fue de 2,52 ± 0,57 mmol del ferrocianuro reducido/min*0,1 mg de proteína. Los valores del % de actividad en presencia de los aceites fueron normalizados con respecto al control. La actividad de

esta enzima solo se vio alterada por la adición del aceite H. dilatata, donde la actividad fue superior a la del control, lo cual indica una tasa más alta de cantidad de ferrocianuro reducido por minuto. Para los demás aceites, la oxidación del NADH presentó un comportamiento similar a la del control, es decir, aunque todos presentaron inhibición al evaluar la NADH oxidasa, no es debido a una alteración sobre el complejo I donde se oxida el NADH.

Figura 17

% de actividad promedio de la NADH deshidrogenasa en presencia de aceites esenciales



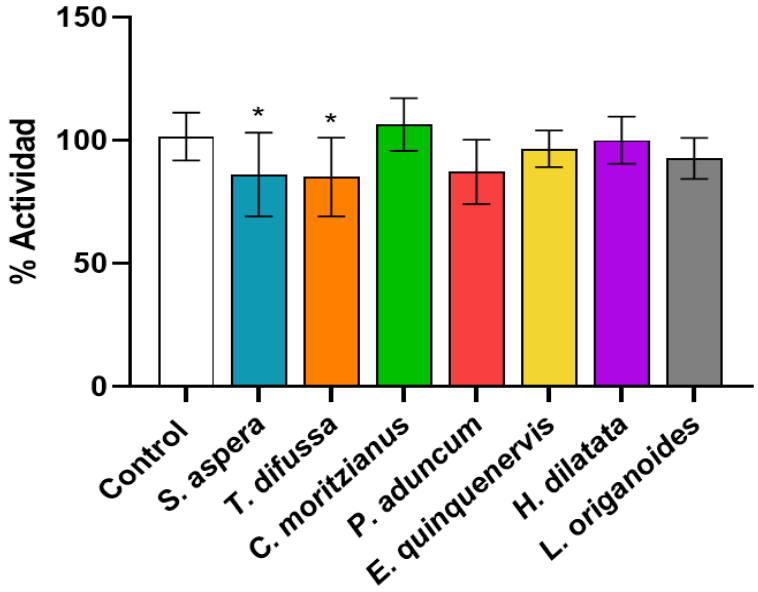
Nota. El control (100%) corresponde a 2,52 ± 0,57 mmol del ferrocianuro reducido/min*mg de proteína. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control $p<0,05$.

En la Figura 18, se muestran los valores del porcentaje de actividad calculado de la succinato deshidrogenasa, que corresponde a la medición de la velocidad de reducción del DCPIP. En este caso, los aceites *S. aspera* y *T. difussa*, presentaron diferencias estadísticas significativas en la actividad de la enzima, reduciendo la actividad con respecto al control, lo cual indica que la presencia de estos aceites altera la oxidación del succinato vía complejo II,

disminuyendo la velocidad de oxidación de dicho sustrato. Los demás aceites no presentaron una alteración de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, con respecto al control, a pesar de haber mostrado una disminución de la actividad.

Figura 18

% de actividad promedio de la succinato deshidrogenasa en presencia de aceites esenciales



Nota. El control (100%) corresponde a 118,46±21,05 µmol de DCPIP reducido/min*mg de proteína. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control p<0,05.

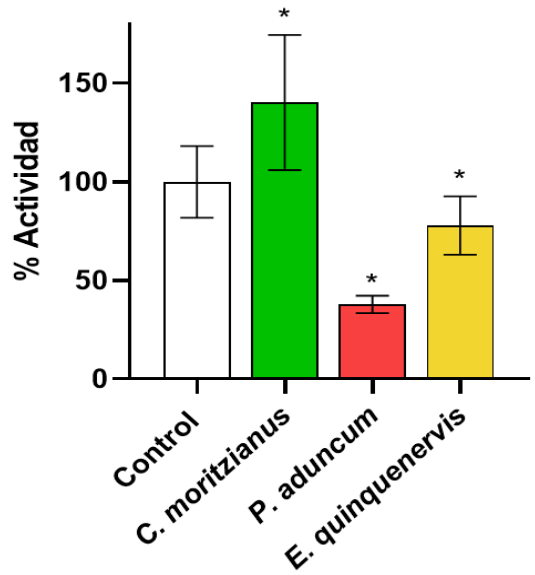
Debido a que todos los aceites alteraron la actividad de la CTE, como se evidenció en la Figura 15 y la Figura 16, algunos de ellos no alteran los complejos donde se oxidan los sustratos NADH y succinato, como es el caso de *C. moritzianus*, *P. aduncum* y *E.quinquenervis*. Por esta razón, se decidió evaluar la actividad del complejo III para estos aceites.

La Figura 19, presenta los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad de la enzima succinato citocromo c reductasa o complejo III mediante la adición del sustrato succinato. La actividad se midió reportando la cantidad de citocromo reducido dependiente del

tiempo. El control que corresponde al 100% de actividad tuvo un valor promedio de 292,81±53,13 µmol de cyt c reducido/min*0,1 mg de proteína. Para los tres aceites se presentó una diferencia estadística significativa con respecto al control, el aceite *C. moritzianus* presentó un aumento de la actividad de la enzima, mientras que los aceites de *P. aduncum* y *E. quinquenervis* presentaron una disminución de la actividad.

Figura 19

% de actividad promedio de la succinato citocromo c reductasa en presencia de aceites esenciales



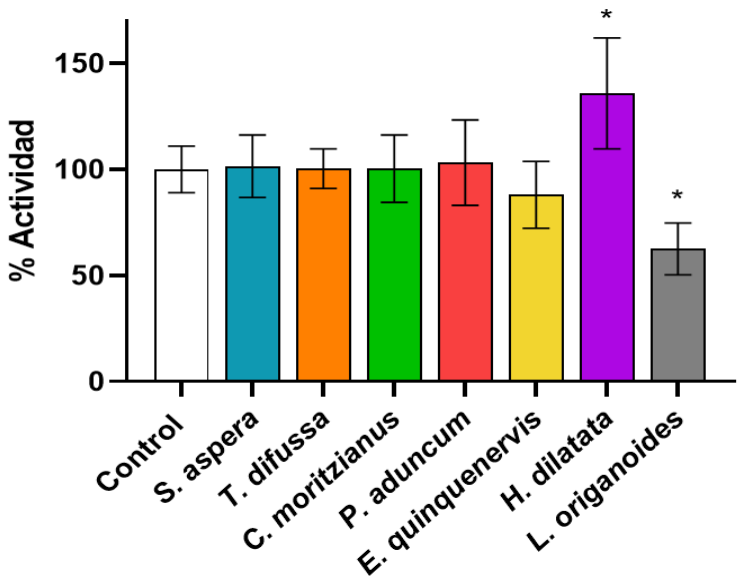
Nota. El control (100%) corresponde a 292,81±53,13 µmol de cyt c reducido/min*0,1 mg de proteína. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control.

En la Figura 20 se presentan los resultados del porcentaje de actividad de la citocromo c oxidasa, que corresponde a la evaluación sobre el complejo IV, donde se mide la cantidad de citocromo c oxidado en la transferencia electrónica a lo largo de la CTE. Los valores de la actividad fueron normalizados con respecto al control, el cual tuvo un valor promedio de

102,60±37,08 µmol cyt c reducido/min*0,1 mg de proteína. Los aceites *H. dilatata* y *L. origanoides* presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto al control. Sin embargo, tuvieron comportamientos diferentes, mientras que el aceite de *H. dilatata* aumentó la actividad de esta enzima, el aceite de *L. origanoides* lo disminuyó casi al 50% de su actividad. También es de resaltar el efecto de *E. quinquenervis* sobre esta enzima, que, aunque estadísticamente no fue diferente, si es visible una ligera disminución de la actividad que puede ser considerada para explicar su efecto sobre la CTE.

Figura 20

% de actividad promedio de la citocromo c oxidasa en presencia de aceites esenciales



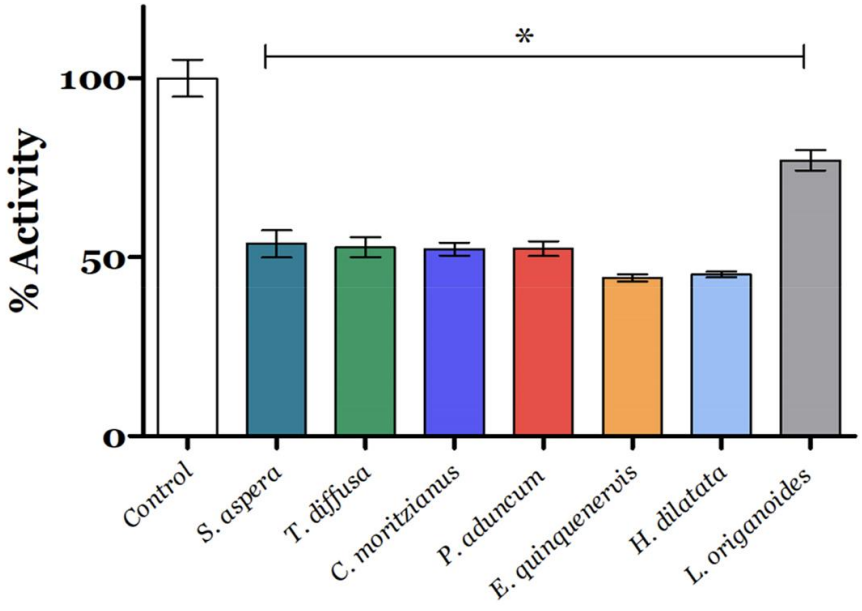
Nota. El control (100%) corresponde a 102,60±37,08 µmol cyt c oxidado/min*0,1 mg de proteína. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control p<0,05.

Adicional a la evaluación del efecto sobre la CTE mitocondrial, también se evaluó el efecto sobre otra diana importante para las sustancias insecticidas y es la acetilcolinesterasa, una enzima implicada en la transmisión de señales nerviosas. En la Figura 21 se presentan los

resultados del porcentaje de actividad de la acetilcolinesterasa de larvas de *Aedes aegypti,* donde el valor del control que corresponde al 100% de la actividad, tuvo un valor promedio de 3,37 nmol de DTNB reducido/min*0,1 mg de proteína. Todos los aceites presentaron una disminución del 50% de la actividad de esta enzima, menos el aceite *L. origanoides.*

Figura 21

Efecto de los aceites esenciales sobre la actividad de la acetilcolinesterasa sobre larvas de Aedes aegypti



Nota. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control p<0,05.

5. Discusión

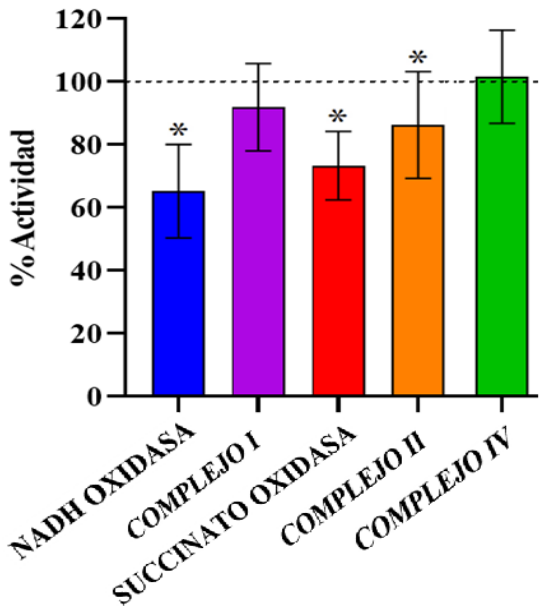
Los resultados del presente trabajo permiten describir el posible mecanismo de acción de siete aceites esenciales evaluados. Estos aceites fueron seleccionados como compuestos larvicidas promisorios debido a que cumplen con el criterio de presentar una mortalidad superior al 75% con una concentración exploratoria de 100 µg/mL. Además, su enfoque se dirige a dianas farmacológicas, como la CTE mitocondrial y la acetilcolinesterasa. El Anexo 1 muestra la composición de los aceites esenciales evaluados en este trabajo (Duque, 2023). A continuación, se analizará cada aceite por individual y se propone un mecanismo de acción para su actividad insecticida sobre *Aedes aegypti.*

Steiractinia aspera.

En trabajos previos en el laboratorio se reportó que el aceite esencial extraído de *S. aspera* presenta actividad larvicida sobre *Aedes aegypti* con CL50 = 42.4 µg/mL a 24 horas de exposición (Duque, J, E,.2023). Con el fin de revisar los resultados que corresponden solo a este aceite, se agruparon los datos previamente presentados. En este caso, la Figura 22 muestra el porcentaje de actividad de las enzimas mitocondriales para el aceite de *S. aspera*. Todos los resultados fueron normalizados con respecto a cada control que se presenta en la gráfica como una línea horizontal punteada en 100%. Al revisar el efecto de este aceite sobre las enzimas de la CTE mitocondrial, se evidenció que existe una alteración sobre la actividad, al igual que para los demás aceites evaluados, sin embargo, para el aceite de *S. aspera* se observó específicamente una disminución de la actividad de la succinato deshidrogenasa o complejo II, donde ocurre la oxidación del succinato a fumarato.

Figura 22

Efecto de Steiractinia aspera sobre la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.



Nota. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control p<0,05 de cada enzima.

Para fundamentar este resultado fue necesario revisar la composición del aceite *Steiractinia aspera* reportada por Duque y colaboradores, la cual se compone de: *α*-pineno (24.9%), β-pineno (14.8%), Germacreno-D (13.1%), β-felandreno (10.1%), α-felandreno (6.3%), Sabineno (4.6%), *p*-cimeno (4.5%), *trans*-β-cariofileno (3.1%), α-copaeno (2.6%) y Limoneno (2.4%) (ver Anexo 1). Sarma y colaboradores en el 2022 mostraron la actividad insecticida del α-pineno y β-pineno contra *Aedes aegypti* en diferentes estadios del insecto (Sarma, 2022). Kiran y Devi (2007) reportaron la actividad insecticida del sesquiterpeno Germacreno D contra *Aedes aegypti.*

Aunque no se ha informado sobre la actividad insecticida del compuesto aislado β-felandreno, en la literatura se encuentran una gran cantidad de aceites esenciales ricos en este

compuesto que han presentado actividad insecticida contra *Aedes aegypti* (Ibin,.2005). Ali et al., (2015), publicaron la actividad del α-felandreno como insecticida contra larvas de *Aedes aegypti* a 24 horas de exposición con un valor de CL90 = 19.3 ppm. Cheng et al., (2013), reportaron la actividad insecticida de los hidrocarburos terpénicos Sabineno y *p*-cimeno con valores de CL50 de 74.1 y 69.4 µg/mL respectivamente, contra larvas de *Aedes* aegypti. Costa et al., (2011) reportaron la actividad biológica de α-copaeno contra *Aedes aegypti*

Vanegas et al., evaluaron el efecto insecticida de los enantiómeros del Limoneno, S-limoneno con una CL50 = 6.4 ppm, y el R-limoneno con una CL50 = 9.86 ppm (Vanegas, T., 2024). La literatura anteriormente presentada, demuestra la actividad insecticida que estos metabolitos secundarios de manera individual aportan al aceite *S. aspera*. La evaluación de este aceite en la CTE mitocondrial Figura 22 produce una disminución en la actividad del complejo II. Por lo que el consumo de oxígeno final que se genera en la mitocondria se verá afectado por la disminución de la oxidación del succinato.

Esto puede sustentarse gracias al estudio desarrollado por Duque et al., (2023), en donde su objetivo fue explorar el posible modo de unión de metabolitos secundarios de planta a las dianas farmacologicas acetilcolinesterasa y la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Para ello, evaluaron las propiedades ADME de los metabolitos presentes en los aceites esenciales, en donde se exploró el modo de unión y el posible efecto inhibidor en el complejo mitocondrial II.

Reportando que el limoneno presentó un puntaje de acoplamiento igual a −5,4 kcal/mol, el cual se propuso en el bolsillo de unión con interacciones hidrofóbicas con los residuos Leu 452-Arg 446 y Ala 96-Ile 101. Así mismos los metabolitos *p*-cimeno (-5.3 kcal/mol), sabineno (-5.0kcal/mol), β-pineno (-4.9 kcal/mol), *trans*-β-cariofileno (-4.6 kcal/mol) y el α-pineno (-4.5

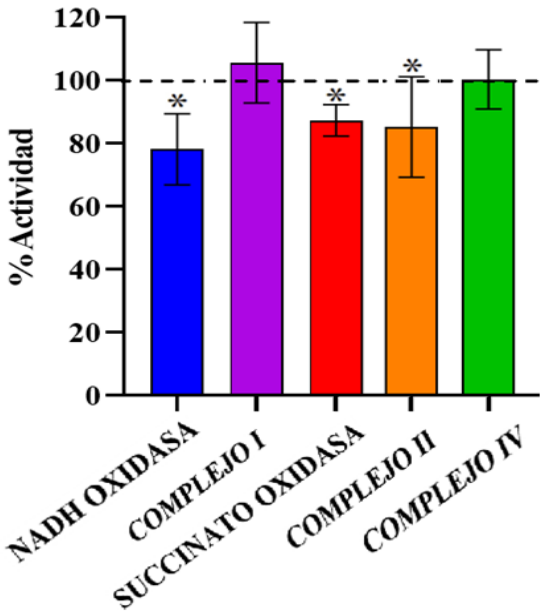
kcal/mol) fueron propuestos como posibles inhibidores del complejo II. Además, realizaron una prueba virtual para explorar la posible actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa presente en los metabolitos secundarios de la planta. Teniendo al *p*-cimeno (-6.9 kcal/mol), Limoneno (-6.6 kcal/mol), *trans*-β-cariofileno (-6.5 kcal/mol), Germacreno-D (-6.4 kcal/mol), β-pineno (-6.4 kcal/mol) y el sabineno (-6.3 kcal/mol). Todos los metabolitos secundarios seleccionados se ubicaron en un bolsillo de unión formado por los residuos de aminoácidos Glu 80-Asn 84, Leu 328-Phe 330, Tyr 370-Asp 375 (Duque, 2023).

Turnera difussa.

El aceite de *T. difussa*, tiene una CL a 24 horas previamente reportada en literatura, de CL50 = 70.9 µg/mL (Duque, J, E,.2023). Este aceite exhibió un comportamiento similar que el aceite de *S. aspera*, es decir, disminuyó la actividad de la cadena transportadora de electrones mediada por la oxidación del NADH y succinato, con respecto al control. Así que al evaluar las enzimas deshidrogenasas para identificar específicamente donde ocurría una alteración, se encontró una disminución de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa. El resultado en este trabajo, muestra que los compuestos del aceite de *T. difussa*, alteran la entrada de electrones vía complejo II de la CTE mitocondrial, como se muestra en la Figura 23.

Figura 23

Efecto de Turnera difussa sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.



Nota. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control p<0,05 de cada enzima.

Al revisar la caracterización de este aceite reportada por Duque y colaboradores, se observa la siguiente composición: Dehidrofuquinona (25%), Aristoloqueno (17.9%), Valenceno (7.4%), β-selineno (5.2%), *trans*-β-cariofileno (4%), β-elemeno (4%), premnaspirodieno (3.7%), guaiol (3.5%), germacra-4,5,10-trien-1-α-ol (3.3%), oxido de cariofileno (3.3%). En la literatura se encuentra muy poca información sobre la actividad insecticida del metabolito Dehidrofuquinona; existe una solicitud de patente del 2013 como compuesto garrapaticida, sin embargo, no existe información que soporte algún mecanismo de acción asociado a su actividad (Gonzáles, 2013).

Soares y colaboradores reportaron el efecto insecticida del Aristoloqueno con una actividad larvicida de 57,82 µg/mL (Maia, 2020). Jirod y colaboradores reportaron que el

Valenceno presenta actividad insecticida contra el vector *Aedes aegypti*. (Nararak, Jirod,.2022). Silva y colaboradores reportaron que los metabolitos β-selineno (CL50 de 136,0 µg/mL) y β-elemeno exhibieron actividad de interacción óptima con las proteínas del mosquito *Aedes aegypti* (J.R., Silva,.2024). Balasubramani y colaboradores, reportaron la actividad insecticida del óxido de β-cariofileno, además, reportaron el acoplamiento de este metabolito con la proteasa NS3. (Blasubramani, 2018).

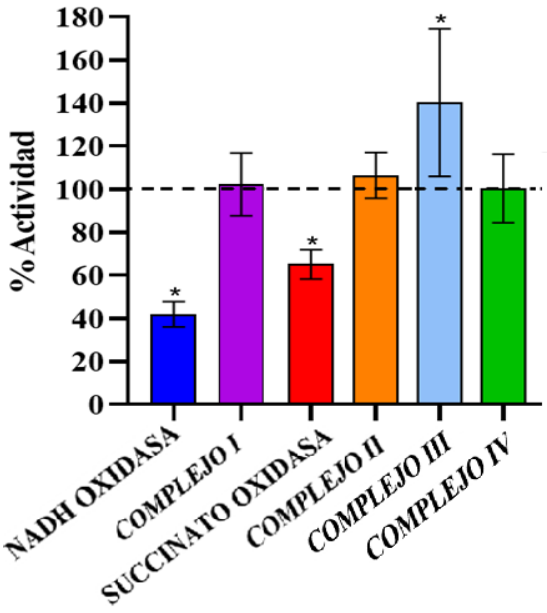
La literatura anteriormente presentada, demuestra la actividad insecticida que estos metabolitos secundarios de manera individual aportan al aceite *T. diffusa.* Para sustentar la disminución en la actividad del complejo II y la acetilcolinesterasa, se toma en cuenta el metabolito *trans*-β-cariofileno, el cual Duque y colaboradores reportaron el posible modo de unión con el acoplamiento molecular a ambas dianas farmacologicas CTE mitocondrial y acetilcolinesterasa, mostrando una posible inhibición por parte del metabolito con valores de Docking score de -4.6 y -6.5 kcal/mol respectivamente (Duque, 2023).

Calycolpus moritzianus.

El aceite esencial de *C. moritzianus*, se reportó con una CL50 = 55,8 µg/mL a 24 h de exposición contra larvas de *Aedes aegypti* (Duque, 2023).

Figura 24

Efecto de Calycolpus moritzianus sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.



Nota. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control p<0,05 de cada enzima.

Para hacer una revisión más detallada de la actividad de este aceite, se revisó su caracterización donde se indicó que sus componentes fueron: 1,8-cineol (19.1%), limoneno (17.6%), *trans*-β-cariofileno (6.3%), viridiflorol (5.7%), *α*-pineno (5.1%), trans, trans-genaril linalol (4%), trans-nerolidol (3.5%), α-copaeno (3.2%), Selina-3,7(11)-diene (2.8%). Oliveira y colaboradores presentaron en su estudio la actividad larvicida del metabolito 1,8-cineol (Oliveria, 2013).

Este aceite logró disminuir la actividad de la NADH oxidasa en más de un 50%. Esto podría sugerir una alteración sobre alguna enzima de la cadena transportadora de electrones. Sin embargo, al evaluar las enzimas deshidrogenasas que se encargan de la oxidación de sustratos para iniciar la transferencia electrónica, no se encontró alguna alteración de su actividad frente a

la exposición de este aceite (ver Figura 24). Por lo que fue necesario evaluar una enzima adicional, la citocromo c reductasa mediada por la adición de succinato, también conocido como complejo III. En este caso se presentó una alteración al aumentar su actividad con respecto al control. Según la metodología empleada, este ensayo mide la velocidad de reducción del citocromo c, es decir, el aceite alteró la velocidad de transferencia electrónica en el complejo III aumentando la velocidad de reducción del citocromo c.

Frente a este resultado se puede plantear una hipótesis, puesto que el citocromo puede reducirse cuando están presentes radicales libres, como el radical aniónico superóxido, que se ha reportado anteriormente en literatura, donde se generan estas especies cuando un xenobiótico ingresa en un insecto, la sobreproducción de estas moléculas actúa como un agente reductor de complejos de hierro, justo como el que se encuentra en el citocromo c. Con base en lo anterior, se puede justificar el resultado obtenido de la actividad de esta enzima. También es posible que se hayan efectuado otras alteraciones no evaluadas en este trabajo que pudieran justificar con más claridad una disminución significativa de la actividad de la NADH y succinato oxidasa (Phaniendra, 2015; Poiani, 2023).

Además, Duque y colaboradores realizaron una prueba virtual para explorar la posible actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa de los metabolitos secundarios de la planta. Teniendo al Limoneno (-6.6 kcal/mol), *trans*-β-cariofileno (-6.5 kcal/mol), y el viridiflorol (-6.5 kcal/mol). Todos los metabolitos secundarios seleccionados se ubicaron en un bolsillo de unión formado por los residuos de aminoácidos Glu 80-Asn 84, Leu 328-Phe 330, Tyr 370-Asp 375 (Duque, J, E,.2023).

Piper aduncum

La CL50 de este aceite fue reportada con un valor de 61,9 µg/mL a 24 horas de exposición. (Duque, 2023). El efecto sobre las enzimas de la CTE mitocondrial se compara en la Figura 25. Se evidenció una disminución de la actividad estadísticamente significativa de la NADH y succinato oxidasa, y a partir de este resultado se siguió el análisis con las enzimas deshidrogenasas con el fin de evidenciar si esta alteración se debía a una intervención sobre la primera etapa de oxidación del NADH y succinato, pero los resultados de estas dos enzimas no se vieron alterados.

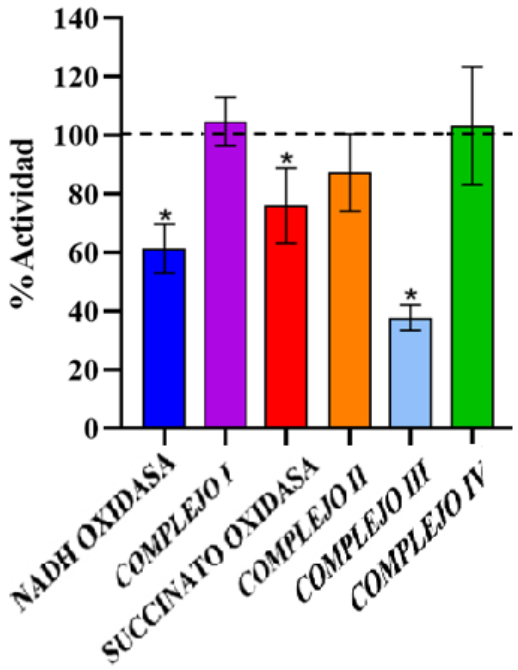
Finalmente, al evaluar la actividad de la succinato citocromo c reductasa o complejo III, se evidenció una disminución mayor al 50% de la actividad, este resultado explica la alteración de la actividad de toda la CTE mitocondrial, ya que altera el paso de electrones a través del complejo III, una etapa donde se captan electrones provenientes de la oxidación de sustratos en el complejo I y II, para llevarlos al citocromo c.

Para hacer una revisión más detallada de la actividad de este aceite, se revisó su caracterización donde se indicó que sus componentes fueron: Piperitona (14.8%), *trans*-β-cariofileno (7.4%), viridiflorol (6.5%), limoneno (6%), δ-cadineno (5.5%), *α*-pineno (4.6%), *α*-felindreno (4.4%), oxido de cariofileno (3.8%), 1,8-cineol (3.6%), *p*-cimeno (3.0%). La actividad larvicida de este aceite ya ha sido reportada previamente en literatura, en el 2013 Oliveira et al., (2013) reportaron una CL50 = 289.9 ppm, significativamente mayor con respecto a la reportada para el aceite evaluado en este trabajo, sin embargo, Oliveira cita que este aceite particularmente resultó con una composición diferente, donde su componente mayoritario fue el 1,8-cineol en un 53,6%. Así pues, los aceites esenciales tienen una composición variable que depende de factores externos y no puede ser comparada la actividad biológica, ya que esta dependerá estrictamente de su composición.

Durofil y colaboradores ya habían afirmado la gran variabilidad de la composición de este aceite, la cual depende del origen de la planta y otros factores externos (Durofil, A., 2021).

Figura 25

Efecto de Piper aduncum sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.



Nota. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control p<0,05 de cada enzima.

La evaluación de este aceite en la CTE mitocondrial Figura 25 produce una disminución en la actividad del complejo III, teniendo que la velocidad con la que se reduce el citocromo c disminuye en presencia del aceite. Esto puede sustentarse gracias al estudio desarrollado por Duque y colaboradores, en donde se realizó un cribado virtual de los metabolitos secundarios. Mostrando el *p*-cimeno (-6.6 kcal/mol), Limoneno (-6.4 kcal/mol), *α*-pineno (-6.0 kcal/mol), *trans*-β-cariofileno (-4.7 kcal/mol) como inhibidores del complejo mitocondrial III.

Los resultados de acoplamiento en este trabajo sugieren que los metabolitos seleccionados se localizaron y estabilizaron mediante interacciones hidrofóbicas en un bolsillo formado por los residuos Phe 129-Met 125, Phe 275 Leu 282 y Val 146-Leu 150. Además, Duque y colaboradores realizaron una prueba virtual para explorar la posible actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa de los metabolitos secundarios de la planta. Teniendo como inhibidores los metabolitos: *p*-cimeno (-6.9 kcal/mol), Limoneno (-6.6 kcal/mol), viridiflorol (-6.5%), *trans*-β-cariofileno (-6.5 kcal/mol), Todos los metabolitos secundarios seleccionados se ubicaron en un bolsillo de unión formado por los residuos de aminoácidos Glu 80-Asn 84, Leu 328-Phe 330, Tyr 370-Asp 375 (Duque, 2023).

Elaphandra quinquenervis.

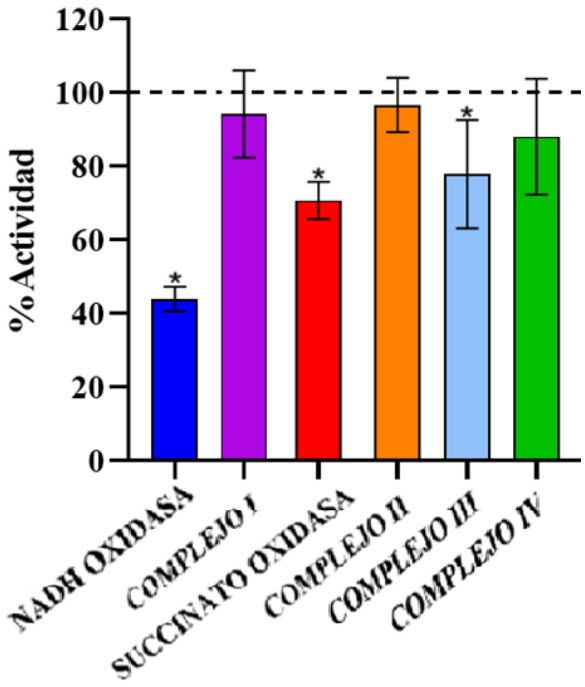
La actividad insecticida del aceite esencial de *E. quinquenervis* fue reportada a las 24 h con una CL50 = 59,8 µg/mL (Duque, J, E,.2023). Este aceite tuvo una disminución significativa sobre la actividad de la NADH oxidasa, la cual presentó una disminución de más del 50%, también disminuyó la actividad de la succinato oxidasa, como se muestra en la Figura 26. Las enzimas citocromo c oxidasa, NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa no presentaron alteración a esta concentración del aceite con respecto al control, sin embargo, al evaluar la actividad de la succinato citocromo c reductasa o complejo III, se encontró una disminución de la velocidad de reducción del citocromo c.

Basados en estos resultados es posible justificar la alteración de la actividad de toda la CTE, por una disminución en la transferencia electrónica en el complejo III, donde los electrones provenientes del complejo I y II, ya sea oxidando NADH o succinato, respectivamente, allí son transferidos hacia el citocromo c. La caracterización del aceite evaluado en este trabajo se

describió en el artículo publicado por Duque y colaboradores, la tabla de la composición se encuentra en el Anexo 1. Los metabolitos de este aceite fueron: Germacreno-D (20.7%), α-felandreno (9.1%), α-pineno (6.8%), trans-β-cariofileno (5.1%), Δ3-careno (4.9%), limoneno (4.5%), β-cubeno (3.5%), α-humuleno (2.6%), premnaspirodieno (2.6%), δ-cadieno (2.6%). Lee y colaboradores, determinaron que el Δ3-careno presenta actividad insecticida contra el vector *Aedes aegypti*, con una CL50= 12.10 mg/L. Además, reportaron que este metabolito, inhibía la AChE (IC50 < 2 mM). (D., Lee,.2013.).

Figura 26

Efecto de Elaphandra quinquenervis sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.



Nota. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control p<0,05 de cada enzima.

La evaluación de este aceite en la CTE mitocondrial Figura 26 produce una disminución en la actividad del complejo III. Teniendo que la velocidad con la que se reduce el citocromo c disminuye en presencia del aceite. Duque y colaboradores, realizaron un cribado virtual de los metabolitos secundarios. Mostrando el Limoneno (-6.4 kcal/mol), *α*-pineno (-6.0 kcal/mol), Δ3-careno (-6.0%), *trans*-β-cariofileno (-4.7 kcal/mol) como inhibidores del complejo mitocondrial III. Los resultados de acoplamiento en este trabajo sugieren que los metabolitos seleccionados se localizaron y estabilizaron mediante interacciones hidrofóbicas en un bolsillo formado por los residuos Phe 129-Met 125, Phe 275 Leu 282 y Val 146-Leu 150.

Además, Duque y colaboradores exploraron la posible actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa de los metabolitos secundarios de la planta. Teniendo al Limoneno (-6.6 kcal/mol), *trans*-β-cariofileno (-6.5 kcal/mol), el Germacreno-D (-6.4 kcal/mol) y el Δ3-careno (-6.6 kcal/mol). Todos los metabolitos secundarios seleccionados se ubicaron en un bolsillo de unión formado por los residuos de aminoácidos Glu 80-Asn 84, Leu 328-Phe 330, Tyr 370-Asp 375 (Duque, 2023).

Hyptis dilatata.

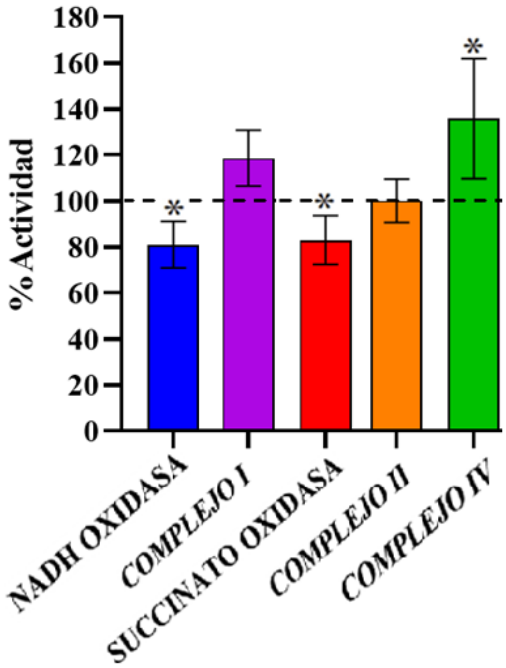
La actividad larvicida contra *Aedes aegypti* del aceite esencial extraído de *H. dilatata*, se reportó con un valor de CL50 = 61.1 µg/mL (Duque, 2023). Este aceite, presentó una disminución de la actividad de la CTE mitocondrial. Para proponer un posible mecanismo de acción se evaluó la actividad de estas enzimas y los resultados se agruparon en la Figura 27. El resultado que más resalta de la gráfica fue el obtenido para la citocromo c oxidasa o complejo IV, su actividad se incrementó con respecto al control que se presenta como una línea horizontal punteada. El complejo IV, el último complejo proteico de la CTE mitocondrial, recibe los

electrones a través del citocromo c, en este ensayo se mide la velocidad de oxidación del citocromo, cuando los electrones son transferidos al complejo IV.

Para una revisión detallada del posible mecanismo de acción, es necesario buscar la composición del aceite, en donde Duque y colaboradores reportaron los metabolitos, trans-β-cariofileno (20.2%), alcanfor (16.1%), 3-Δcareno (15.5%), α-pineno (10.5%), palustrol (8.7%), α-gurjuneno (4.7%), ledol (3.4%), limoneno (2.4%), canfeno (1.7%), viridiflorol (1.5%) y aromadendreno (1.5%) (ver Anexo 1).

Figura 27

Efecto de Hyptis dilatata sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.



Nota. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control p<0,05 de cada enzima.

Duque y colaboradores analizaron las interacciones del trans-β-Cariofileno con las enzimas de la CTE mitocondrial y encontraron que este metabolito tiene una alta energía de afinidad con el complejo I, en la subunidad ND5, como se describió anteriormente en este trabajo, pero adicionalmente también se reportó una interacción con el complejo IV, que podría explicar esta alteración de la actividad en la citocromo c oxidasa. En literatura aún no se reportan estudios sobre posibles mecanismos de acción para los metabolitos mayoritarios de este aceite esencial. Lo cual significa que en este trabajo se explica por primera vez la forma de interacción de este aceite que tiene actividad insecticida (Duque, 2023).

Además, Duque y colaboradores exploraron la posible actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa de los metabolitos secundarios de la planta. Teniendo al Limoneno (-6.6 kcal/mol), *trans*-β-cariofileno (-6.5 kcal/mol), Δ3-careno (-6.6 kcal/mol) y viridiflorol (-6.5 kcal/mol). Todos los metabolitos secundarios seleccionados se ubicaron en un bolsillo de unión formado por los residuos de aminoácidos Glu 80-Asn 84, Leu 328-Phe 330, Tyr 370-Asp 375 (Duque, 2023).

***Lippia origanoides (*Quimiotipo carvacrol + *p*-cimeno).**

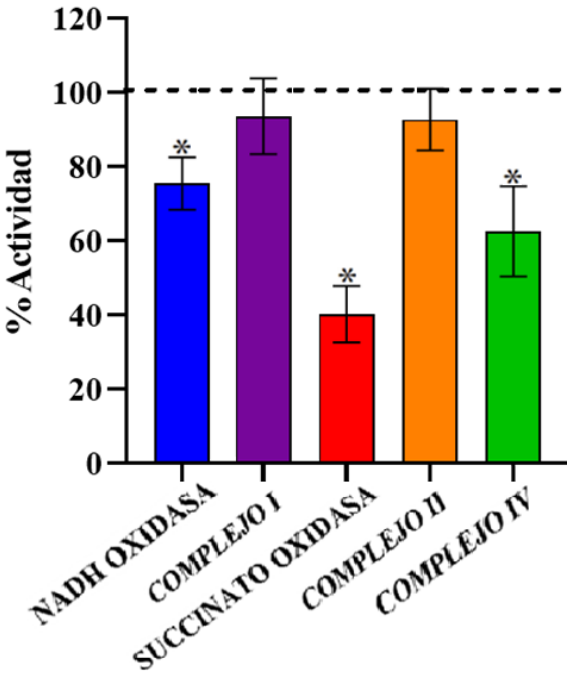
La actividad insecticida del aceite esencial de *L. origanoides* (Quimiotipo carvacrol + *p*-cimeno) se reportó a 24 h de exposición CL50 = 73,29 µg/mL. (Duque, J, E,.2023). En el estudio del efecto sobre la CTE mitocondrial de este trabajo, se evidenció una disminución significativa de la actividad de las enzimas oxidasas con respecto al control, como se muestra en la Figura 28.

Estos resultados indican alteraciones sobre la CTE mitocondrial y se especifica el lugar de una posible inhibición del complejo IV con el resultado de disminución de la actividad del citocromo c oxidasa. Sus metabolitos según Duque y colaboradores fueron el Carvacrol (35%),

p-cimeno (14.4%), Timol (8.0%), γ-terpineno (5.3%), trans-β-cariofileno (4.4%), β-mirceno (carvacrol +p-cimeno) (2.4%), calvacrol acetato (2.0%), timol metil eter (1.9%) α-terpineno (1.7%). La caracterización de este aceite se adjunta en el Anexo 1. El **carvacrol** ha sido reportado en literatura como un excelente insecticida de origen natural (Natal, CM,. 2021; Park, JH,. 2017; Silva, VB,. 2017). Lee y colaboradores, determinaron que el **Timol** y el **γ-terpineno** presenta actividad insecticida contra el vector *Aedes aegypti*, con una CL50 de 11.72 y 20.47 mg/L respectivamente.

Figura 28

Efecto de Lippia origanoides sobre la actividad de las enzimas de la CTE mitocondrial de larvas de Aedes aegypti.



Nota. *Diferencias estadísticas significativas con respecto al control p<0,05 de cada enzima.

La disminución de la actividad se puede sustentar gracias a la inhibición que presentan los metabolitos de este aceite sobre el complejo IV. Duque y colaboradores reportaron que el carvacrol (-3.9 kcal/mol), el trans-β-cariofileno (-3.9 kcal/mol), p-cimeno (-3.6 kcal/mol) y el timol (-3.6 kcal/mol) pueden estar involucrados en la inhibición del transporte de electrones desde el citocromo c al oxígeno a través del complejo IV. Todos los compuestos encontrados con posible actividad inhibidora en el complejo IV se ubicaron en un bolsillo de unión estabilizado por interacciones hidrofóbicas con los residuos de aminoácidos Ala 70-Lys 81; Además, el carvacrol estaba realizando una interacción de enlace de hidrógeno entre su grupo hidroxilo y el residuo de aminoácido Ala 70.

Además, Duque et al., (2013) y colaboradores exploraron la posible actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa de los metabolitos secundarios de la planta. Teniendo al el Carvacrol (-6.8 kcal/mol), *p*-cimeno (-6.9 kcal/mol), γ-terpineno (-6.8 kcal/mol), trans-β-cariofileno (-6.5 kcal/mol). Todos los metabolitos secundarios seleccionados se ubicaron en un bolsillo de unión formado por los residuos de aminoácidos Glu 80-Asn 84, Leu 328-Phe 330, Tyr 370-Asp 375.

6. Conclusiones

Los aceites esenciales extraídos de plantas nativas de Colombia que se reportan con actividad insecticida contra larvas de *Aedes aegypti* en el presente trabajo, presentaron alteraciones sobre la CTE mitocondrial y todos inhibieron la actividad de la acetilcolinesterasa que da una explicación de su mortalidad. El aceite extraído de *S. aspera* es un larvicida de *Aedes aegypti* que altera el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, esto debido a la inhibición del complejo II, la cual posiblemente se atribuye a un efecto de los metabolitos, limoneno, p-cimeno, sabineno, β-pineno, trans-β-cariofileno y el α-pineno.

El aceite de *T. difussa* también presentó una inhibición sobre el complejo II de la CTE mitocondria, la cual se le podría atribuir a su metabolito trans-β-cariofileno. El aceite extraído de *C. moritzianus,* altera la actividad del succinato citocromo c reductasa, posiblemente por la presencia de especies reactivas de oxígeno. El aceite *P. aduncum* presentó inhibición de la actividad del succinato citocromo c reductasa en más de un 50%. Esta reducción pudo dar por la presencia de los metabolitos p-cimeno, Limoneno, α-pineno, trans-β-cariofileno. El aceite de *E. quinquenervis* indicó que su posible mecanismo de acción es una inhibición sobre la CTE mitocondrial, no obstante, los ensayos realizados sobre las enzimas individualmente no fueron concluyentes sobre la inhibición de una enzima en particular.

El aceite esencial de *H. dilatata*, presentó una leve estimulación significativa de la actividad del citocromo c oxidasa (complejo IV). Finalmente, para la mortalidad del aceite de *L. origanoides quimiotipo* carvacrol, se puede describir una inhibición de más del 50% de la actividad del succinato oxidasa como su mecanismo de acción, sumado a una inhibición del 40% de la actividad del citocromo c oxidasa. Además, todos los aceites inhibieron la enzima acetilcolinesterasa. Los resultados del presente trabajo demuestran un posible mecanismo de

acción basado en la alteración de la actividad mitocondrial y la acetilcolinesterasa, mostrando a estos aceites como promisorios insecticidas dado que presentan un efecto ‘multi target’, no obstante, existen otras dianas farmacológicas que pueden considerarse en futuros trabajos para comprender de una manera más amplia su acción tóxica sobre *Aedes aegypti.*

Referencias

Aguirre-Obando, O. A., Dalla Bona, A. C., Duque L, J. E., & Navarro-Silva, M. A. (2015). Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Zoología*, *32*(1), 14-22. https://doi.org/10.1590/S1984-46702015000100003

Alphey, Luke; McKemey, Andrew; Nimmo, Derric; Neira Oviedo, Marco; Lacroix, Renaud; Matzen, Kelly; Beech, Camilla (2013). *Genetic control of Aedes mosquitoes. Pathogens and Global Health, 107(4), 170–179.* doi:10.1179/2047773213Y.0000000095

Ali A, Tabanca N, Ozek G, Ozek T, Aytac Z, Bernier UR, Agramonte NM, Baser KH, Khan IA. *Essential Oils of Echinophora lamondiana (Apiales: Umbelliferae): A Relationship Between Chemical Profile and Biting Deterrence and Larvicidal Activity Against Mosquitoes (Diptera: Culicidae).* J Med Entomol. 2015 Jan;52(1):93-100. doi: 10.1093/jme/tju014. PMID: 26336285.

Azucena González C., Matías Reina A., Ángeles Sonia O (2013). USO DE SESQUITERPENOS EREMOFILANOS COMO GARRAPATICIDAS ES 2 489 298 A1. Spain: OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS.

Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, *256*(12), 2166–2174. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008

Balasubramani, S., Sabapathi, G., Moola, A. K., Solomon, R. V., Venuvanalingam, P., & Bollipo Diana, R. K. (2018). *Evaluation of the Leaf Essential Oil from Artemisia vulgaris and Its Larvicidal and Repellent Activity against Dengue Fever Vector Aedes aegypti—An Experimental*

and Molecular Docking Investigation. ACS Omega, 3(11), 15657–15665. doi:10.1021/acsomega.8b01597

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). *Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 46(2), 446–475.* doi:10.1016/j.fct.2007.09.10

Bennett, R. N., & Wallsgrove, R. M. (1994). Tansley Review No. 72 Secondary metabolites in plant defence mechanisms. In *Vm Phytol* (Vol. 127).

Blitvich, B. (2016). Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. Nikos Vasilakis and Duane J. Gubler. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *95*(2), 488–489. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0281

Borrero Landazabal, M. A., Carreño Otero, A. L., Kouznetsov, V. v., Duque Luna, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2018). Alterations of mitochondrial electron transport chain and oxidative stress induced by alkaloid-like α-aminonitriles on Aedes aegypti larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *144*, 64–70. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.006

Borrero-Landazabal, M. A., Duque, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2020). Model to design insecticides against Aedes aegypti using in silico and in vivo analysis of different pharmacological targets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, *229*. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108664

Braga, I.A.; Valle, D. Aedes aegypti: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiol. Serv. Saúde 2007, 16, 279–293.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 72).

Campbell-Lendrum, D., Manga, L., Bagayoko, M., & Sommerfeld, J. (2015). Climate change and vector-borne diseases: What are the implications for public health research and policy? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1665), 1–8. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0552

Carreño Otero, Aurora L.; Vargas Méndez, Leonor Y.; Duque L., Jonny E.; Kouznetsov, Vladimir V. (2014). *Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girgensohnine analogs on Aedes aegypti, vector of dengue fever. European Journal of Medicinal Chemistry, 78(), 392–400.* doi:10.1016/j.ejmech.2014.03.067

Castillo-Morales, R. M., Carreño Otero, A. L., Mendez-Sanchez, S. C., da Silva, M. A. N., Stashenko, E. E., & Duque, J. E. (2019). Mitochondrial affectation, DNA damage and AChE inhibition induced by Salvia officinalis essential oil on Aedes aegypti larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, *221*, 29–37. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.006

Costa EV, Dutra LM, de Jesus HCR, et al. Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oils of Annona Salzmannii and A. pickelii (Annonaceae). *Natural Product Communications*. 2011;6(6). doi:10.1177/1934578X1100600636

Colón-González, F. J., Peres, C. A., Steiner São Bernardo, C., Hunter, P. R., & Lake, I. R. (2017). After the epidemic: Zika virus projections for Latin America and the Caribbean. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(11). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006007

Cruz González Julietthe. (2017). *EVALUACIÓN DEL EFECTO LARVICIDA DE BORRA DE CAFÉ SOBRE*.

Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L. M., Guimarães, K. P., Benazzato, C., Almeida, N., Pignatari, G. C., Romero, S., Polonio, C. M., Cunha, I., Freitas, C. L., Brandaõ, W. N., Rossato, C., Andrade, D. G., Faria, D. D. P., Garcez, A. T., Buchpigel, C. A., … Beltrao-Braga, P. C. B. B. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, *534*(7606), 267–271.

Cheng, S. S., Lin, C. Y., Chung, M. J., Liu, Y. H., Huang, C. G., & Chang, S. T. (2013). *Larvicidal activities of wood and leaf essential oils and ethanolic extracts from Cunninghamia konishii Hayata against the dengue mosquitoes. Industrial Crops and Products, 47, 310–315.* doi:10.1016/j.indcrop.2013.03.016

Chaudhari, A. K., Singh, V. K., Kedia, A., Das, S., & Dubey, N. K. (2021). *Essential oils and their bioactive compounds as eco-friendly novel green pesticides for management of storage insect pests: prospects and retrospects. Environmental Science and Pollution Research, 28(15), 18918–18940.* doi:10.1007/s11356-021-12841-w

David, J.-P.; Ismail, H. M.; Chandor-Proust, A.; Paine, M. J. I. (2013). Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 368(1612), 20120429–20120429. doi:10.1098/rstb.2012.0429

De la Rosa, C., Torres, C., Camacho, O., Calderon, Z., Herrera, E. & Osorio, O. Cuantificación de flavonoides totales en el extracto metanólico de Glucinemax (Soya) y su efecto larvicida contra *Aedes aegypti*. 2012. Revista Colombiana de Ciencias de la Salud. 1 (1): 39-43.

Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 11, pp. 870–879). https://doi.org/10.1038/nrm2275

Devine, G. J., Eza, D., Ogusuku, E., & Furlong, M. J. (2008). USO DE INSECTICIDAS: CONTExTO Y CONSECUENCIAS ECOLÓGICAS* INSECTICIDE USE: CONTExT AND ECOLOGICAL CONSEQUENCES. In *Rev Peru Med Exp Salud Publica* (Vol. 25, Issue 1).

Dharmagadda, V. S. S., Naik, S. N., Mittal, P. K., & Vasudevan, P. (2005). Larvicidal activity of Tagetes patula essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology*, *96*(11), 1235–1240. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.020

Dias, C. N., Alves, L. P. L., Rodrigues, K. A. D. F., Brito, M. C. A., Rosa, C. D. S., Amaral, F. M. M. do, Monteiro, O. D. S., Andrade, E. H. D. A., Maia, J. G. S., & Moraes, D. F. C. (2015). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian legal AMAZOn plants against Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/490765

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

Diniz, M. M. C. de S. L., Henriques, A. D. da S., Leandro, R. da S., Aguiar, D. L., & Beserra, E. B. (2014). Resistance of Aedes aegypti to temephos and adaptive disadvantages. *Revista de Saude Publica*, *48*(5), 775–782. https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048004649

Dirk M. Elston (2004). Prevention of arthropod-related disease., 51(6), 0–954. doi:10.1016/j.jaad.2004.06.011

Durofil A, Radice M, Blanco-Salas J, Ruiz-Téllez T. *Piper aduncum essential oil: a promising insecticide, acaricide and antiparasitic. A review. Parasite.* 2021; 28:42. doi:10.1051/parasite/2021040.

Duque JE, Urbina DL, Vesga LC, Ortiz-Rodríguez LA, Vanegas TS, Stashenko EE, Mendez-Sanchez SC. *Insecticidal activity of essential oils from American native plants against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae): an introduction to their possible mechanism of action.* Feb 20;13(1):2989. doi: 10.1038/s41598-023-30046-8.

Elumalai, K., Dhanasekaran, S., Anandan, A., Krishnappa, K., Gokulakrishnan, J., Elangovan, A., 2012. Larvicidal, ovicidal and pupicidal activity of Eranthemum roseum (Vahl) R.BR. against malarial vector mosquito, Anopheles stephensi (Liston) (Diptera: Culicidae). Int. J. Curr. Agric. Sci. 2, 28–33.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 7). Pergamon Press Ltd.

Ferreira, L. G., dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. In *Molecules* (Vol. 20, Issue 7, pp. 13384–13421). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules200713384

Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(7), 1739–1749. https://doi.org/10.1021/jm0306430

Gao, X., Wen, X., Esser, L., Quinn, B., Yu, L., Yu, C. A., & Xia, D. (2003). Structural basis for the quinone reduction in the bc1 complex: A comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Qi site. *Biochemistry*, *42*(30), 9067–9080. https://doi.org/10.1021/bi0341814

Geris, R., Ribeiro, P. R., da Silva Brandão, M., da Silva, H. H. G., & da Silva, I. G. (2012). Bioactive natural products as potential candidates to control Aedes aegypti, the vector of dengue. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 37, pp. 277–376). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59514-0.00010-9

Grisales, N., Poupardin, R., Gomez, S., Fonseca-Gonzalez, I., Ranson, H., & Lenhart, A. (2013). Temephos Resistance in Aedes aegypti in Colombia Compromises Dengue Vector Control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002438

Gomes da Rocha Voris, Diego;Santos Dias, Luciana; Alencar Lima, Josélia;Santos Cople Lima, Keila; Pereira Lima, José Bento;Santos Lima, Antônio Luís (2018). *Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of Illicium verum Hook. f., Pimenta dioica (L.) Merr., and Myristica fragrans Houtt. against Zika virus vectors. Environmental Science and Pollution Research.* doi:10.1007/s11356-018-2362-y

Gué Nebaut, V., Vincentelli, R., Mills, D., Weiss, H., & Leonard, K. R. (1997). *Three-dimensional Structure of NADH-dehydrogenase from Neurospora crassa by Electron Microscopy and Conical Tilt Reconstruction*.

Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(7), 1750–1759. https://doi.org/10.1021/jm030644s

Hemingway, Janet; Ranson, Hilary (2000). *Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. Annual Review of Entomology, 45(1), 371–391.* doi:10.1146/annurev.ento.45.1.371

Her, Y. F., & Maher, L. J. (2015). Succinate dehydrogenase loss in familial paraganglioma: Biochemistry, genetics, and epigenetics. In *International Journal of Endocrinology* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. https://doi.org/10.1155/2015/296167

Hilary Ranson; Raphael N'Guessan; Jonathan Lines; Nicolas Moiroux; Zinga Nkuni; Vincent Corbel (2011). *Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control?. , 27(2), 91–98.* doi:10.1016/j.pt.2010.08.004

Isman, Murray B (2015). *A renaissance for botanical insecticides?. Pest Management Science, 71(12), 1587–1590.* doi:10.1002/ps.4088

Ishaaya, I., Horowitz, A. R., & Nauen, R. (Eds.). (2007). Insecticides Design Using Advanced Technologies. doi:10.1007/978-3-540-46907-0

10.1007/978-3-540-46907-0

Iwamura, T., Guzman-Holst, A., & Murray, K. A. (2020). Accelerating invasion potential of disease vector Aedes aegypti under climate change. *Nature Communications*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-16010-4

Jantan Ibin, Yalvema MF, Ahmad NW, Jamal JA. *Insecticidal activities of the leaf oils of eight Cinnamomum species against Aedes aegypti and Aedes albopictus.* Pharm Biol. 2005;43(6):526-532.

Jirod Nararak, Carole Di Giorgio, Kanutcharee Thanispong, Chutipong Sukkanon, Unchalee Sanguanpong, Valerie Mahiou-Leddet, Evelyne Ollivier, Theeraphap Chareonviriyaphap, Sylvie Manguin, *Behavioral avoidance and biological safety of vetiver oil and its constituents against Aedes aegypti (L.), Aedes albopictus (Skuse) and Culex quinquefasciatus Say*, Current Research in Insect Science, Volume 2, 2022, 100044, ISSN 2666-5158, https://doi.org/10.1016/j.cris.2022.100044.

Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R., Teng, H.-J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., … Hay, S. I. (2015). *The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. albopictus*. https://doi.org/10.7554/eLife.08347.001

Langsi, Jacob D.; Nukenine, Elias N.; Oumarou, Kary M.; Moktar, Hamadou; Fokunang, Charles N.; Mbata, George N. (2020). *Evaluation of the Insecticidal Activities of Î±-Pinene and 3-Carene on Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae).* 11(8), 540. doi:10.3390/insects11080540

Lees, Rosemary Susan; Gilles, Jeremie RL; Hendrichs, Jorge; Vreysen, Marc JB; Bourtzis, Kostas (2015). *Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. Current Opinion in Insect Science, 10(), 156–162.* doi:10.1016/j.cois.2015.05.011

Lee, D., & Ahn, Y.-J. (2013). Laboratory and Simulated Field Bioassays to Evaluate Larvicidal Activity of Pinus densiflora Hydrodistillate, Its Constituents and Structurally Related Compounds against Aedes albopictus, Aedes aegypti and Culex pipiens pallens in Relation to Their Inhibitory Effects on Acetylcholinesterase Activity. Insects, 4(2), 217–229. doi:10.3390/insects4020217

Letts, J. A., Fiedorczuk, K., & Sazanov, L. A. (2016). The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature*, *537*(7622), 644–648. https://doi.org/10.1038/nature19774

Liu, N. (2015). Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms, and research directions. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 60, pp. 537–559). Annual Reviews Inc. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828

Lucia, A., Licastro, S., Zerba, E., & Masuh, H. (2008). *Yield, chemical composition, and bioactivity of essential oils from 12 species of Eucalyptuson Aedes aegypti larvae. Entomologia Experimentalis et Applicata, 129(1), 107–114.* doi:10.1111/j.1570-7458.2008.00757.x

López, M. D., & Pascual-Villalobos, M. J. (2010). Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*, *31*(2), 284–288. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.005

Maia, D.S., Lopes, C.F., Saldanha, A.A. et al. Larvicidal effect from different Annonaceae species on Culex quinquefasciatus. Environ Sci Pollut Res 27, 36983–36993 (2020). https://doi.org/10.1007/s11356-020-08997-6

Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *27*(3), 221–234. https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8

Martin, Y. C. (2009). Let's not forget tautomers. In *Journal of Computer-Aided Molecular Design* (Vol. 23, Issue 10, pp. 693–704). https://doi.org/10.1007/s10822-009-9303-2

Mason, T. L., Poyton, R. O., Wharton, D. C., & Schatz, G. (1973). Cytochrome c Oxidase from Bakers' Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *248*(4), 1346–1354. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)44305-6

Matasyoh, J. C., Wathuta, E. M., Kariuki, S. T., & Chepkorir, R. (2011). Chemical composition and larvicidal activity of Piper capense essential oil against the malaria vector, Anopheles gambiae. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *14*(1), 26–28. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.11.005

Mathews, C. K., van Holde, K. E. (Kensal E., Ahern, K. G., & González de Buitrago, J. M. (2002). *Bioquímica*. Addison Wesley.

Mattar, S., Miranda, J., Pinzon, H., Tique, V., Bolaños, A., Aponte, J., Arrieta, G., Gonzalez, M., Barrios, K., Contreras, H., Alvarez, J., & Aleman, A. (2015). Outbreak of chikungunya virus in the north caribbean area of colombia: Clinical presentation and phylogenetic analysis. *Journal of Infection in Developing Countries*, *9*(10), 1126–1132. https://doi.org/10.3855/jidc.6670

Melo-Santos, M. A. V., Varjal-Melo, J. J. M., Araújo, A. P., Gomes, T. C. S., Paiva, M. H. S., Regis, L. N., Furtado, A. F., Magalhaes, T., Macoris, M. L. G., Andrighetti, M. T. M., & Ayres, C. F. J. (2010a). Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an Aedes aegypti laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica*, *113*(2), 180–189. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.015

Melo-Santos, M. A. V., Varjal-Melo, J. J. M., Araújo, A. P., Gomes, T. C. S., Paiva, M. H. S., Regis, L. N., Furtado, A. F., Magalhaes, T., Macoris, M. L. G., Andrighetti, M. T. M., & Ayres, C. F. J. (2010b). Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an Aedes aegypti laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica*, *113*(2), 180–189. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.015

Moshe Kostyukovsky; Ada Rafaeli; Carina Gileadi; Nataly Demchenko; Eli Shaaya (2002). *Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. , 58(11), 1101–1106.* doi:10.1002/ps.548

Mossa, A. T. H., Mohafrash, S. M. M., & Chandrasekaran, N. (2018). Safety of natural insecticides: Toxic effects on experimental animals. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2018/4308054

Mulkidjanian, A. Y. (2010). Activated Q-cycle as a common mechanism for cytochrome bc1 and cytochrome b6f complexes. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1797, Issue 12, pp. 1858–1868). https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.07.008

Murray, R. K. (Robert K. (2009). *Harper's illustrated biochemistry*. McGraw-Hill Medical.

Natal CM, Fernandes MJG, Pinto NFS, Pereira RB, Vieira TF, Rodrigues ARO, Pereira DM, Sousa SF, Fortes AG, Castanheira EMS, T Gonçalves MS. *New carvacrol and thymol derivatives as potential insecticides: synthesis, biological activity, computational studies and nanoencapsulation.* RSC Adv. 2021 Oct 21;11(54):34024-34035. doi: 10.1039/d1ra05616f.

Natarajan, A., Sugumar, S., Bitragunta, S., & Balasubramanyan, N. (2015). Molecular docking studies of (4Z, 12Z)-cyclopentadeca-4, 12-dienone from Grewia hirsuta with some targets related to type 2 diabetes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s12906-015-0588-5

Nesci, S., Trombetti, F., Ventrella, V., & Pagliarani, A. (2017). Post-translational modifications of the mitochondrial F1FO-ATPase. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1861, Issue 11, pp. 2902–2912). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.007

Nunes, B., Rodrigues Da Silvam, M., Bezerra Da Silva, P., Soledade De Lira Pimentel, C., Suyana Lino Da Rocha, K., Farias De Aguiar, J., Agra Neto, A., Paiva, P., Gomes, M., Ferreira Da Silva Júnior, E., Amaral Ferraz Navarro, D,. *Oviposition deterrence, larvicidal activity and docking of β-germacrene-D-4-ol obtained from leaves of Piper corcovadensis (Piperaceae) against Aedesaegypti, Industrial Crops and Products*, 182, 2022, https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114830.

Ocampo, C. B., Salazar-Terreros, M. J., Mina, N. J., McAllister, J., & Brogdon, W. (2011). Insecticide resistance status of Aedes aegypti in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica*, *118*(1), 37–44. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.007

Orsborne, J., Banks, S. D. R., Hendy, A., Gezan, S. A., Kaur, H., Wilder-Smith, A., Lindsay, S. W., & Logan, J. G. (2016). Personal protection of permethrin-treated clothing against aedes aegypti, the vector of dengue and zika virus, in the laboratory. *PLoS ONE*, *11*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152805

Oliveira GL, Cardoso SK, Lara CR Jr, Vieira TM, Guimarães EF, Figueiredo LS, Martins ER, Moreira DL, Kaplan MA. *Chemical study and larvicidal activity against Aedes aegypti of essential oil of Piper aduncum L. (Piperaceae).* An Acad Bras Cienc. 2013;85(4):1227-34. doi: 10.1590/0001-3765201391011.

Parra-Naranjo A, Delgado-Montemayor C, Salazar-Aranda R, Waksman-Minsky N. *Bioactivity of the Genus Turnera: A Review of the Last 10 Years. Pharmaceuticals (Basel).* 2023 Nov 7;16(11):1573. doi: 10.3390/ph16111573.

Park, JH., Jeon, YJ., Lee, CH. et al. Insecticidal toxicities of carvacrol and thymol derived from Thymus vulgaris Lin. against Pochazia shantungensis Chou & Lu., newly recorded pest. Sci Rep 7, 40902 (2017). https://doi.org/10.1038/srep40902

Paixão, E. S., Teixeira, M. G., & Rodrigues, L. C. (2018). Zika, chikungunya and dengue: The causes and threats of new and reemerging arboviral diseases. *BMJ Global Health*, *3*. https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000530

Pavela, Roman; Maggi, Filippo; Iannarelli, Romilde; Benelli, Giovanni (2019). *Plant extracts for developing mosquito larvicides: from laboratory to the field, with insights on the modes of action. Acta Tropica.* doi:10.1016/j.actatropica.2019.01.019

Ponce, G., Cantú, P. C., Flores, A., Badii, M., Zapata, R., & López Ildefonso, B. (2006). *MODO DE ACCIÓN DE LOS INSECTICIDAS*.

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases.* Indian J Clin Biochem. 2015 Jan;30(1):11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.

Poiani, S.B., Dobeš, P., Kunc, M. et al. *The Influence of Selected Insecticides on the Oxidative Response of Atta sexdens (Myrmicinae, Attini) Workers.* Neotrop Entomol 52, 1088–1099 (2023). https://doi.org/10.1007/s13744-023-01077-7

Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A., & Racker, E. (1960). Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *235*(11), 3322–3329. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)81361-1

Quinn, D. M. (1987.). *Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States*.

Ravi Kiran, S., & Sita Devi, P. (2007). *Evaluation of mosquitocidal activity of essential oil and sesquiterpenes from leaves of Chloroxylon swietenia DC. Parasitology Research, 101(2), 413–418.* doi:10.1007/s00436-007-0485-z

Radice M, Durofil A, Buzzi R, Baldini E, Martínez AP, Scalvenzi L, Manfredini S. *Alpha-Phellandrene and Alpha-Phellandrene-Rich Essential Oils: A Systematic Review of Biological Activities, Pharmaceutical and Food Applications. Life (Basel).* 2022 Oct 14;12(10):1602. doi: 10.3390/life12101602. PMID: 36295037; PMCID: PMC9605662.

Rameshwar Singh Rattan (2010). *Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. , 29(9), 913–920.* doi:10.1016/j.cropro.2010.05.008

Rodolphe Poupardin; Stéphane Reynaud; Clare Strode; Hilary Ranson; John Vontas; Jean-Philippe David (2008). *Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito Aedes aegypti: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. , 38(5), 0–551.* doi:10.1016/j.ibmb.2008.01.004

Rich, P. R. (2017). Mitochondrial cytochrome c oxidase: Catalysis, coupling and controversies. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 45, Issue 3, pp. 813–829). Portland Press Ltd. https://doi.org/10.1042/BST20160139

Regnault-Roger, Catherine; Vincent, Charles; Arnason, John Thor (2012). Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. Annual Review of Entomology, 57(1), 405–424. doi:10.1146/annurev-ento-120710-100554

Rueda, Andrés G.; Otero, Aurora L. Carreño; Duque L., Jonny E.; Kouznetsov, Vladimir V. (2018). *Synthesis of new α-amino nitriles with insecticidal action on Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). Revista Brasileira de Entomologia.* doi:10.1016/j.rbe.2018.01.004

Sarma, R., Adhikari, K. & Khanikor, B. *Evaluation of efficacy of pinene compounds as mosquitocidal agent against Aedes aegypti Linn. (Diptera: culicidae)*. (2022). https://doi.org/10.1007/s42690-022-00784-9

Said-, H. A. H., Ahl, A., Hikal, W., Said-Al, H. A. H., Said-Al Ahl, H. A. H., Hikal, W. M., & Tkachenko, K. G. (2017). Essential Oils with Potential as Insecticidal Agents: A Review. *International Journal of Environmental Planning and Management*, *3*(4), 23–33. http://www.aiscience.org/journal/ijepmhttp://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Sims, N. R., & Muyderman, H. (2010). Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1802, Issue 1, pp. 80–91). https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.003.

Silva, J.R.d.A.; Oliveira, A.A.d.; França, L.P.; da Cruz, J.D.; Amaral, A.C.F. Exploring the Larvicidal

and Adulticidal Activity against *Aedes aegypti* of Essential Oil from *Bocageopsis multiflora*. *Molecules* **2024**, *29*, 2240. https://doi.org/10.3390/molecules29102240

Silva VB, Travassos DL, Nepel A, Barison A, Costa EV, Scotti L, Scotti MT, Mendonça-Junior FJB, La Corte Dos Santos R, de Holanda Cavalcanti SC. *Synthesis and Chemometrics of Thymol and Carvacrol Derivatives as Larvicides against Aedes aegypti.* J Arthropod Borne Dis. 2017 May 27;11(2):315-330.

Silvérico, Maíra Rosato Silveiral; Espindola, Laila Salmen; Lopes, Norberto Peporine; Vieira, Paulo Cézar (2020). *Plant Natural Products for the Control of Aedes aegypti: The Main Vector of Important Arboviruses. Molecules, 25(15), 3484–.* doi:10.3390/molecules25153484

Singer, T. P. (1974). *METHODS OF BIOCHEMICAL ANALYSIS Determination of the Activity of Succinate. NADH. Choline. and a-Glycerophosphate Dehydrogenases*.

Singh, K. D., & Muthusamy, K. (2013). Molecular modeling, quantum polarized ligand docking and structure-based 3D-QSAR analysis of the imidazole series as dual KT1 and ET A receptor antagonists. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(12), 1592–1606. https://doi.org/10.1038/aps.2013.129

Turek, Claudia; Stintzing, Florian C. (2013). *Stability of Essential Oils: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40–53. doi:10.1111/1541-4337.12006

Vanegas-Estévez, T., Fanny Melina Duque, Diana L. Urbina, Luis C. Vesga, Stelia C. Mendez-Sanchez, Jonny E. Duque, *Design and elucidation of an insecticide from natural*

compounds targeting mitochondrial proteins of Aedes aegypti, Pesticide Biochemistry and Physiology, Volume 198, 2024, https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105721.

Vera, S. S., Zambrano, D. F., Méndez-Sanchez, S. C., Rodríguez-Sanabria, F., Stashenko, E. E., & Duque Luna, J. E. (2014). Essential oils with insecticidal activity against larvae of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, *113*(7), 2647–2654. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3917-6

Wanessa de Campos BORTOLUCCI; Hérika Line Marko de OLIVEIRA; Eloísa Schineider SILVA; Caio Franco de Araújo Almeida CAMPO; José Eduardo GONÇALVES; Ranulfo PIAU JUNIOR; Nelson Barros COLAUTO; Giani Andrea LINDE; Zilda Cristiani GAZIM. *Schinus terebinthifolius ESSENTIAL OIL AND FRACTIONS IN THE CONTROL OF Aedes aegypti.* Biosci. J., Uberlândia, v. 35, n. 5, p. 1575-1587, Sep./Oct. 2019.

Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution*, *9*(4), 523–540. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003

Yactayo, S., Staples, J. E., Millot, V., Cibrelus, L., & Ramon-Pardo, P. (2016). Epidemiology of chikungunya in the americas. *Journal of Infectious Diseases*, *214*, S441–S445. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw390

Zettel, C., & Kaufman, P. (2013). *Yellow fever mosquito Aedes aegypti (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae) 1*. http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures.

Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2006). Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1757, Issues 5–6, pp. 509–517). https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.04.029

Zoubiri, S., & Baaliouamer, A. (2014). Potentiality of plants as source of insecticide principles. *Journal of Saudi Chemical Society*, *18*(6), 925–938. https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.11.015

7. Anexos

Anexo 1

Chemical characterization of essential oils from collected plants studied in this work

EO code	Scientific name	Major components (Relative GC area, %)
001	*Steiractinia aspera* Cuatrec. (Asteraceae)	α-pinene (24.9%), β-pinene (14.8%), germacrene D (13.1%), β-phellandrene (10.1%), α-phellandrene (6.3%), sabinene (4.6%), *p*-cymene (4.5%), *trans*-β-caryophyllene (3.1%); α-copaene (2.6%), limonene (2.4%).
002	*Turnera diffusa* Willd. (Passifloraceae)	Dehidrofukinone (25.4%), aristolochene (17.9%), valencene (7.4%), β-selinene (5.2%), *trans*-β-caryophyllene (4.0%), β-elemene (4.0%), premnaspirodiene (3.7%), guaiol (3.5%), germacra-4,5,10-trien-1-α-ol (3.5%), caryophyllene oxide (3.3%).
003	*Lippia origanoides* Kunth, Chemotype phellandrene (Verbenaceae)	*trans*-β-caryophyllene (18.6%), α-humulene (10.1%), α-phellandrene (9.3%), *p*-cymene (8.7%), 1,8-cineole (6.5%), limonene (4.4%), caryophyllene oxide (3.8%), β-phellandrene (3.1%), camphene (2.5%), germacrene D (2.2%).
004	*Calycolpus moritzianus* (O.Berg) Burret. (Myrtaceae)	1,8-cineole (19.1%), limonene (17.6%), *trans*-β-caryophyllene (6.3%), viridiflorol (5.7%), α-pinene (5.1%), *trans*,*trans*-geranyl linalool (4.0%), *trans*-nerolidol (3.5%), α-copaene (3.2%), selina-3,7(11)-diene (2.8%), viridiflorol (2.7%).
005	*Piper aduncum* L. (Piperaceae)	Piperitone (14.8%), *trans*-β-Caryophyllene (7.4%), viridiflorol (6.5%), limonene (6.0%), δ-cadinene (5.5%), α-pinene (4.6%), α-phellandrene (4.4%), caryophyllene oxide (3.8%), 1,8-cineole (3.6%), *p*-cymene (3.0%).
006	*Elaphandra quinquenervis* (S.F.Blake) H.Rob. (Asteraceae)	Germacrene D (20.7%), α-phellandrene (9.1%), α-pinene (6.8%), *trans*-β-caryophyllene (5.1%), Δ3-carene (4.9%), limonene (4.5%), β-cubebene (3.5%), α-humulene (2.6%), premnaspirodiene (2.6%), δ-cadinene (2.6%).

007	*Hyptis dilatata* Benth. (Lamiaceae)	*trans*-β-Caryophyllene (20.2%), alcanfor (16.1%), 3-Δcarene (15.5%), α-pinene (10.5%), palustrol (8.7%), α-gurjunene (4.7%), ledol (3.4%), limonene (2.4%), camphene (1.7%), viridiflorol (1.5%), aromadendrene (1.5%).
008	*Lippia origanoides* Kunth. Chemotype carvacrol+*p*-cymene (Verbenaceae)	Carvacrol (35%), *p*-cymene (14.4%), thymol (8.0%), γ-terpinene (5.3%), *trans*-β-caryophyllene (4.4%), β-myrcene (2.4%), carvacryl acetate (2.0%), thymol methyl ether (1.9%), α-terpinene (1.7%).
009	*Lippia origanoides* Kunth. Chemotype *trans*-β-caryophyllene (Verbenaceae)	*trans*-β-caryophyllene (15.1%), thymol (14%), 1,8-cineole (13%), *p*-cymene (12.6%), α-humulen (8.1%), α-phellandrene (7.1%), α-eudesmol (2.6%), caryophyllene oxide (2.5%), γ-terpinene (2.4%), limonene (2.1%).
010	*Lippia origanoides* Kunth. Chemotype thymol (Verbenaceae)	Thymol (75.3%), *trans*-β-Caryophyllene (5.4%), carvacrol (4.9%), α-humulen (3.2%), p-cymene (2.3%), thymol acetate (1.6%), thymol methyl ether (1.3%), caryophyllene oxide (1.3%), *trans*-β-bergamotene (1.0%).
011	*Turnera diffusa* Willd. (Passifloraceae)	Aristolecheno (20.9%), dehidrofukinona (19.3%), valencene (6.5%), β-selinene (5.8%), β-elemene (5.0%), *trans*-β-caryophyllene (4.9%), premnaspirodiene (4.7%), p-cymene (3.6%), germacra-4,5,10-trien-1-α-ol (3.6%), guaiol (3.3%).
012	*Satureja viminea* L. (Labiatae)	*p*-Ment-3-en-8-ol (32.4%), pulegone (16.1%), *trans*-9-epi-caryophyllene (8.9%), *trans*-β-caryophyllene (8.4%), caryophyllene oxide (4.3%), spathulenol (3.6%), benzyl benzoate (2.4%), δ-Cadinene (2.2%), *trans*-pulegol (1.8%), p-Mentha-3,8-diene (1.5%).
013	*Psidium sartorianum Nied.* (Myrtaceae)	*trans*-β-Caryophyllene (12.7%), caryophyllene oxide (12.0%), N.I. C15H24O (8.8%), dehydrofukinone (7.5%), caryophylla-4(12),8(13)-dien-5-β-ol (4.8%), germacrene B (4.1%), 1,8-cineole (3.7%), *p*-cymene (2.9%), β-pineno (2.7%), Selina-3,7(11)-diene (2.5%), β-selinene (2.1%), premnaspirodiene (2.0%).
014	*Varronia curassavica* Vell. (Boraginaceae)	*trans*-β-Caryophyllene (19.2%), germacrene D (12.3%), *trans*-β-Guaiene (11.8%), α-pinene (9.4%), α-copaene (7.0%), β-pineno (4.1%), biciclogermacreno (3.9%), β-elemene (2.8%), δ-cadinene (2.8%), α-humulen (2.7%).

015	*Ocimum basilicum* L. (Labiatae)	Linalool (42.7%), estragole (18.6%), 1,8-cineole (8.1%), Germacrene D (4.9%), e-α-cadinol (4.2%), γ-cadinene (3.7%), α-humulen (2.5%), β-elemene (2.2%), biciclogermacreno (2.2%), *trans*-α-bergamotene (1.1%).
016	*Calycolpus moritzianus* (O.Berg) Burret. (Myrtaceae)	1,8-Cineole (15.4%), limonene (14.7%), viridiflorol (7.1%), *trans*-*trans*-geranyl linalool (6.7%), *trans*-β-caryophyllene (6.2%), β-selinene (5.8%), *trans*-Nerolidol (4.0%), α-pinene (3.5%), selina-3,7(11)-diene (3.0%), α-copaene (3.0%).
017	*Turnera diffusa* Willd. (Passifloraceae)	Aristolochene (20.6%), dehidrofukinona (17.3%), p-cymene (5.8%), β-selinene (5.6%), valencene (5.2%), premnaspirodiene (4.2%), caryophyllene oxide (3.6%), *trans*-β-caryophyllene (2.8%), germacra-4,5,10-trien-1α-ol (2.4%), α-selinene.
018	*L. origanoides* Kunth. chemotype Thymol + p-cymene (Verbenaceae)	Thymol (49.4%), *p*-cymene (19.1%), γ-terpinene (9.2%), β-myrcene (5.2%), α-terpinene (2.9%), carvacrol (2.7%), thymol methyl ether (1.8%), *trans*-β-caryophyllene (1.6%), *cis*-β-ocimene (1.2%), limonene (0.9%).
019	*Lippia origanoides* Kunth. Chemotype Thymol (Verbenaceae)	Thymol (71.7%), *p*-cymene (10.5%), carvacrol (4.4%), β-myrcene (2.1%), γ-terpinene (2.0%), caryophyllene oxide (1.6%), thymol methyl ether (0.9%), *trans*-β-caryophyllene (0.9%), humulene epoxide II (0.7%), terpinen-4-ol (0.7%).
020	*Lippia micromera* Schauer. (Verbenaceae)	*p*-Cymene (26.8%), thymol methyl ether (26.3%), thymol (17.8%), thymol acetate (5.7%), γ-terpinene (5.4%), 1,8-cineole (5.1%),α-terpinene (2.0%), β-myrcene (2.0%), *trans*-β-caryophyllene (1.7%), α-thujene (1.3%), caryophyllene oxide (0.9%).

Nota. Tabla de datos suplementarios del artículo: Insecticidal activity of essential oils from American native plants against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): An introduction to their possible mechanism of action.