

Evaluación del mecanismo de acción de compuestos de origen natural con acción ixodicida sobre la acetilcolinesterasa y el metabolismo bioenergético mitocondrial de *Rhipicephalus*

microplus

Andrés Felipe Cabezas Cárdenas

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Directora

Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez (Ph.D)

Doctora en ciencias, bioquímica

Codirectora

Gloria Stefany Avendaño Mora (Ms.C)

Candidata a doctora en química

Asesor

Dr. Jonny Edward Duque Luna (Ph.D)

Doctor en ciencias básicas, entomología médica

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias básicas

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

*A la niña,
por su amor y sacrificio, este logro es nuestro*

Agradecimientos

A mi madre, que ha sido el motor de mi vida y que hizo todo para lograr este sueño.

A mis hermanos, Laura y Óscar, que siempre estuvieron a mi lado en las buenas y en las malas.

A Camila, que fue mi fiel compañera durante toda la carrera, acompañándonos en los mejores y peores momentos (sobre todo los mejores), siempre sacándome una sonrisa.

A Taylor, que con su arte logró darme energías para continuar.

A Stefanny, que aun después de trece años sigue siendo una gran parte de mí.

A mis amigos Mario, Santiago y Sara, que me acompañaron en todo este proceso.

A la profe Stelia y el profe Jonny, que con sus enseñanzas y paciencia lograron dejar marca.

A Luis Carlos y Gloria, que fueron mis principales guías en este proceso.

A mis compañeros de CINTROP- laboratorio 110 y GIBIM-laboratorio 402, por la ayuda brindada y los buenos momentos vividos, en especial al equipo de garrapatas Bethsy, Karen y Cathalina.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión y al proyecto 3739 “Formulación de un ixodicida y/o ixorepelente diseñado en laboratorio con validación en campo proyectado para la prevención de la infestación de garrapatas en bovinos”

Y a mí mismo, por no desistir.

Tabla de Contenido

	Pág.
Resumen.....	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
1. Marco de referencia y antecedentes.....	12
<i>Rhipicephalus microplus</i>	12
1.2. Babesiosis, anaplasmosis y otras fuentes de las pérdidas económicas causadas por <i>R. microplus</i>	14
1.3. Acaricidas y estrategias para su diseño.....	16
1.3.1 Acaricidas actuales y su mecanismo de acción.....	17
1.3.1.1. Organoclorados.....	17
1.3.1.2. Organofosforados.....	18
1.3.1.3. Formamidinas.....	18
1.3.1.4. Piretroides.....	19
1.3.2. La mitocondria como diana farmacológica.....	20
1.3.2.1. Complejo I.....	21
1.3.2.2. Complejo II.....	23
1.3.2.3. Complejo III.....	25
1.3.2.4. Complejo IV.....	27
1.3.2.5. ATP sintasa.....	29
1.3.3. La acetilcolinesterasa como diana farmacológica.....	31

MECANISMO DE ACCIÓN ACARICIDA SOBRE R. microplus

1.4. Metabolitos secundarios de plantas como alternativa para el control de las garrapatas.....	33
1.4.1. Actividad del carvacrol y otros monoterpenos sobre el metabolismo mitocondrial.	34
1.4.2. Actividad del carvacrol y otros monoterpenos sobre la acetilcolinesterasa.....	36
2. Objetivos.....	37
2.1 Objetivo General	37
2.2 Objetivos Específicos.....	37
3. Metodología.....	37
3.4. Análisis estadístico.....	38
3.1.1. Material biológico.....	38
3.1.2. Protocolo de homogenización y cuantificación de proteína de larvas <i>R. microplus</i> ..	38
3.1.3.1.3. Pruebas oxidasas preliminares.....	39
3.2. Determinación de la actividad enzimática mitocondrial.....	39
3.2.1. Evaluación de las oxidasas (NADH oxidasa y succinato oxidasa).....	40
3.2.2. Evaluación de las deshidrogenasas (NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa).....	40
3.2.3. Evaluación de las reductasas (NADH citocromo c reductasa y succinato citocromo c reductasa).....	41
3.2.4. Evaluación de la citocromo c oxidasa.....	41
3.2.5. Evaluación de la ATP sintasa.....	41
3.3. Determinación de la actividad sobre la acetilcolinesterasa.....	42
3.4. Análisis estadístico.....	42

MECANISMO DE ACCIÓN ACARICIDA SOBRE *R. microplus*

4. Resultados y discusión.....	43
4.1. Pasos preliminares.....	43
4.1.1. Pruebas oxidasas preliminares.....	43
4.1.2. Metabolitos a evaluar.....	47
4.2. Efecto sobre la mitocondria.....	49
4.2.1. Succinato oxidasa.....	49
4.2.2. NADH oxidasa.....	51
4.2.3. NADH deshidrogenasa.....	53
4.2.4. Succinato deshidrogenasa.....	54
4.2.5. NADH citocromo c reductasa.....	56
4.2.6. Succinato citocromo c reductasa.....	58
4.2.7. Citocromo c oxidasa.....	59
4.2.8. ATP sintasa (ATPasa).....	60
4.3. Actividad sobre la acetilcolinesterasa.....	63
5. Conclusiones.....	65
6. Recomendaciones.....	66
7. Divulgación científica.....	66
8. Anexos.....	67
9. Bibliografía.....	68

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Garrapata <i>R. microplus</i>	13
Figura 2. Ciclo de vida de <i>R. microplus</i>	14
Figura 3. Ejemplos de uso común de las principales familias de acaricidas comerciales	19
Figura 4. Modelo de la producción de ATP por medio de la cadena respiratoria mitocondrial.....	21
Figura 5. Modelo del complejo I mitocondrial.....	22
Figura 6. Modelo del complejo II mitocondrial.....	24
Figura 7. Modelo del complejo III mitocondrial.....	26
Figura 8. Modelo del complejo IV mitocondrial.....	28
Figura 9. Esquema de la ATP sintasa.....	29
Figura 10. Esquema del mecanismo de catálisis rotacional.....	30
Figura 11. Esquema de actividad neuronal con la AChE normal e inhibida.....	32
Figura 12. Esquema metodológico general.....	37
Figura 13. Concentración de proteína total de los dos métodos de macerado.....	43
Figura 14. Determinación de la concentración ideal para la medición de oxidasas.....	45
Figura 15. Resultados de mortalidad del carvacrol en larvas de <i>R. microplus</i> bajo la metodología de paquete larval.....	48
Figura 16. Resultados de mortalidad de la quercetina en larvas de <i>R. microplus</i> bajo la metodología de paquete larval	48
Figura 17. Actividad de la succinato oxidasa a diferentes concentraciones de proteína total.....	50
Figura 18. Actividad de la NADH oxidasa.....	52
Figura 19. Actividad de la NADH deshidrogenasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.....	54
Figura 20. Actividad de la succinato deshidrogenasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.....	56
Figura 21. Actividad de la NADH citocromo c reductasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.....	57
Figura 22. Actividad de la succinato citocromo c reductasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.....	58
Figura 23. Actividad de la citocromo c oxidasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm...	59
Figura 24. Actividad de la ATPasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.....	61
Figura 25. Estructura del carvacrol.....	63
Figura 26. Actividad de la acetilcolinesterasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.....	64

Resumen

Título: Evaluación del mecanismo de acción de compuestos de origen natural con acción ixodicida sobre la acetilcolinesterasa y el metabolismo bioenergético mitocondrial de *Rhipicephalus microplus*

Autor: Andrés Felipe Cabezas Cárdenas

Palabras Clave: Mecanismo de acción, *Rhipicephalus microplus*, carvacrol, mitocondria, acetilcolinesterasa

El desarrollo de resistencia por parte de las garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus* hacia los acaricidas comerciales ha ido en crecimiento en los últimos años, representando un desafío significativo para la salud animal, el equilibrio del ecosistema, la soberanía alimentaria y la economía de la industria ganadera. La búsqueda de alternativas más seguras y eficaces ha llevado al estudio de metabolitos secundarios de plantas, conocidos por sus diversas propiedades bioactivas que pueden ser utilizadas en el control de plagas. Este trabajo de investigación se centra en la búsqueda de moléculas capaces de afectar los complejos I, II, III y IV de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, así como la ATP sintasa y la acetilcolinesterasa de *R. microplus*. Estas enzimas y complejos de proteínas mitocondriales son esenciales para la supervivencia y reproducción de las garrapatas, por lo que su inhibición podría resultar en una estrategia eficaz de control de esta plaga. De manera que, el objetivo principal de este trabajo consistió en identificar posibles mecanismos de acción de compuestos naturales contra estos parásitos.

La metodología empleada consistió en realizar ensayos *in vitro* con homogenizados de larvas de garrapata para evaluar la actividad enzimática en presencia del metabolito secundario: carvacrol. Los resultados mostraron una inhibición significativa en varios de los complejos y enzimas estudiados, incluida la reducción en la actividad de la NADH deshidrogenasa (complejo I) en un $18.78 \pm 1.67\%$, NADH y succinato citocromo c reductasa (Complejo III) en un $29.95 \pm 3.30\%$ y $23.16 \pm 4.55\%$ respectivamente, citocromo c oxidasa (Complejo IV) en un $34.83 \pm 4.41\%$ y la acetilcolinesterasa en un $27.02 \pm 2.95\%$. Estos hallazgos sugieren que el carvacrol interfiere con la producción de energía y la neurotransmisión de las garrapatas, explicando así su efecto acaricida. Los resultados obtenidos demuestran que el carvacrol actúa de manera inhibitoria sobre enzimas esenciales para las larvas de *R. microplus*, ofreciendo una alternativa prometedora en la lucha contra la resistencia a los acaricidas y sugiriendo un mayor uso de metabolitos secundarios de plantas como estrategias sostenibles en la gestión de plagas. La comprensión de los mecanismos de acción impacta en el desarrollo de nuevas vías para el control de plagas, estrategias más seguras y efectivas, contribuyendo a la sostenibilidad de la economía en la industria ganadera, la conservación del medio ambiente y la protección de la salud humana y animal.

Abstract

Title: Evaluation of the mechanism of action of natural compounds with ixodicidal activity on acetylcholinesterase and mitochondrial bioenergetic metabolism in *Rhipicephalus microplus*

Author: Andrés Felipe Cabezas Cárdenas

Key Words: Mechanism of action, *Rhipicephalus microplus*, carvacrol, mitochondria, acetylcholinesterase

The development of resistance by *Rhipicephalus microplus* ticks to commercial acaricides has increased in recent years, posing a significant challenge to animal health, ecosystem balance, food sovereignty, and the economy of the livestock industry. The search for safer and more effective alternatives has led to the study of plant secondary metabolites, known for their various bioactive properties that can be used in pest control. This research focuses on finding molecules capable of affecting complexes I, II, III, and IV of the mitochondrial electron transport chain, as well as ATP synthase and acetylcholinesterase in *R. microplus*. These enzymes and mitochondrial protein complexes are essential for the survival and reproduction of ticks, so their inhibition could be an effective strategy for controlling this pest. Therefore, the main objective of this work was to identify possible mechanisms of action of natural compounds against these parasites.

The methodology used consisted of conducting in vitro assays with tick larval homogenates to evaluate enzymatic activity in the presence of the secondary metabolite, carvacrol. The results showed significant inhibition in several of the complexes and enzymes studied, including a reduction in the activity of NADH dehydrogenase (complex I) by $18.78 \pm 1.67\%$, NADH and succinate cytochrome c reductase (complex III) by $29.95 \pm 3.30\%$ and $23.16 \pm 4.55\%$, respectively, cytochrome c oxidase (complex IV) by $34.83 \pm 4.41\%$, and acetylcholinesterase by $27.02 \pm 2.95\%$. These findings suggest that carvacrol interferes with the energy production and neurotransmission of ticks, thus explaining its acaricidal effect. The results obtained demonstrate that carvacrol acts as an inhibitor of essential enzymes in *R. microplus* larvae, offering a promising alternative in the fight against acaricide resistance and suggesting an increased use of plant secondary metabolites as sustainable strategies in pest management. Understanding the mechanisms of action impacts the development of new avenues for pest control, leading to safer and more effective strategies that contribute to the sustainability of the livestock industry economy, environmental conservation, and the protection of human and animal health.

Introducción

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es una de las principales plagas que afectan a la industria ganadera a nivel mundial, causando pérdidas económicas significativas debido a su capacidad de transmitir diversas enfermedades a los animales, como la babesiosis y la anaplasmosis ([Satti et al., 2021](#)). El control de esta plaga se ha basado tradicionalmente en el uso de acaricidas de síntesis química. Sin embargo, el uso extensivo e indiscriminado de estos productos ha llevado al desarrollo de resistencia en las poblaciones de garrapatas, lo que ha reducido su eficacia y ha incrementado los costos de producción de lácteos y carnes debido al aumento de las dosis de acaricidas aplicados y el constante cambio de productos ([Gupta et al., 2023](#); [Rodríguez-Vivas et al., 2018](#)). Además, los acaricidas comerciales pueden tener efectos adversos en el medio ambiente y en la salud humana, lo que ha generado una creciente preocupación por encontrar alternativas más seguras y sostenibles ([Porrini et al., 2020](#); [Tihelka, 2018](#); [van Wieren et al., 2016](#)).

Ante este panorama, surge la necesidad de explorar nuevas estrategias para el control de *R. microplus* que sean efectivas, ecológicamente sostenibles y seguras para la salud humana y animal. Una de las alternativas más prometedoras es el uso de compuestos naturales, específicamente metabolitos secundarios de plantas, que han demostrado poseer propiedades bioactivas contra una amplia variedad de plagas y enfermedades. Estos compuestos naturales representan una fuente rica y diversa de posibles acaricidas con diferentes mecanismos de acción, que podrían contrarrestar la resistencia desarrollada por las garrapatas a los productos químicos convencionales ([Yadav et al., 2022](#)).

El uso de metabolitos secundarios de plantas como agentes ixodicidas ofrece varias ventajas sobre los acaricidas sintéticos. En primer lugar, estos compuestos suelen ser biodegradables y menos

tóxicos para el medio ambiente, lo que reduce el riesgo de contaminación y los impactos negativos en la biodiversidad ([Shanmuganath et al., 2021](#)). En segundo lugar, los metabolitos secundarios de plantas pueden tener múltiples mecanismos de acción, lo que dificulta el desarrollo de resistencia por parte de las garrapatas y prolonga la efectividad de los tratamientos. Además, muchos de estos compuestos han sido utilizados tradicionalmente en la medicina y la agricultura, lo que proporciona una base de conocimiento y experiencia que puede facilitar su adopción y aceptación ([Adenubi et al., 2016](#); [Quadros et al., 2020](#)).

Este estudio se enfocó en evaluar el mecanismo de acción de un compuesto de origen natural, el carvacrol, sobre la acetilcolinesterasa y el metabolismo bioenergético mitocondrial de *R. microplus*, las cuales son dianas farmacológicas de interés en el diseño de pesticidas ([Duque et al. 2023](#); [Vanegas-Estévez et al. 2024](#); [Borrero-Landazabal et al. 2020](#)). La acetilcolinesterasa es una enzima clave en la neurotransmisión, responsable de la degradación de la acetilcolina en la sinapsis. La inhibición de esta enzima puede causar una acumulación de acetilcolina, lo que resulta en una interrupción de la transmisión nerviosa y, eventualmente, la muerte de la garrapata ([Cardoso et al., 2020](#)). Por otro lado, la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa son componentes cruciales del metabolismo bioenergético mitocondrial, responsables de la producción de ATP, la principal fuente de energía celular. La inhibición de estos procesos puede comprometer la viabilidad celular y reducir la capacidad de supervivencia de las garrapatas ([Sparks & Deamicis, 2012](#)).

La identificación y caracterización de compuestos naturales que puedan inhibir eficazmente estas enzimas y procesos bioenergéticos es esencial para desarrollar nuevas estrategias de control de garrapatas. Este enfoque no solo puede proporcionar soluciones más seguras y sostenibles, sino

que también puede contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos de acción de los compuestos naturales y su potencial uso en la gestión integrada de plagas.

1. Marco de referencia y antecedentes

1.1. *Rhipicephalus microplus*

Es una especie de garrapata perteneciente a la familia Ixodidae y al género *Rhipicephalus*. Este género de garrapatas, son los principales vectores de enfermedades de gran impacto en la industria ganadera como la babesiosis y anaplasmosis, incluidas las especies *Rhipicephalus annulatus*, *R. bursa*, *R. calcaratus*, *R. decoloratus*, *R. evertsi*, *R. microplus*, *R. bursa*, *R. evertsi*, *R. sanguineus* y *R. simus* ([WOAH, 2023a](#)). Sin embargo, en Colombia, *R. microplus* es la especie con mayor presencia en el ganado, encontrándose en 28 de los 32 departamentos del país, y siendo la principal causa de las pérdidas económicas en la industria bovina ([Acevedo-Gutiérrez et al., 2020](#); [Ferreira et al., 2022](#)).

R. microplus hace parte de las especies de garrapatas duras, debido a que cuentan con una coraza de quitina en la zona posterior del torso ([Cossio-Bayugar et al., 2023](#)). Las larvas cuentan con tres (3) pares de patas, que aumentan a cuatro (4) pares una vez pasan al estadio de ninfa y adulta, siendo el primer par de patas el portador del principal órgano quimiorreceptor de las garrapatas, el órgano de Haller.

Esta especie de garrapata es originaria de Asia, sin embargo, a causa del fenómeno de globalización y el comercio de ganado, se ha distribuido globalmente en zonas tropicales y subtropicales. Hoy día tiene presencia principalmente en América Latina, el Caribe, y algunas zonas de Asia, África y Australia ([Makenov et al., 2021](#); [Kanduma et al., 2020](#)).

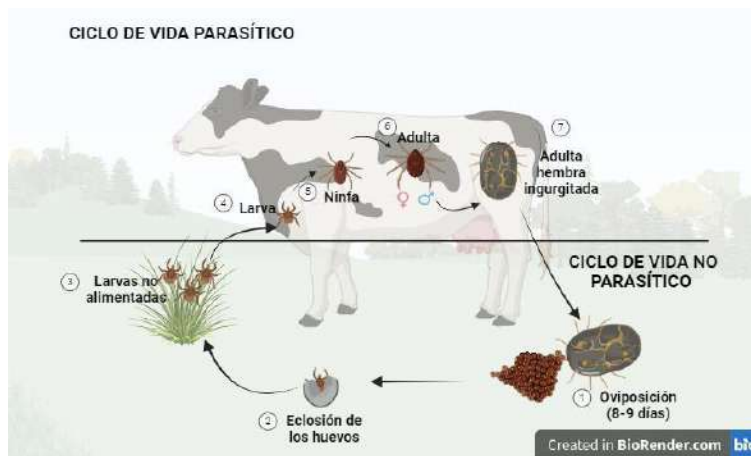
Figura 1. Garrapata *R. microplus*



Nota. Comparación de tamaños de los diferentes estadios: larva, ninfa y adulta. Tomado de [USDA, \(2024\)](#).

El ciclo de vida de *R. microplus* se divide en dos tipos, un ciclo parasítico de un solo hospedero y uno no parasítico. El ciclo de vida parasítico ocurre sobre el hospedero y suele durar aproximadamente 23 días, en este ciclo la garrapata se alimenta constantemente del animal, pasando por los estadios de larva, ninfa y adulta, siendo este último donde se da el apareamiento y posterior ingurgitación de las hembras ([Nuñez et al., 1982](#)). Por otro lado, en el ciclo de vida no parasítico, las garrapatas hembras ingurgitadas caen al suelo y realizan la oviposición en un lugar cuyas condiciones de temperatura y humedad sean favorables para su desarrollo. El periodo de oviposición dura entre 8 y 9 días aproximadamente, mientras que el periodo de eclosión de los huevos es en promedio de 21 días ([Senbill et al., 2018](#)). Una vez han eclosionado, las larvas suben por el pasto y esperan en las puntas de este el paso de un hospedero, sobreviviendo hasta por 160 días sin alimentarse en las condiciones adecuadas ([Estrela et al., 2007](#)).

Figura 2. Ciclo de vida de *R. microplus*



Nota. 1) Garrapata adulta ingurgitada realizando la oviposición, lo cual dura entre 8 y 9 días. 2) Eclosión de los huevos luego de 21 días de la oviposición. 3) Larvas después de la eclosión, subiendo por los pastos en busca de hospedero. 4) Larvas en el hospedero, empezando el ciclo de vida parasítico. 5) La larva muda a ninfa a los 8-14 días de alimentarse. 6) La ninfa muda a adulta en 15-21 días de alimentación. En este estadio se da la diferenciación de sexos y el apareamiento sobre el hospedero. 7) Las hembras se alimentan hasta mudar a adultas ingurgitadas, donde caen al suelo a buscar un lugar idóneo para la oviposición, reiniciando el ciclo ([Bandaranayaka et al., 2021](#)). Imagen adaptada de [García-Ponce et. al. \(2024\)](#).

1.2. Babesiosis, anaplasmosis y otras fuentes de las pérdidas económicas causadas por *R. microplus*

A nivel mundial, la garrapata *R. microplus* es una de las principales causantes de pérdidas económicas en el sector ganadero. La infestación de los bovinos por esta especie de garrapata puede causar pérdidas considerables de sangre, anemia, disminución de peso y reducción de la producción de leche, así como pérdidas en la calidad de la carne, lácteos, pieles y demás productos obtenidos a partir de los animales ([Domínguez et al., 2016](#); [Tabor et al., 2017](#); [Thinnabut et al.,](#)

[2023](#)). Por otro lado, *R. microplus* es el principal vector de enfermedades en el ganado tales como la babesiosis y la anaplasmosis, enfermedades que afectan a un gran porcentaje de los bovinos a nivel mundial, y pueden tener consecuencias letales ([CFSPH, 2008](#)).

La babesiosis es una enfermedad infecciosa transmitida a los bovinos por los parásitos protozoarios del género *Babesia*, en especial las especies *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* ([Gray & De Vos, 1981](#)). La infección por estos parásitos se caracteriza por presentar fiebre alta, ataxia, anemia, anorexia, hemoglobinuria, shock circulatorio, algunos síntomas nerviosos, como convulsiones, coma e incluso la muerte ([Underwood et al., 2015](#)). El tratamiento que existe hoy día para la enfermedad es a través de vacunas, las cuales pueden llegar a ser efectivas si es detectada en una fase temprana ([WOAH, 2023b](#)). Sin embargo, hoy día no existe una vacuna que sea eficiente y segura para los animales, esto debido a la creciente complejidad de la relación que existe entre el parásito, el vector y el hospedero, sumado a la generación de resistencia por parte de los parásitos y garrapatas, y los constantes cambios climáticos ([Mosqueda et al., 2012](#); [Jacob et al., 2020](#)).

La anaplasmosis es una enfermedad bacteriana hemolítica causada por la bacteria *Anaplasma marginale*. Sus síntomas incluyen anemia, ataxia, pérdida de peso, reducción en la producción de leche, abortos espontáneos y muerte de los animales adultos ([Kocan et al., 2010](#); [Spare et al., 2020](#)). Esta enfermedad presenta síntomas similares a los de la babesiosis, y se puede llegar a confundir entre ambas; sin embargo, la anaplasmosis no presenta hemoglobinuria, que es la principal forma no diagnóstica de diferenciarlas ([WOAH, 2023a](#)). Los bovinos pueden ser infectados con la enfermedad a cualquier edad, no obstante, la mortalidad aumenta con la edad de los animales. Además, una vez los becerros son infectados, se convierten en portadores de por vida, aun si no presentan síntomas de la enfermedad ([WOAH, 2023a](#); [Richey, 1991](#)). El

tratamiento contra la enfermedad se basa en el mantenimiento de ganado libre de *Anaplasma marginale*, lo que incluye controles, realización de pruebas diagnósticas y eliminación de los animales infectados; además del control de garrapatas y la aplicación de vacunas y antibióticos ([Aubry & Geale, 2011](#)).

Debido a los factores mencionados, *R. microplus* causa pérdidas económicas millonarias anuales. En Brasil se estiman pérdidas de \$34.61 dólares por animal cada año, teniendo en cuenta únicamente la pérdida de peso en ganado para carne de consumo humano ([Calvano et al., 2019](#)), mientras que en 2014 se estimaron pérdidas de 3200 millones de dólares anuales teniendo en cuenta tanto pérdidas de carne, como de lácteos y demás productos derivados del ganado ([Grisi et al., 2014](#)). Por su parte, en Colombia en el año 2017 se tuvieron pérdidas de alrededor de 168 millones de dólares a causa de los problemas causados por esta especie de garrapata ([Singh et al., 2022](#)); mientras que, a nivel global, las pérdidas aumentan a 22000-30000 millones de dólares anuales ([Pereira et al., 2022](#)).

1.3. Acaricidas y estrategias para su diseño

Los acaricidas constituyen la principal herramienta utilizada para combatir los efectos adversos causados por las garrapatas ([Sonenshine et al., 2002](#)). Estos son productos cuyo principio activo ataca directamente a diversos procesos biológicos de estos parásitos, como puede ser la comunicación en su sistema nervioso central o el metabolismo de diferentes biomoléculas. Pese a que suelen ser muy útiles para el control de las garrapatas, el uso prolongado de acaricidas tiene efectos desfavorables para el medio ambiente y para el propio sistema de control de los ácaros. Efectos tales como la destrucción de los ecosistemas circundantes ([Van Wieren et al., 2016](#)), la afectación de especies no objetivo ([Desneux et al., 2007](#)), y la generación de resistencia por parte de las garrapatas afectando la eficiencia de los productos acaricidas y causando la necesidad de la

aplicación de dosis más concentradas o con mayor frecuencia ([Valencia et al., 2017](#)). Además, provocan un mayor deterioro económico para los productores debido al aumento en la compra de insumos e intoxicación de animales y trabajadores ([Dennehy et al., 1990](#); [Rodríguez Vivas et al., 2014](#)).

Estos efectos adversos se pueden prevenir o solucionar a través de diferentes métodos, como la formulación o la búsqueda de otros compuestos capaces de controlar a las garrapatas sin generar problemas ambientales. Sin embargo, esto no soluciona la generación de resistencia por parte de las garrapatas, el cual es el problema que genera mayores consecuencias. Para dar solución a esto, una de las principales estrategias es el estudio de los mecanismos de acción de los compuestos con actividad acaricida. Esto debido a que, al conocerlo, se puede optimizar la formulación del producto acaricida, obteniendo mejor eficacia de mortalidad y ahorro en tiempo y recursos económicos ([Feng et al., 2020](#)). Además, al conocer el target del compuesto, se puede utilizar en conjunto con otros productos o compuestos, generando efectos sinérgicos que potencian la acción acaricida, que al ser aplicados en un sistema rotativo de acaricidas disminuye notablemente la generación de resistencia por parte de las garrapatas ([França et al., 2013](#); [Thullner et al., 2007](#)).

1.3.1 Acaricidas actuales y su mecanismo de acción

Hoy día existen diferentes acaricidas de origen natural y sintético que cuentan con buena eficacia en el control contra las garrapatas. Entre los principios activos con actividad acaricida más utilizados se encuentran ([Adenubi et al., 2018](#)):

1.3.1.1. Organoclorados

Los acaricidas organoclorados como el diclorodifeniltricloroetano (DDT) fueron ampliamente utilizados alrededor del mundo entre 1940 y 1970, debido a su alta efectividad en el

control de las garrapatas y otros parásitos. Sin embargo, su alta toxicidad, lenta degradación y alta bioacumulación en el ambiente ha hecho que su uso haya sido prohibido en varios países ([Jayaraj et al., 2016](#)). El mecanismo de acción de los organoclorados varía dependiendo del compuesto. Los acaricidas similares al DDT actúan sobre el sistema nervioso, inhibiendo la activación de los canales de sodio; mientras que los acaricidas de la familia de los ciclodienos, debido a la similitud estructural con la picrotoxina, antagonista del receptor de ácido γ -aminobutírico (GABA), causan una hiperexcitación del sistema central, causando convulsiones y posterior muerte ([Gupta, 2011](#)).

1.3.1.2. Organofosforados

Los organofosforados son compuestos derivados de los ácidos fosfórico, fosfónico e hipofosforoso. Son el principio activo acaricida más utilizado a nivel mundial. Altamente nocivos para la salud, habiéndose reportado casos de alteraciones respiratorias, metabólicas y neurológicas en seres humanos tras la exposición a estos compuestos. Los organofosforados actúan como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, generando desbalances en la transmisión de señales neuronales ([Terry, 2012](#)). Entre las moléculas más utilizadas en el control de garrapatas se encuentran el malatión y el clorpirifos, pero estos han sido reportados como agentes tóxicos para organismos benéficos para ecosistemas circundantes al sitio de aplicación, como abejas, aves y peces ([Johnson et al., 2010](#))

1.3.1.3. Formamidinas

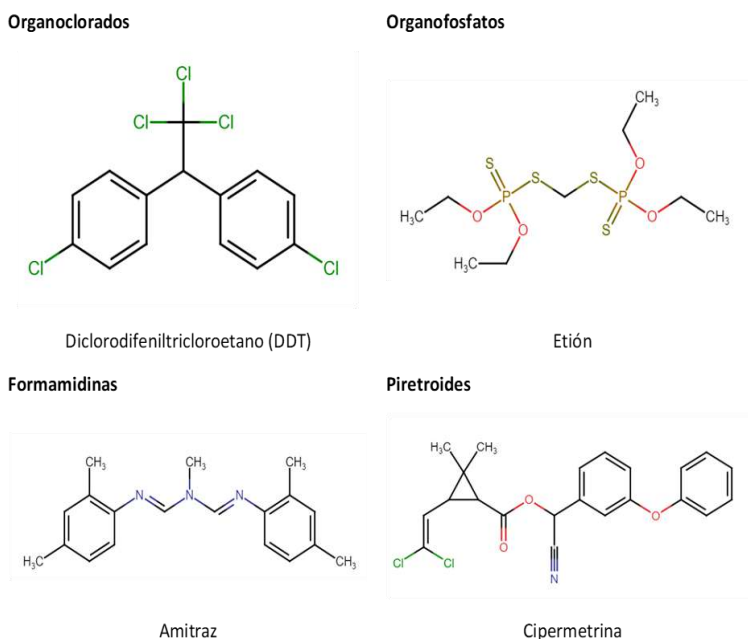
Los acaricidas cuyo principio activo son las formamidinas, se usan principalmente para el control de ácaros y pulgas. Sin embargo, el amitraz, también ha sido reportado como un potente agente acaricida contra garrapatas ([Nolan, 1981](#)). El amitraz actúa interfiriendo los receptores de octopamina, estimulando la acción de las oxidasas de monoaminas, induciendo la producción de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y guanosín monofosfato cíclico (cGMP), lo cual altera

diferentes funciones celulares, como la inducción de la apoptosis o la transmisión de señales nerviosas ([Beugnet & Franc, 2012](#)).

1.3.1.4. Piretroides

Los piretroides son la segunda familia de moléculas más utilizadas a nivel mundial para el control de plagas, después de los organofosforados ([Agwunobi et al., 2021](#)). Pueden tener efectos tanto repelentes como acaricidas, dependiendo de la concentración y formulación en la cual sean presentados. Algunos piretroides comunes utilizados para el control de plagas son la cipermetrina, deltametrina y la permetrina. Su mecanismo de acción se basa en la irrupción de los canales de sodio dependientes de voltaje en las membranas neuronales, evitando así su cierre y permitiendo la entrada continua de iones sodio a la neurona, causando una despolarización prolongada, lo que tiene consecuencias como hiperactividad, espasmos, parálisis y finalmente la muerte ([Soderlund, 2010, 2012](#)).

Figura 3. Ejemplos de uso común de las principales familias de acaricidas comerciales.



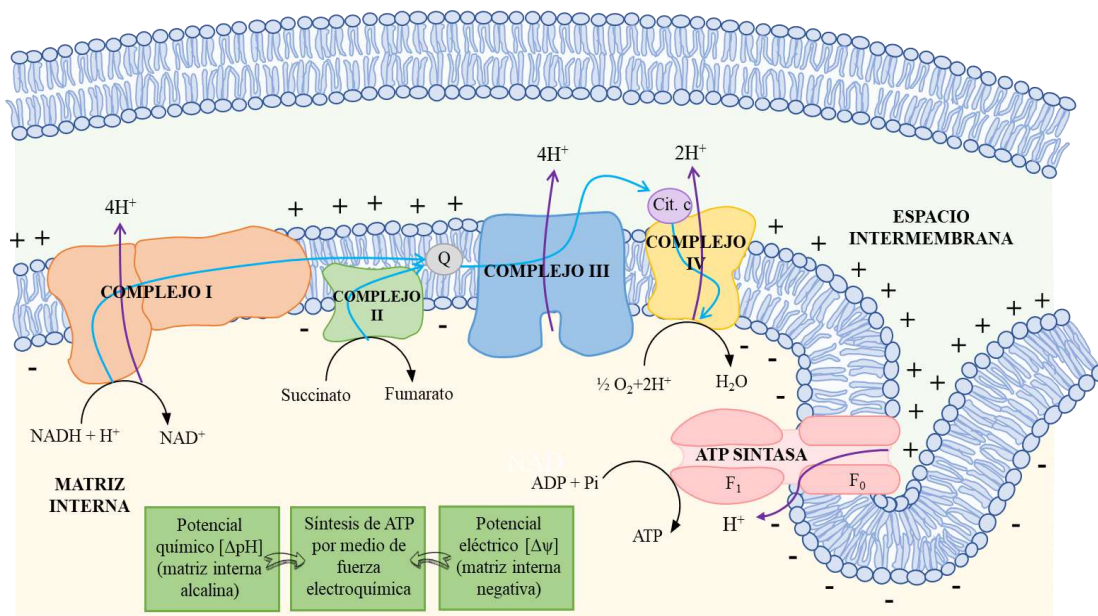
Nota. Estructuras realizadas con el software ChemDraw.

1.3.2. La mitocondria como diana farmacológica

La mitocondria es el principal organelo encargado de la producción de energía en forma de ATP. Esta función la realiza en presencia de oxígeno molecular y utiliza como sustrato el AcetilCoA, biomolécula producida en rutas metabólicas como la glucólisis y la β -oxidación ([Detmer & Chan, 2007](#)). La producción de energía se da por medio de procesos de óxido-reducción catalizados por cuatro complejos enzimáticos que se encargan de realizar un transporte de electrones desde los sustratos iniciales (NADH y succinato) hasta el oxígeno molecular, con el fin de generar un potencial de membrana causado por el movimiento de protones desde la matriz al espacio intermembrana a través de la membrana interna; potencial de membrana utilizado por la enzima ATP sintasa para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi ([Nelson & Cox, 2021](#); [Sousa et al., 2018](#)). En la figura 4 se puede observar el modelo general de la producción de energía por parte de las mitocondrias.

Existen varios acaricidas reportados con acción sobre la mitocondria, como por ejemplo la avermectina y el fipronil tienen efecto de inducción de apoptosis en células humanas, medido a través de la reducción de la respiración y la generación de especies reactivas de oxígeno ([Vidau et al., 2011](#); [Zhang et al., 2016](#)). Cualquier compuesto con efecto sobre algún complejo enzimático de la mitocondria puede causar disminución en la producción de ATP y posible actividad acaricida contra las garrapatas, por lo que para este proyecto se decidió trabajar con todos los complejos enzimáticos de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa.

Figura 4. Modelo de la producción de ATP por medio de la cadena respiratoria mitocondrial.



Nota. Basado en [Nelson & Cox \(2021\)](#).

1.3.2.1. Complejo I

Conocido como NADH deshidrogenasa, es un gran complejo enzimático compuesto por 42 cadenas polipeptídicas que se organizan en forma de L, con un brazo incrustado en la membrana interna y el otro dirigido hacia la matriz. Posee varios centros de hierro-azufre, que son los encargados de los procesos de oxidorreducción que transportan los electrones a través del complejo. Este complejo cataliza dos procesos, la oxidación del NADH a NAD⁺ y reducción de la ubiquinona a ubiquinol tomando dos protones de la matriz interna, y el movimiento de cuatro protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana (Ecuación 1). Este movimiento de protones hace que la matriz interna se cargue negativamente, mientras que el espacio intermembrana se cargue positivamente, generando un potencial de membrana. Por lo tanto, el complejo I funciona como una bomba de protones, al igual que otros complejos de la cadena

transportadora de electrones ([Nelson & Cox, 2021](#)). El funcionamiento de este complejo puede ser mejor observado en la figura 5.

Al ocurrir una inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones se disminuye la producción de energía por parte de la mitocondria de manera considerable, puesto que el complejo I no bombeará protones, y los electrones no serán transportados a la ubiquinona y por consiguiente al resto de complejos de la cadena transportadora de electrones; disminuyendo significativamente la formación del potencial de membrana. En algunos casos la inhibición del complejo I puede ser de beneficio, por ejemplo, se ha demostrado que puede ayudar en el tratamiento contra el cáncer, disminuyendo el crecimiento de estas células en diferentes órganos ([Yoshida et al., 2021](#)); o también se ha demostrado que usando metformina, la cual disminuye la actividad del complejo I, se puede contrarrestar el efecto de hepatotoxicidad del trióxido de arsénico ([Ling et al., 2017](#)).

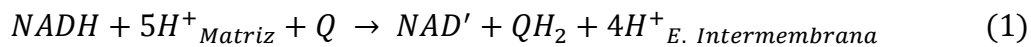
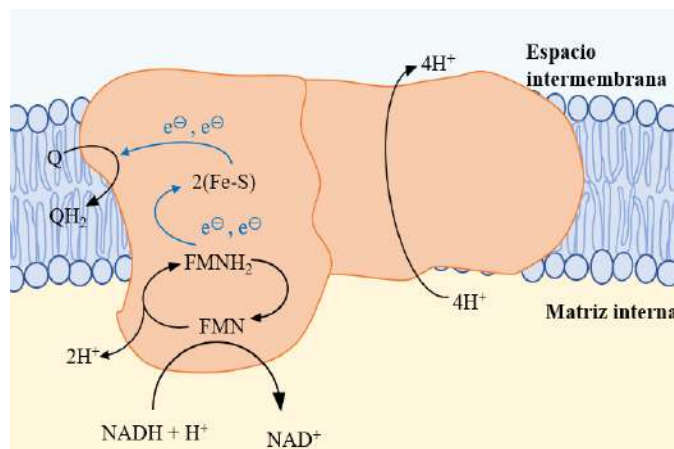


Figura 5. Modelo del complejo I mitocondrial.



Nota. Este complejo cataliza la oxidación del NADH a NAD⁺, los electrones son transportados a una molécula de flavín mononucleótido (FMN) el cual es reducido a FMNH₂. Después, el

FMNH₂ es oxidado nuevamente a FMN, y los electrones pasan a los centros de óxido reducción de hierro y azufre (Fe-S), en donde serán transportados hasta el sitio de unión de la ubiquinona (Q), que será finalmente reducida a ubiquinol (QH₂). Este transporte de electrones a la ubiquinona está acoplado al transporte de cuatro protones desde la matriz interna hasta el espacio intermembrana. Diagrama adaptado de [Nichols & Ferguson \(2014\)](#).

Existen diversos inhibidores conocidos del complejo I que pueden ser utilizados como posibles acaricidas pertenecientes a familias de compuestos químicos como pirazoles, piridinas, pirimidias y quinazolininas ([Lümmen, 1998](#)), las cuales han presentado resultados favorables en el control de plagas. Algunos de los más conocidos son la rotenona y la piericidina A, los cuales son insecticidas naturales producidos por plantas y bacterias ([Dalefield, 2017](#); [Gupta, 2014](#); [Zhou & Fenical, 2016](#)). La rotenona actúa específicamente en el paso de electrones desde los centros de hierro azufre hasta la ubiquinona, bloqueando así de manera total la cadena transportadora de electrones alimentada a través de NADH, disminuyendo la producción de ATP. Además, la transferencia incompleta de electrones por la cadena hacia el oxígeno molecular fomenta la generación de especies reactivas de oxígeno, que pueden llevar a la apoptosis ([Heinz et al., 2017](#)).

1.3.2.2. Complejo II

Conocido como succinato deshidrogenasa, es el segundo punto de alimentación de electrones de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, tomándolos de la oxidación del succinato para reducir la ubiquinona a ubiquinol (Ecuación 2), utilizando como cofactor el FADH₂ y centros de oxidoreducción de hierro-azufre. El complejo II no funciona como una bomba de protones, ya que no ayuda a la formación del potencial de membrana moviendo protones desde la matriz interna al espacio intermembrana de manera directa. Sin embargo, la ubiquinona producida con la ayuda de este complejo sí va a tener participación en la generación de este

potencial, por lo que el complejo II si es de importancia en la producción de ATP (Nelson & Cox, 2021). El funcionamiento de este complejo puede ser mejor observado en la figura 6.

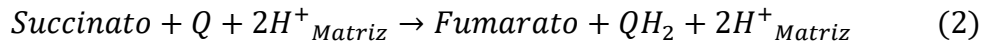
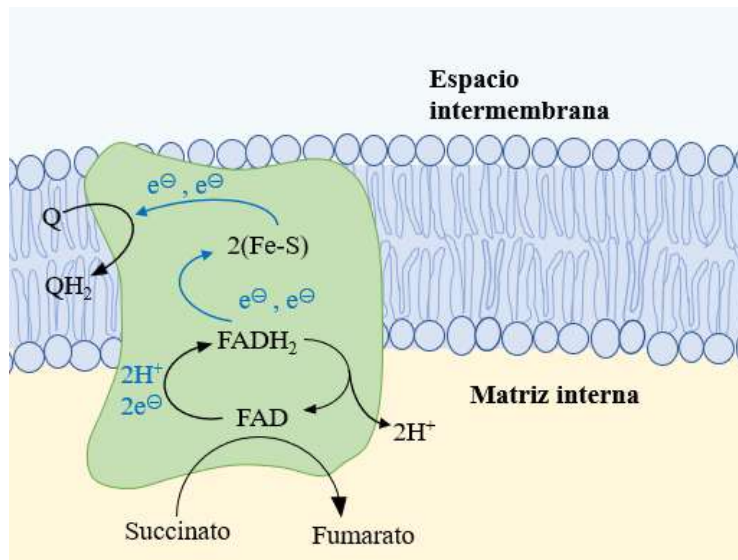


Figura 6 Modelo del complejo II mitocondrial.



Nota. Este complejo cataliza la oxidación del succinato a fumarato, los electrones son transportados a una molécula de flavina adenina dinucleótido (FAD) el cual es reducido a FADH₂. Después, el FADH₂ es oxidado nuevamente a FAD, y los electrones pasan a los centros de óxido reducción de hierro y azufre (Fe-S), en donde serán transportados hasta el sitio de unión de la ubiquinona (Q), que será finalmente reducida a ubiquinol (QH₂). Este transporte de electrones desde el succinato a la ubiquinona no está acoplado a un transporte de protones desde la matriz interna hasta el espacio intermembrana. Diagrama adaptado de [Nichols & Ferguson \(2014\)](#).

Además de su función en la cadena transportadora de electrones, también juega un papel importante en otro proceso biológico, el ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs. En este ciclo, realiza la misma reacción de oxidación del succinato a fumarato, el cual continuará con el ciclo

transformándose en malato. Por lo tanto, este complejo es de gran importancia y su inhibición puede generar diversos efectos adversos sobre el individuo ([Rustin et al., 2002](#); [Rutter et al., 2010](#)).

Existen diversos inhibidores del complejo II reportados, por ejemplo, el malonato, el cual es un inhibidor endógeno competitivo que interactúa con el complejo en el sitio de unión del succinato, impidiendo la oxidación del mismo y, por lo tanto, deteniendo el ciclo de Krebs, ya que no hay producción de fumarato ([Wojtovich & Brookes, 2008](#)). A su vez, también existen inhibidores del complejo II que han sido utilizados como productos para el control de plagas, como por ejemplo las carboxinas, que también actúan en el complejo II impidiendo la oxidación del fumarato ([Mowery et al., 1976](#)), o el trióxido de arsénico, que inhibe los complejos I y II, disminuyendo la producción de ATP y favoreciendo la producción de especies reactivas de oxígeno ([Hosseini et al., 2013](#)). Otras moléculas inhibitorias son la lonidamina ([Guo et al., 2016](#)), el ácido 3-nitropropionico ([Liot et al., 2009](#)) y el 2-teonil trifluoroacético (TTFA) ([Byun et al., 2008](#)).

1.3.2.3. Complejo III

Conocido como citocromo c reductasa, es un dímero compuesto por dos monómeros idénticos, cada uno con once subunidades. Cataliza dos procesos en la mitocondria, la transferencia de los electrones provenientes del complejo I y II a través del ubiquinol hacia el citocromo c, una pequeña proteína que se encuentra en el espacio intermembrana; y la transferencia de cuatro protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana (Ecuación 3), por lo que, al igual que el complejo I, es considerado una bomba de protones que ayuda de manera directa a la formación del potencial de membrana ([Nelson & Cox, 2021](#)). El funcionamiento de este complejo puede ser mejor observado en la figura 7.

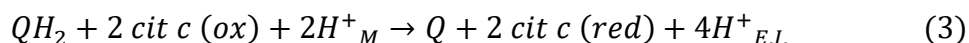
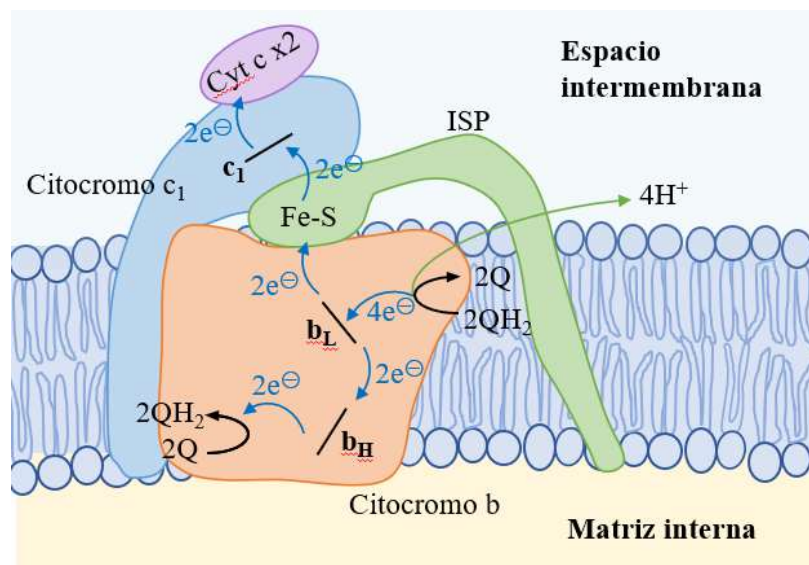


Figura 7. Modelo del complejo III mitocondrial.



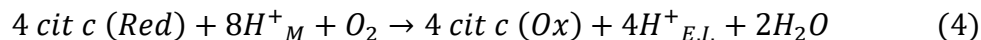
Nota. Este complejo cataliza la oxidación de el ubiquinol (QH₂) a ubiquinona (Q). En la subunidad Citocromo b, los electrones producidos de la oxidación del QH₂ son llevados a un grupo hemo de bajo potencial (b_L) donde toman dos rutas: En la primera, un par de electrones pasan al grupo hemo de alto potencial (b_H), donde son utilizados para volver a reducir la Q en QH₂, con el fin de que esta molécula siga con el ciclo de la ubiquinona. En la segunda, un par de electrones pasan a un centro de Fe-S de la subunidad ISP (Proteína de hierro-Azufre), para después ser transportados al citocromo c₁, que finalmente los llevará hasta el citocromo c. Este proceso está acoplado al transporte de cuatro protones al espacio intermembrana. Diagrama adaptado de [Nichols & Ferguson \(2014\)](#).

La inhibición del complejo III ha sido estudiada ampliamente debido a que, a diferencia de los complejos I y II, esta podría causar un paro total de la producción de ATP por parte de la mitocondria. Por esta razón, es de gran importancia en sectores de investigación como el tratamiento contra el cáncer, logrando disminuir el crecimiento de estas células ([Yang et al., 2021](#)). Existen diferentes inhibidores del complejo III reportados como posibles agentes de control contra

las plagas, por ejemplo, el acequinocil, que actúa en el sitio de unión del ubiquinol, impidiendo que los electrones sean transportados hacia el citocromo c ([Lu et al., 2023](#)). Otros inhibidores reportados son la azoxistrobina ([Gao et al., 2014](#)), la antimicina A ([Forkink et al., 2015](#)), el mixotiazol ([Davoudi et al., 2014](#)) la atovacuona ([Rodriguez-Berriguete et al., 2024](#)) y el kresoxim metil ([Flampouri et al., 2018](#)).

1.3.2.4. Complejo IV

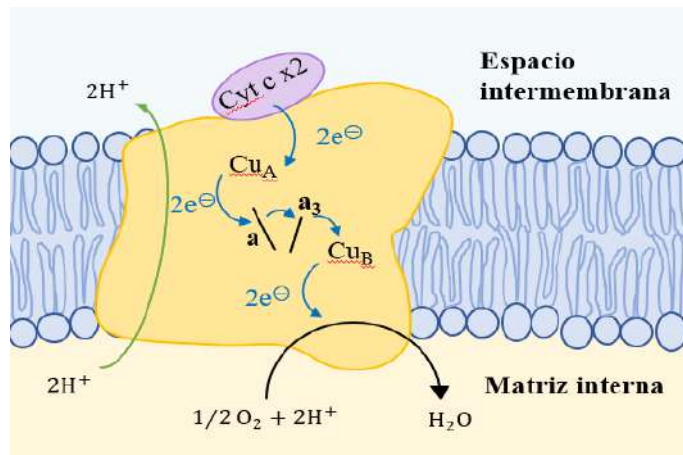
Conocido como citocromo c oxidasa, se compone de 13 cadenas polipeptídicas diferentes, con gran variedad de grupos prostéticos entre los que se encuentran centros hierro-azufrados, grupos hemo y dos iones de cobre que se acomplejan con los grupos -SH de dos residuos de cisteína, los cuales son de gran importancia para la actividad catalítica de la enzima. Este complejo cataliza dos procesos simultáneamente, la transferencia de los electrones del citocromo c reducido proveniente del complejo III hacia el oxígeno molecular para la formación de agua, y el movimiento de dos protones desde la matriz interna hacia el espacio intermembrana (Ecuación 4). Por lo tanto, al igual que los complejos I y III, este es considerado como una bomba de protones ([Nelson & Cox, 2021](#)). El funcionamiento de este complejo puede ser mejor observado en la figura 8.



Así como sucede en el complejo III, la inhibición del complejo IV puede detener por completo la actividad de producción de energía por parte de la mitocondria, pudiendo llegar a ser más problemática que las inhibiciones de los complejos I y II. Esto se puede evidenciar en enfermedades como la de Huntington y el Alzheimer, en las cuales la actividad de los complejos III y IV puede verse reducida en un 30-70% ([Kilbride et al., 2011](#)). Productos utilizados en el control de plagas como el malatión han sido reportados como inhibidores del complejo IV,

disminuyendo la actividad del mismo y potenciando la producción de especies reactivas de oxígeno (Delgado et al., 2006; Karami-Mohajeri et al., 2013). Otro inhibidor conocido del complejo IV es el cianuro, un inhibidor no competitivo que se une a la enzima con gran afinidad, impidiendo la transferencia de electrones hacia el oxígeno molecular, lo que previene la respiración del organismo, razón por la cual es tóxico para los seres vivos (Roberts et al., 2000). Otros inhibidores del complejo IV son el monóxido de carbono (Alonso et al., 2003) y la 6-hidroxidopamina (Glinka & Youdim, 1995).

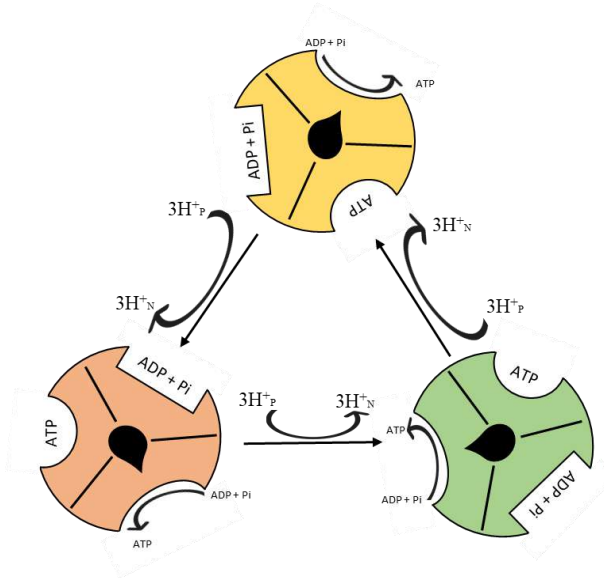
Figura 8. Modelo del complejo IV mitocondrial.



Nota. Este complejo cataliza la oxidación del citocromo c, entregando los electrones a un centro de cobre binuclear (Cu_A). El par de electrones después es transportado a un grupo hemo a, que después los entregará a un grupo hemo a_3 que forma un complejo binuclear con el centro de cobre mononuclear (Cu_B) creando el sitio catalítico donde ocurre finalmente la entrega de los electrones al oxígeno molecular, reduciéndolo a agua. Todo este proceso se encuentra acoplado al transporte de dos protones desde la matriz interna al espacio intermembrana. Diagrama adaptado de Nichols & Ferguson (2014).

El mecanismo por el cual funciona la ATP sintasa se conoce como síntesis rotacional, el cual fue propuesto por Paul Boyer en 1977, el cual puede ser observado en la figura 10. Consta de los cambios conformacionales producidos en las subunidades $\alpha\beta$ del complejo F1, provocados por el giro de la subunidad Fo cuando hay flujo de protones hacia la matriz interna. Los cambios conformacionales confieren a cada subunidad $\alpha\beta$ diferente afinidad por los sustratos. La conformación β -ADP, que es donde comienza el ciclo de producción de ATP, tiene mayor afinidad por los sustratos ADP y pi, que se encuentran en el medio. Una vez se han unido a la subunidad, ésta cambia a una conformación β -ATP, en la cual acerca el ADP y el Pi, favoreciendo la unión de los dos sustratos a través de un enlace fosfodiéster y formando una molécula de ATP. Finalmente, la subunidad $\alpha\beta$ cambia a una conformación de β -vacío, en la cual tiene poca afinidad por el ATP, liberándolo en la matriz interna y volviendo a la conformación β -ADP para iniciar nuevamente el ciclo ([Nelson & Cox, 2021](#)).

Figura 10. Esquema del mecanismo de catálisis rotacional.



Nota. Diagrama adaptado de [Nelson & Cox \(2021\)](#).

En el mercado existen muchos productos cuyo principio activo tiene como mecanismo la inhibición de la ATP sintasa para la reducción de la producción de energía de insectos, ácaros y arácnidos. Entre ellos se puede mencionar compuestos organoclorados como el DDT/DDE que afectan tanto complejo II, III y ATP sintasa ([Elmore & La Merrill, 2019](#)), el monocrotofos, que ha sido prohibido en varios países debido a sus efectos nocivos sobre la salud humana, y que ha sido demostrado afecta de manera directa la producción de ATP por parte de la ATP sintasa ([Venkatesh et al., 2009](#)). Compuestos organofosforados como el malatión, que además de afectar la ATP sintasa tienen efecto directo sobre el complejo I y IV ([Karami-Mohajeri et al., 2013](#); [Kilbride et al., 2011](#)), los estilbenos, las flavonas e isoflavonas, los metabolitos estrógenos, algunos fitoquímicos polifenólicos entre otros ([Sangjin & L, 2008](#)).

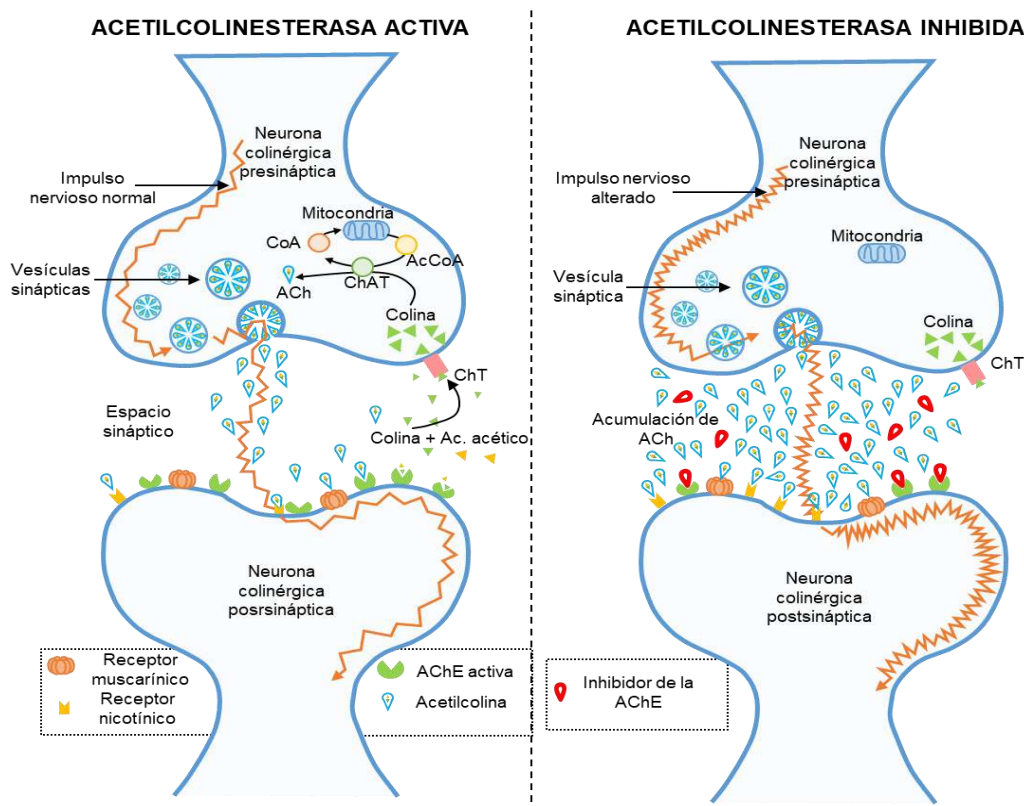
El proceso de fosforilación oxidativa realizado por las mitocondrias es fundamental para la respiración celular y tiene una gran relevancia biológica, ya que aproximadamente el 90% de la energía de la célula se produce allí ([Karp et al., 2020](#)). Por lo tanto, la inhibición de cualquier complejo enzimático perteneciente a la cadena transportadora de electrones o la ATP sintasa puede ser fatal para un organismo. Esta inhibición ha sido descrita como mecanismo de acción de algunas moléculas derivadas de aceites esenciales, como se ha comprobado en mitocondrias aisladas de hígado de rata ([Montagut et al., 2022](#)) o en mitocondrias aisladas de larvas de *Aedes aegypti* ([Castillo-Morales et al., 2019](#)).

1.3.3. La acetilcolinesterasa como diana farmacológica

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima neuronal que se encuentra principalmente en las uniones neuronales y neuromusculares. Es una enzima de gran importancia en la transmisión de señales eléctricas, ya que cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en acetato y colina, permitiendo su reabsorción y posterior síntesis en el interior de la neurona. Gracias a la

descomposición de la acetilcolina por parte de la AChE los impulsos nerviosos son momentáneos y no continuos, lo que es de gran importancia para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. La inhibición de la AChE perjudica en gran manera la transmisión de señales entre neuronas y entre neurona-músculo, debido a que la señal pasará de ser momentánea a ser continua, causando efectos adversos como la pérdida de la memoria, pérdida de la coordinación muscular, fatiga neuronal, desensibilización de los receptores postsinápticos, espasmos y contracciones musculares, parálisis e incluso la muerte (Caro-Gamboa et al., 2020).

Figura 11. Esquema de actividad neuronal con la AChE normal e inhibida.



Nota. Comparación de la actividad sináptica neuronal normal (izquierda) y en presencia de un inhibidor de la acetilcolinesterasa (derecha). Basado en Caro-Gamboa et al. (2020).

La AChE es la principal diana farmacológica de los acaricidas actuales. Diversos productos utilizados hoy día como control de las garrapatas tienen efecto inhibitorio sobre esta enzima, por

ejemplo, los organofosforados, los cuales se unen a la enzima AChE evitando así la hidrólisis de la acetilcolina. Algunos ejemplos de estos compuestos son el malatión, clorpirifos, fenitrotión, entre otros ([Colovic et al., 2013](#)).

1.4. Metabolitos secundarios de plantas como alternativa para el control de las garrapatas

En los últimos años, la industria ha mostrado gran interés en los acaricidas y repelentes derivados de plantas, ya que ofrecen una alternativa prometedora para contrarrestar los efectos adversos de los acaricidas sintéticos, ayudando a reducir la resistencia de las garrapatas y minimizando los efectos dañinos sobre el medio ambiente y la salud humana ([Benelli & Pavela, 2018](#); [Ghosh et al., 2012](#); [Quadros et al., 2020](#)). Los aceites esenciales de plantas y sus metabolitos secundarios han demostrado una notable capacidad acaricida y repelente en garrapatas. Por ejemplo, los extractos de *Lippia triplinervis* ([Monteiro et al., 2021](#)), *Cinnamomum verum* ([Monteiro et al., 2017](#)), *Lithraea brasiliensis* ([da Silva et al., 2021b](#)) y *Melinis minutiflora* ([Mwangi et al., 1995](#)) han mostrado una alta eficacia contra diversas especies de garrapatas, incluida *R. microplus*, logrando concentraciones letales 50 (CL₅₀) y concentraciones repelentes 50 (CR₅₀) comparables a las de compuestos sintéticos utilizados normalmente en la industria. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que, aunque los aceites esenciales son una buena alternativa como acaricidas y repelentes naturales, sus metabolitos secundarios aislados pueden tener efectos más potentes sobre las plagas. Estos compuestos aislados han logrado concentraciones letales del cincuenta por ciento de la población de individuos (CL₅₀) más bajas, debido a la ausencia de otras moléculas que no afectan al artrópodo objetivo ([Mota et al., 2022](#)).

Existe gran variedad de metabolitos secundarios de plantas que tienen capacidad acaricida o repelente contra las garrapatas. Algunos a destacar son los monoterpenos como el α -pineno ([Govindarajan et al., 2016](#)), β -citronelol ([Ferreira, et. al., 2017](#)), el timol ([Cruz et al., 2013](#)), el

eucaliptol, el linalool y el limoneno ([Badawy et al., 2010](#)) entre otros, aislados de diferentes plantas medicinales, presentando actividad acaricida y repelente sobre garrapatas en sus diferentes estadios. También es de anotar la actividad de sesquiterpenos como el nootkatone, evaluado contra ninfas de la especie de garrapata *Ixodes scapularis* obteniendo CL₅₀ menores a 0.01% p/v ([Panella et al., 2005](#)), fenilpropanoides como el eugenol, con valores de CL₅₀ de 0.467% p/v contra larvas de *R. microplus* ([Araújo et al., 2016](#)) o naftoquinonas como la plumbagina, evaluada en larvas de *R. microplus* y *R. sanguineus*, con valores de CL₅₀ de 0.011 y 0.017% p/v respectivamente ([Gutiérrez-Wong et al., 2023](#)).

El carvacrol es un monoterpeno extraído principalmente de las plantas de orégano. Ha sido reportado en varias ocasiones como un potente acaricida teniendo efectos mortales en larvas de *R. microplus* y *R. sanguineus*, presentando valores de CL₅₀ de 1.76 y 3.29 mg/mL respectivamente ([Araújo et al., 2016](#)), además de presentar efectos sinérgicos con el timol y la cipermetrina, reduciendo las dosis letales en larvas de *R. microplus* ([Novato et al., 2022](#)).

1.4.1. Actividad del carvacrol y otros monoterpenos sobre el metabolismo mitocondrial

Los monoterpenoides han sido reportados como posibles inhibidores de la cadena transportadora de electrones en varios estudios, especialmente a nivel de interacciones con la membrana mitocondrial e inhibiciones de la actividad del complejo I y ATP sintasa ([Uribe et al., 1991](#)). Monoterpenos como el β -pineno y el limoneno han mostrado efectos inhibitorios en mitocondrias de hígado de rata, generando un incremento en la permeabilidad pasiva de las membranas, e induciendo un descenso de la respiración mitocondrial utilizando succinato como sustrato, siendo posiblemente causado por una inhibición en la cadena transportadora de electrones ([Uribe et al., 1984](#)). Por otro lado, los monoterpenos también han demostrado actividad indirecta sobre la mitocondria, reduciendo la producción de compuestos necesarios para su correcto

funcionamiento; como el alcohol perilífico, el cual inhibe la síntesis de la coenzima Q, esencial para llevar los electrones de los complejos I y II al complejo III ([Ren & Gould, 1994](#)).

Por su parte, el carvacrol ha demostrado tener efectos adversos sobre las mitocondrias. [Deb et al. \(2011\)](#) realizó un estudio sobre los efectos de una nanoemulsión de carvacrol sobre la línea celular A549 de adenocarcinoma pulmonar humano, encontrando efectos citotóxicos sobre las células causados por un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, llevando a la muerte celular por apoptosis. Resultados similares fueron encontrados por [Yin et al. \(2012\)](#) en su estudio del efecto del carvacrol sobre células HepG-2 de carcinoma hepatocelular humano y por [Deb et al. \(2011\)](#) del efecto del timol, un isómero de carvacrol, sobre células HL-60 de leucemia promielocítica aguda. En ambos casos, se encontró que la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de estos compuestos llevó a la muerte celular de las células cancerígenas por apoptosis.

El carvacrol también ha mostrado efectos inhibitorios sobre mitocondrias aisladas de hígado de rata, encontrando concentraciones inhibitorias 50 (IC₅₀) de 22.8 ppm sobre el consumo de oxígeno a través de NADH y 255 ppm a través de succinato, 46 ppm sobre la actividad de NADH deshidrogenasa (Complejo I) y 255 ppm sobre la actividad de citocromo c reductasa (Complejo III) ([Monzote et al., 2009](#)).

Finalmente, se ha estudiado la actividad de compuestos sobre las mitocondrias de garrapatas *R. microplus*, como se muestra en la investigación de [Braz et al. \(2019\)](#), donde probaron el efecto inhibitorio del 3-bromopiruvato sobre la actividad mitocondrial en huevos y la línea celular embrionaria BME26 de *R. microplus*, encontrando una reducción en el consumo de oxígeno y en la actividad de la NADH y succinato citocromo c reductasa.

1.4.2. Actividad del carvacrol y otros monoterpenos sobre la acetilcolinesterasa

Varios monoterpenos han mostrado actividad inhibitoria sobre la actividad de la acetilcolinesterasa. Por ejemplo, el (+) y (-)- α -pineno y el (+)-3-careno demostraron los mejores resultados de inhibición de la enzima de entre diecisiete monoterpenos cíclicos, con unas CI₅₀ de 0.40, 0.44 y 0.20 mM respectivamente ([Miyazawa & Yamafuji, 2005](#)). Por otro lado, se ha estudiado la actividad de monoterpenos como el (+)-limoneno, el (+)-sabineno y el trans-anetol sobre la acetilcolinesterasa, obteniendo CI₅₀ de 225.9 ppm, 176.5 ppm y 134.7 ppm, respectivamente ([Menichini et al., 2009](#)).

El carvacrol ha mostrado tener actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa en diferentes especies de artrópodos como la mosca doméstica (*Musca domestica*), el mosquito de fiebre amarilla (*Aedes aegypti*), la garrapata de perro americana (*Dermacentor variabilis*) y la cucaracha americana (*Periplaneta americana*), teniendo una CI₅₀ de 0.3 ppm para *Aedes aegypti* ([Anderson & Coats, 2012](#)). Además, junto a su isómero, el timol, también ha mostrado actividad sobre la acetilcolinesterasa comercial de la anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*), teniendo una inhibición del 50% a 63 ppm para el carvacrol y 740 ppm para el timol ([Jukic et al., 2007](#)). Finalmente, la inhibición de la acetilcolinesterasa en larvas de *R. microplus* ha sido estudiada para alcaloides como la piperina y la berberina ([da Silva et al., 2021a](#)), donde esta última obtuvo una CI₅₀ de 24.6 ppm.

Con base en estos antecedentes se plantearon los siguientes objetivos para este trabajo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de dos compuestos, metabolitos secundarios de plantas con actividad ixodicida, sobre la actividad de la acetilcolinesterasa y el metabolismo bioenergético mitocondrial de *Rhipicephalus microplus*.

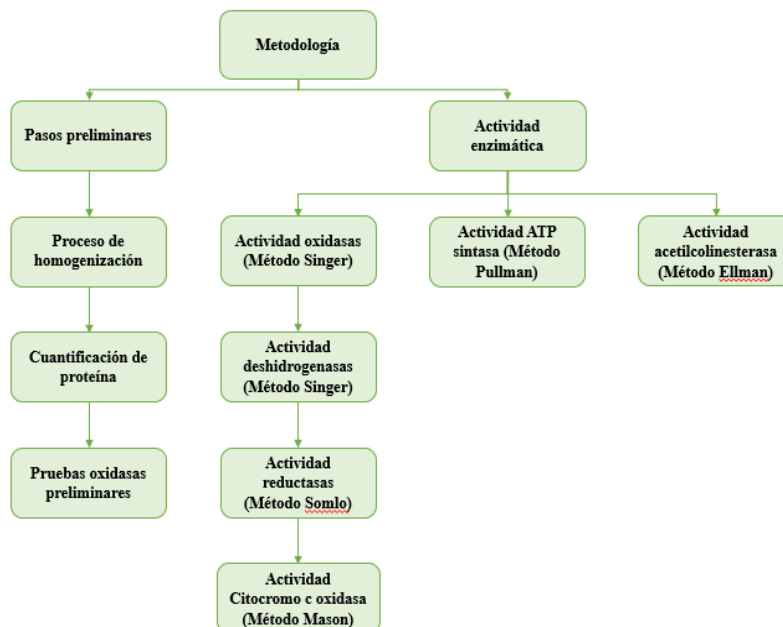
2.2 Objetivos Específicos

- Establecer protocolos de aislamiento y evaluación de actividad enzimática de acetilcolinesterasa y enzimas mitocondriales usando como modelo garrapatas *R. microplus*.
- Evaluar el efecto de dos compuestos acaricidas, carvacrol y quercetina, sobre proteínas mitocondriales y la acetilcolinesterasa de *R. microplus*.

3. Metodología

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos se propuso la siguiente metodología:

Figura 12. Esquema metodológico general.



A cada ensayo se le realizó su correspondiente análisis estadístico como se describe en la sección

3.4. Análisis estadístico

3.1.1. Material biológico

El material biológico utilizado consistió en larvas de la garrapata *R. microplus*, las cuales se obtuvieron a partir de hembras ingurgitadas recolectadas en la finca “El paraíso agroecoturístico” ubicada en Betulia, Santander. Las garrapatas hembras ingurgitadas fueron trasladadas al laboratorio de entomología médica del Grupo de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP) ubicado en la sede Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander. Allí fueron almacenadas en frascos hasta la oviposición. Los huevos fueron transferidos a tubos eppendorf de 2 mL tapados con algodón, el cual fue humedecido diariamente con el fin de mantener la humedad entre el 80 y 90%. Una vez se inició la eclosión de los huevos, se esperó a que las larvas tuvieran entre 21 y 60 días de edad para los análisis enzimáticos.

3.1.2. Protocolo de homogenización y cuantificación de proteína de larvas *R. microplus*

Se tomaron entre 150 y 500 mg de larvas de *R. microplus* previamente refrigeradas a 4°C durante 10 minutos y se dispusieron en un mortero previamente atemperado en una cama de hielo. Se adicionaron de 300 a 1000 µL de medio de homogenización, este medio consistió en una solución de sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM y EGTA 1 mM a un pH de 7.2, y se realizó la maceración de las larvas. La maceración se hizo de dos formas, una maceración suave, donde las larvas eran aplastadas con el mango del mortero de manera que el exoesqueleto de quitina no fuese destruido completamente, pero si se pudiese extraer todo el interior. Y un macerado fuerte, en donde las larvas eran aplastadas con mayor fuerza, de forma que el exoesqueleto de quitina quedase totalmente destruido, obteniendo al final un extracto mucho más viscoso que el obtenido en el macerado suave. Una vez hecha la maceración, el extracto de las larvas se dispuso en un eppendorf

y se realizó una serie de centrifugaciones a 300 x g por 10 minutos con el fin de eliminar el precipitado que contenía todos los rastros de quitina y así obtener un extracto más limpio sin residuos sólidos. Finalmente, se realizó la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford ([Bradford, 1976](#)).

3.1.3. Pruebas oxidasas preliminares

Con los dos tipos de macerado se realizaron pruebas piloto de los ensayos enzimáticos de succinato y NADH oxidasa, con el fin de determinar el método ideal de maceración y las concentraciones de proteínas totales de larvas de garrapata *R. microplus* necesarias para la obtención de resultados lo suficientemente elevados para evaluar el efecto de compuestos xenobióticos sobre las enzimas. La metodología para la medición de estos dos ensayos enzimáticos será especificada más adelante (Sección 3.2.1).

3.2. Determinación de la actividad enzimática mitocondrial

La actividad de las enzimas de la cadena transportadora de electrones se evaluó mediante un espectrofotómetro Multiscan GO ((Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) utilizando el programa SkanIt, y de manera polarográfica utilizando un oxígrafo de alta resolución Oroboros O2k-Respirómetro manipulado por el programa Oroboros DatLab CD. Se evaluó la actividad de un metabolito secundario, el carvacrol, el cual tuvo resultados notables de mortalidad en ensayos *in vivo* realizados previamente en el grupo de investigación y fue adquirido a través de Sigma Aldrich.

La evaluación de la actividad del carvacrol sobre el metabolismo bioenergético mitocondrial se llevó a cabo por medio de 5 fases experimentales que fueron: la evaluación de la inhibición de toda la cadena transportadora de electrones a través de los ensayos de NADH y succinato oxidasa, la evaluación de la inhibición de los complejos I y II a través de los ensayos de

NADH y succinato deshidrogenasas, la evaluación de la inhibición del complejo III a través de los ensayos de NADH y succinato citocromo c reductasas, la evaluación de la inhibición del complejo IV a través del ensayo de citocromo c oxidasa y finalmente la evaluación de la inhibición de la ATP sintasa.

3.2.1. Evaluación de las oxidasas (NADH oxidasa y succinato oxidasa)

Se evaluó la actividad de la cadena transportadora de electrones alimentada por la oxidación del NADH a través del complejo I y succinato a través del complejo II por el método de Singer ([Singer, 1974](#)). El sistema de reacción consistió de buffer fosfato 80 mM (pH 7.4), EDTA 50 μ M y 0.6 mg/mL de proteína mitocondrial bajo agitación y temperatura constante a 25°C. Posteriormente se adicionó el sustrato (NADH 0.17 mM o succinato de sodio 10 mM) y se midió su velocidad de oxidación en ausencia y presencia de carvacrol mediante la velocidad de consumo de oxígeno molecular medida a través del oxígrafo.

3.2.2. Evaluación de las deshidrogenasas (NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa)

Se evaluó la actividad de las enzimas NADH y succinato deshidrogenasas por medio del método de Singer ([Singer, 1974](#)). El medio de reacción constó de buffer fosfato 50 mM a pH 7.4, EDTA 2 mM, 0.2 mg de proteína mitocondrial, rotenona 1 μ M, KCN 1 mM y sustrato (NADH 0.15 mM o succinato 20 mM). El medio de reacción fue incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente se adicionó el receptor artificial de electrones (ferricianuro de potasio 0.6 mM para la NADH deshidrogenasa y fenazina metosulfato (PMS) 1 mM y 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP) 60 μ M para la succinato deshidrogenasa), monitoreando la reacción de oxidación del sustrato y reducción del receptor artificial de electrones a 420 nm para la NADH deshidrogenasa y 600 nm para la succinato deshidrogenasa en ausencia y presencia de carvacrol.

3.2.3. Evaluación de las reductasas (NADH citocromo c reductasa y succinato citocromo c reductasa)

Se evaluó la actividad de las enzimas NADH y succinato citocromo c reductasas mediante el método de Somlo ([Somlo, 1965](#)). El sistema de reacción estaba compuesto por buffer fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, 0.2 mg de proteína mitocondrial, KCN 1mM y sustrato (NADH 50 μ M o succinato de sodio 5 mM) incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se dio inicio a la reacción mediante la adición de citocromo c oxidado (40 μ M), monitoreando su velocidad de reducción a 550 nm en ausencia y presencia de carvacrol.

3.2.4. Evaluación de la citocromo c oxidasa

Se evaluó la actividad de la enzima citocromo c oxidasa mediante el método de Mason ([Mason et al., 1973](#)). El sistema de reacción estaba compuesto por buffer fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, y 0.2 mg de proteína mitocondrial. El sistema fue incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se inició la reacción con la adición de citocromo c reducido 30 μ M, monitoreando su velocidad de oxidación a 550 nm en ausencia y presencia de carvacrol.

3.2.5. Evaluación de la ATP sintasa

La actividad de la ATP sintasa se determinó por medio del método Pullman ([Pullman et al., 1960](#)) cuantificando el fosfato resultante de la hidrólisis de ATP. El sistema de reacción estaba compuesto por una solución tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), sulfato de magnesio 3 mM, 1 mg de proteína mitocondrial, fosfoenolpiruvato (PEP) 2.5 mM y 10 unidades (U) de piruvato quinasa, incubado a temperatura ambiente durante diez minutos. Se dio inicio a la reacción con la adición de ATP (4 mM), y se interrumpió transcurrido diez minutos con la adición de ácido tricloroacético (TCA) al 5% v/v. Después, se hizo una centrifugación a 10000 xg durante 1 minuto,

descartando el precipitado y separando el sobrenadante obtenido, al cual se le realizó la cuantificación de fosfato a través de colorimetría.

El sobrenadante se mezcló en relación 1:1 con el reactivo C, compuesto por dos volúmenes de agua tipo I, un volumen de ácido sulfúrico 6N, un volumen de molibdato de amonio al 2.5% y un volumen de ácido ascórbico al 10%. Se dejó incubando por 2 horas a 37°C, y finalmente, se midió la absorbancia a 820 nm y se calculó la concentración de fosfato utilizando una curva de calibración de patrones de fosfato en concentraciones de 1 y 300 µM que fue realizada de manera previa a este ensayo ([Chen et al., 1956](#)).

3.3. Determinación de la actividad sobre la acetilcolinesterasa

La actividad de la acetilcolinesterasa se midió a través del método Ellman ([Ellman et al., 1961](#)). En el cual se busca medir la velocidad de formación de la tiocolina producida por la hidrólisis de la acetiltiocolina, la cual se hizo reaccionar con el ion 5,5-bis-2-nitrobenzoato (DTNB), formando el ion ácido 2-nitro, 5-mercapto-benzoico (TNB-), confirmando el progreso de la reacción con una coloración amarilla.

El medio de reacción estaba compuesto de una solución buffer PBS (Na₂HPO₄ 8 mM, NaH₂HPO₄ 2.3 mM, NaCl 0.15 M, pH=7.5) y una suspensión de homogenizado de larvas de *R. microplus* como fuente enzimática a 0.2 mg/mL. Se incubó por diez minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 100 µL de sustrato (DTNB 0.2 mM, yoduro de acetilcolina 0.24 mM y NaH₂HPO₄ 54.4 mM). La reacción fue monitoreada por una hora a 405 nm.

3.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los diferentes ensayos enzimáticos se representaron en los resultados por la media ± desviación estándar (SD) de tres ensayos independientes, en los cuales se realizaron tres réplicas. Estos datos fueron analizados utilizando el software Statistica 10.0

mediante análisis de normalidad seguido de un análisis de varianza ANOVA en una vía junto a la prueba de Tukey para la comparación de medias; además de pruebas t para datos paramétricos. Los resultados que tuviesen un valor $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos con respecto al control.

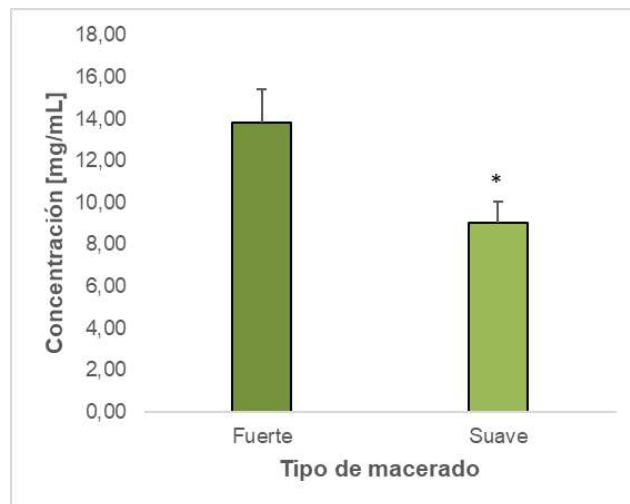
4. Resultados y discusión

4.1. Pasos preliminares

Dos metodologías de maceración fueron evaluadas, una maceración suave sin rompimiento total del exoesqueleto de quitina, y un macerado fuerte con rompimiento total del exoesqueleto de quitina, esto con el fin de determinar con cuál de los dos se obtenía una mayor concentración de proteína total y mejores resultados en la evaluación de consumo de oxígeno.

La cuantificación de la concentración de proteína total obtenida por ambos métodos de maceración se realizó por el método de Bradford, y se obtuvieron los resultados observados en la figura 13.

Figura 13. Comparación de la concentración de proteína total de los dos métodos de macerado.



Nota. El promedio de concentración para el macerado fuerte fue de 13.83 ± 1.56 y para el

macerado suave de 9.03 ± 1.03 . Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y prueba t para datos no pareados. (*) representa diferencias significativas ($p < 0.05$).

Como se observa en la figura 13 la concentración de proteína obtenida por el método de maceración fuerte es mayor a la obtenida por el método de maceración suave. Por lo que, en principio, el método de maceración fuerte es más viable, ya que se necesita menor cantidad de volumen a adicionar a cada ensayo enzimático, teniendo en cuenta que para ambos métodos se obtiene el mismo volumen final. Sin embargo, fue necesario realizar las pruebas enzimáticas preliminares, para evaluar la funcionalidad de las proteínas mitocondriales.

Es de anotar que antes de cada ensayo enzimático se realizó la extracción de proteína total y se mantuvieron para su uso hasta máximo una semana de almacenamiento bajo refrigeración a -20°C .

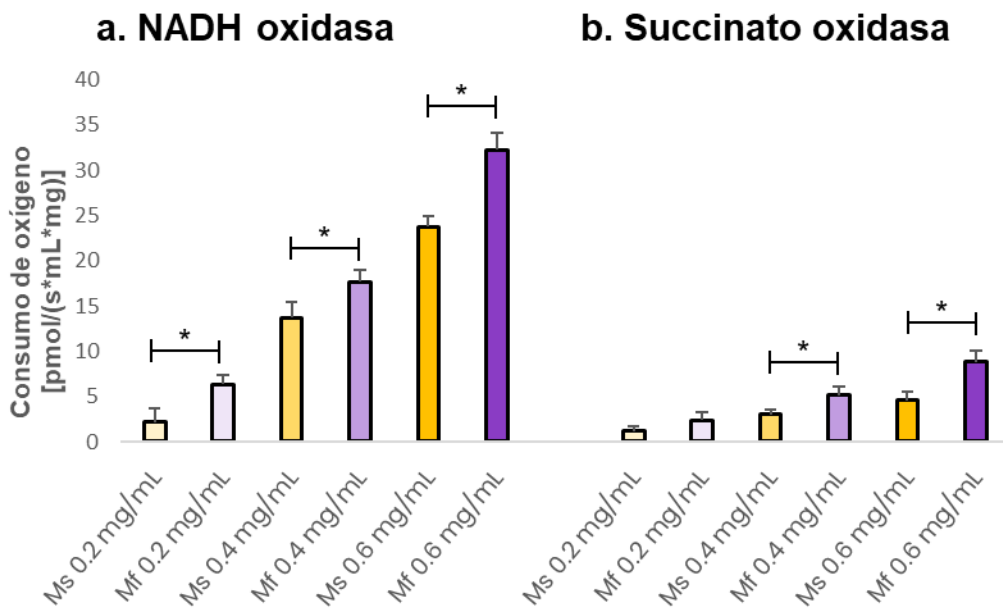
4.1.1. Pruebas oxidasas preliminares

Se hicieron las pruebas de NADH y Succinato oxidasa con los extractos obtenidos a partir de los dos tipos de maceración, suave y fuerte, con el fin de determinar la concentración y método de extracción de proteínas totales ideal para obtener resultados cuya reducción causada por el carvacrol fuese medible y significativa con respecto al control.

En la figura 14, se muestran los resultados de las pruebas preliminares de NADH y succinato oxidasa para la determinación de la concentración y método de maceración ideal de proteína total. Como se aprecia, con la concentración de 0.6 mg/mL se obtuvo un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno lo suficientemente alto como para que la reducción de la actividad de la NADH oxidasa causada por el carvacrol pudiese ser medida, por lo que se concluyó que esta concentración es la ideal para la determinación de la actividad de las oxidasas. Sin embargo, a la misma concentración de proteína, se obtuvo una actividad mucho menor para la

succinato oxidasa, por lo que primero se procedió a estipular la viabilidad de este ensayo experimentalmente, determinando la concentración de extracto proteico necesario para obtener resultados similares a los obtenidos para la NADH oxidasa. Por otro lado, se observan unos aumentos de velocidad de consumo de oxígeno mayores para el método de maceración fuerte, razón por la cual este fue el método de maceración escogido para el resto de ensayos enzimáticos con tejido permeabilizado de *R. microplus*. Esta diferencia se puede atribuir a que, al aumentar la fuerza de maceración, se garantiza una mayor fragmentación de las membranas mitocondriales, teniendo una mayor concentración de proteínas de la cadena transportadora de electrones en el medio.

Figura 14. Determinación de la concentración ideal para la medición de oxidasas.



Nota: Mf: método de maceración fuerte (Gráficas moradas) y Ms: método de maceración suave (Gráficas amarillas). a) Evaluación de consumo de oxígeno usando NADH como sustrato oxidable. b) Evaluación de consumo de oxígeno usando succinato como sustrato oxidable. Se

realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y un análisis ANOVA con comparaciones múltiples por Tukey. (*) representa diferencias significativas ($p < 0.05$).

Es de anotar que la homogenización de tejidos biológicos utilizando métodos mecánicos como el mortero es ampliamente usada, ya que es una alternativa sencilla, económica y que presenta buenos resultados de lisis celular y liberación de proteínas en el medio, siendo principalmente utilizada en tejidos previamente refrigerados. Estos métodos mecánicos son principalmente usados en la maceración de células de mamíferos e insectos ([Bauer & Schnapp, 2007](#); [Mirhassani & Seyedjafari, 2016](#)). Por ejemplo, en investigaciones orientadas en la evaluación de la toxicidad de compuestos como el spinetoram y la cihalotrina en larvas de *Apis mellifera*, así como su impacto en la actividad de la acetilcolinesterasa y en las enzimas antioxidantes, se empleó una metodología de maceración utilizando un mortero y pistilo de larvas previamente refrigeradas a -80°C . Este procedimiento exige la aplicación de una presión constante y controlada para asegurar la correcta desintegración de los tejidos, facilitando así la extracción y análisis de la toxicidad sobre las enzimas evaluadas ([Choi et al., 2024](#)). Asimismo, el estudio del contenido de quitina en insectos realizado por [Henriques et. al. \(2020\)](#) demostró que la maceración con mortero y pistilo presenta resultados equiparables con los obtenidos mediante homogenización con un homogenizador Dounce, obteniendo resultados similares en términos de rendimiento y calidad de las muestras. Estas metodologías muestran la importancia de la elección del método de homogenización en función del tipo de análisis a realizar, posicionando a los métodos mecánicos como el motero y pistilo como estrategias viables en los análisis de artrópodos. Sin embargo, estos métodos pueden presentar ciertas desventajas como riesgos de contaminación de la muestra por agentes externos como bacterias o micro partículas presentes en el ambiente ([Burden, 2012](#)).

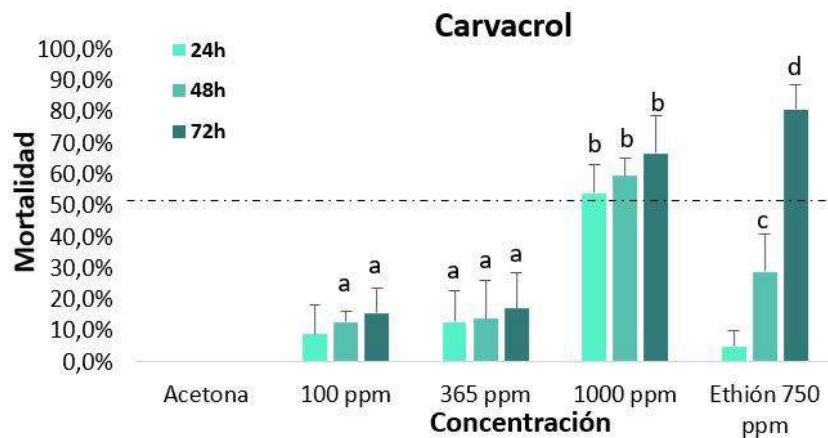
4.1.2. Metabolitos a evaluar

En un principio se seleccionaron dos metabolitos para evaluar su actividad sobre la mitocondria y la acetilcolinesterasa, estos fueron la quercetina y el carvacrol, esto teniendo en cuenta los resultados del Docking molecular que se había realizado en las distintas enzimas mitocondriales y la acetilcolinesterasa en el trabajo titulado “Estudio *in silico* e *in vivo* de metabolitos secundarios de plantas con posible acción inhibitoria sobre proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa de *Rhipicephalus microplus*” de [Alfonso et. al. \(2024\)](#), en el que se realizaron las pruebas *in vivo* de estos dos metabolitos, de los cuales el único que tuvo una actividad acaricida a una concentración similar al control utilizado (Etión a 750 ppm) fue el carvacrol, que tuvo una concentración letal 50 de aproximadamente 650 ppm bajo el método de paquete larval. A continuación, se muestran los resultados de Alfonso et. al. (2024) del carvacrol y quercetina en concentraciones de 100, 365 y 1000 ppm bajo el ensayo de paquete larval.

Como se observa en la figura 16, la mortalidad de la quercetina a la máxima concentración no superó el 15%, por lo que no es viable llevar este metabolito a análisis enzimático. Además de la baja mortalidad, los compuestos no hidrosolubles a evaluar en el oxígrafo se preparan en una solución de DMSO al 0.1%; y la quercetina tiene una baja solubilidad en este solvente, pudiendo tener residuos sólidos en la solución, lo que puede generar interferencias con los electrodos del equipo.

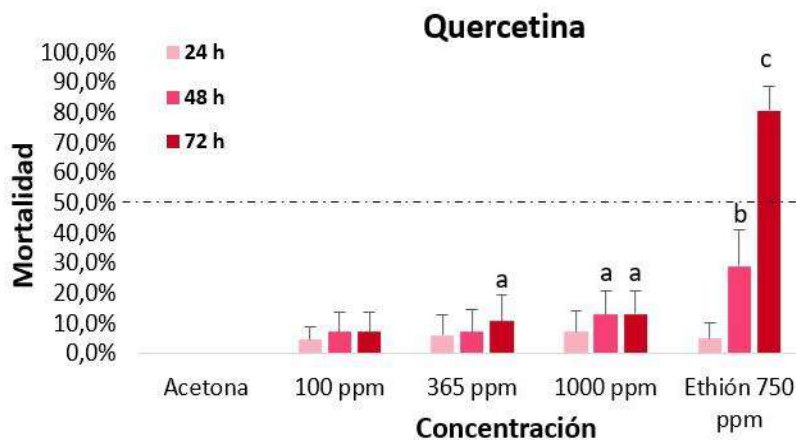
Por estas dos razones, se decidió no evaluar la quercetina, y centrarse únicamente en la determinación del protocolo de extracción de proteína de larvas de *R. microplus* y la actividad del carvacrol sobre el metabolismo bioenergético mitocondrial y la acetilcolinesterasa.

Figura 15. Resultados de mortalidad del carvacrol en larvas de *R. microplus* bajo la metodología de paquete larval.



Nota. La acetona corresponde al control negativo y el etión al control positivo. El análisis y resultados completos de este ensayo pueden ser encontrados en el trabajo de grado [Alfonso et. al. \(2024\)](#).

Figura 16. Resultados de mortalidad de la quercetina en larvas de *R. microplus* bajo la metodología de paquete larval.



Nota. La acetona corresponde al control negativo y el etión al control positivo. El análisis y resultados completos de este ensayo pueden ser encontrados en el trabajo de grado de [Alfonso et. al. \(2024\)](#).

4.2. Efecto sobre la mitocondria

Una vez se establecieron los parámetros de concentración de proteínas totales necesarios para la determinación de la actividad de las oxidasas, se procedió a la evaluación del efecto del carvacrol sobre la actividad de todas las demás enzimas mitocondriales planteadas en este trabajo.

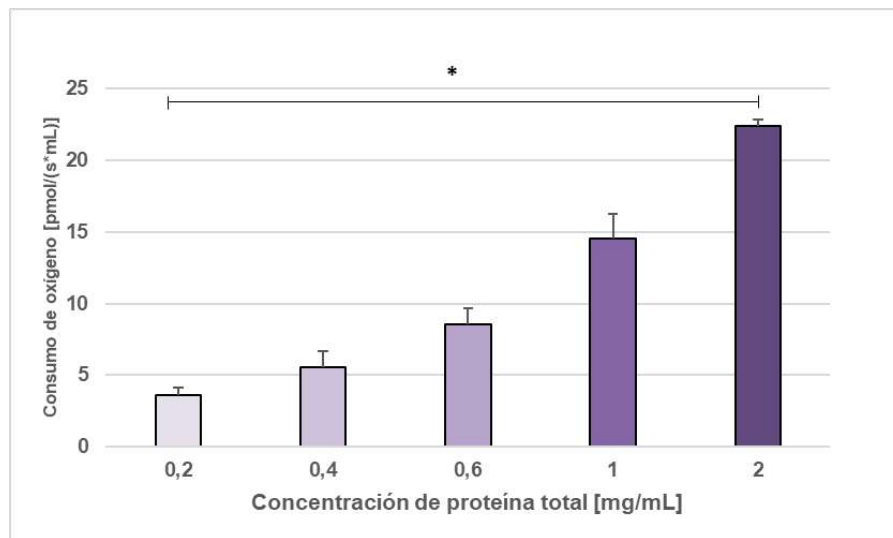
4.2.1. Succinato oxidasa

Con el objetivo de determinar la viabilidad experimental para esta enzima, se procedió a analizar la actividad de la succinato oxidasa sin adicionar carvacrol y aumentando la concentración de proteínas totales usando el método de extracción seleccionado.

Se debe tener en cuenta que el ensayo de succinato oxidasa mide el paso de electrones por los complejos II, III y IV siendo estos provenientes del succinato, que es el sustrato utilizado por la succinato deshidrogenasa (complejo II); y llegando al oxígeno molecular, el cual es reducido a agua y cuya disminución en concentración se puede medir por medio de un oxígrafo.

Como se observa en la figura 17, el aumento de la velocidad de consumo de oxígeno tiene un comportamiento dependiente con la concentración de proteína total. En la concentración máxima evaluada (2 mg/mL de proteína total) el valor obtenido de aumento de velocidad de consumo fue de 22.40 ± 1.03 pmol/(s*mL), que al compararse con el control del ensayo de NADH oxidasa donde se usa una concentración de 0.6 mg/mL (Figuras 14 y 18) de proteína total, se puede observar que la succinato oxidasa tiene una actividad mucho menor que la NADH oxidasa. ya que al utilizar una concentración mayor para la succinato oxidasa, no se alcanza un aumento de velocidad de consumo de oxígeno semejante. Esto sumado a los resultados de concentración de proteína total obtenidos de las larvas de *R. microplus* hacen que el ensayo de succinato oxidasa no sea viable experimentalmente, debido a que el volumen de extracto de proteína requerido para cada ensayo es muy alto comparado con los volúmenes obtenidos en cada extracción.

Figura 17. Actividad de la succinato oxidasa a diferentes concentraciones de proteína total.



Nota. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y un análisis ANOVA con comparaciones múltiples por Tukey. (*) representa diferencias significativas ($p < 0.05$).

Este resultado puede indicar que el metabolismo mitocondrial de las larvas de *R. microplus* es más lento y dependiente principalmente de la oxidación del NADH a través del complejo I. Esto se puede explicar a través del comportamiento de las larvas, que, al eclosionar de los huevos, suben por el pasto y esperan el paso de un hospedero en el envés del mismo, donde no reciben luz solar de manera directa, entrando en un estado de reposo hasta que logran detectar un hospedero cercano al cual parasitar. En este estado de reposo pueden durar hasta 8 meses, tiempo en el cual reducen su metabolismo al mínimo (Leal et al., 2018). Además, al estar en un ambiente distinto a su hábitat natural, donde las condiciones ambientales no son las mismas, y teniendo en cuenta que son sometidas a temperaturas muy bajas al momento de ser refrigeradas a 4°C, las larvas pueden entrar en un estado de diapausa, en el cual su metabolismo es aún más inactivo (Leal et al., 2020).

El estado de diapausa en garrapata se presenta como inactividad larval, retraso en ingurgitación de las hembras, retrasos en la metamorfosis y retrasos en la oviposición o

maduración de huevos. La diapausa puede presentarse por diversas razones como condiciones ambientales desfavorables (temperaturas extremas, baja humedad, falta de hospederos) o alteraciones en su ciclo de vida causados por agentes externos ([Belozarov, 1982](#); [Korotkov, 2016](#)). En estado de diapausa, la falta de actividad disminuye el metabolismo general al mínimo y, similar a como ocurre en la hibernación, la actividad mitocondrial de los complejos enzimáticos se ve afectada ([Mathers et al., 2017](#)). Esto fue demostrado por [Duerr & Podrabsky \(2010\)](#) y [Podrabsky & Hand \(2015\)](#) en sus estudios sobre la afectación del metabolismo mitocondrial y las estrategias fisiológicas utilizadas durante la diapausa por los embriones del pez *Austrofundulus limnaeus*. En ellos demostraron que, durante el estado de diapausa, hubo una reducción de la actividad de los complejos I, II, IV y ATP sintasa de los embriones, siendo el complejo II más afectado durante dicho período.

Con esto en mente, se planteó la hipótesis de que la baja actividad de la succinato oxidasa observada en este estudio podría estar relacionada con un posible estado de diapausa en el que entran las larvas de *R. microplus*, como resultado de las condiciones experimentales previas a la extracción de proteínas. Este estado de diapausa, caracterizado por una marcada reducción del metabolismo, es una respuesta adaptativa de las larvas a la ausencia de un hospedero en su entorno, lo que podría explicar la disminución en la actividad enzimática medida.

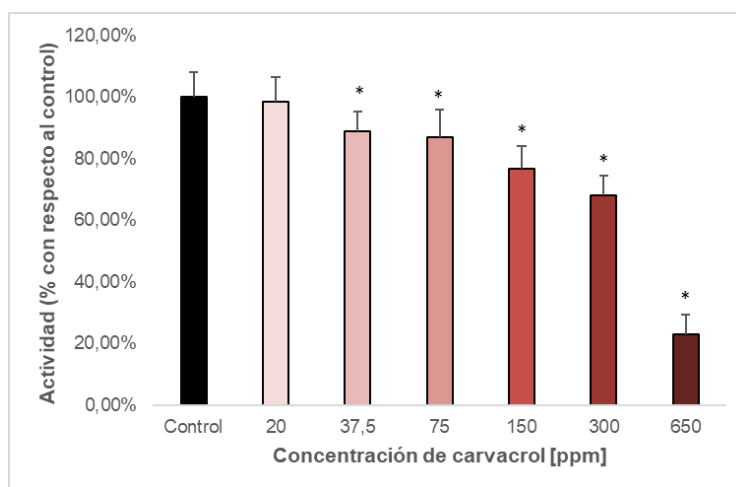
4.2.2. NADH oxidasa

En este ensayo se evaluó la NADH oxidasa como el paso de los electrones alimentados a la cadena transportadora de electrones desde el NADH a través de los complejos I, III y IV llegando finalmente al oxígeno. Para ello, primero se probó con la CL₅₀ del carvacrol determinada previamente en el laboratorio (650 ppm) para evaluar el efecto en la enzima. Después, se redujo la concentración con el fin de encontrar la mínima concentración posible a la cual se obtuviesen

diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, esto debido a que los compuestos en concentraciones altas de los metabolitos pueden inducir una inhibición enzimática generalizada y no específica como por ejemplo la desnaturalización de las proteínas. Por lo que, al obtener la mínima concentración con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, se asegura que la inhibición causada en el resto de enzimas sea por interacciones directas y específicas con las enzimas.

En la figura 18 se muestra la inhibición dosis-dependiente de la NADH oxidasa del carvacrol. A la CL50 (650 ppm – 4.33 mM) la actividad de la enzima fue inhibida en un $76.2 \pm 6.1\%$, mientras que la concentración mínima a la cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control fue la de 37.5 ppm (0.25 mM), con una reducción en la actividad de un $11.9 \pm 5.44\%$. Por lo tanto, esta concentración fue la seleccionada para realizar el resto de actividades enzimáticas.

Figura 18. Actividad de la NADH oxidasa



Nota. En presencia de carvacrol (20 ppm, 37.5 ppm, 75 ppm, 150 ppm, 300 ppm, 650 ppm). El control tiene un valor de 60.22 ± 4.59 pmol/(s*mL*mg) que corresponde al 100% de actividad.

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y un análisis ANOVA con comparaciones múltiples por Tukey. (*) representa diferencias significativas ($p < 0.05$).

La reducción en la actividad de la NADH oxidasa implica que el carvacrol está teniendo un efecto inhibitorio en al menos uno de los complejos enzimáticos mitocondriales relacionados con la respiración a través de NADH, es decir, los complejos I, III, IV. Por lo que a continuación se realizó la actividad del resto de enzimas, para determinar las enzimas específicas inhibidas por el carvacrol.

4.2.3. NADH deshidrogenasa

La enzima NADH deshidrogenasa cataliza la oxidación del NADH a NAD^+ en la fosforilación oxidativa. Los electrones provenientes del NADH son utilizados para la reducción de la ubiquinona a ubiquinol, compuesto utilizado para posteriormente transportar electrones al complejo III ([Whitehouse et al., 2019](#)).

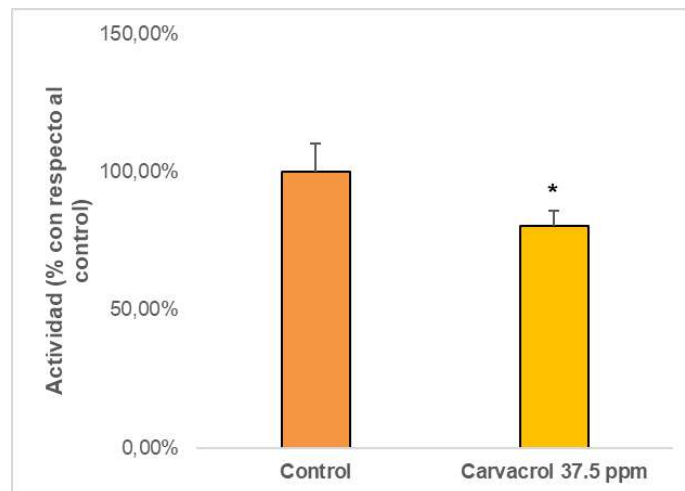
Con este ensayo se muestra el paso de los electrones desde el NADH al complejo I, pasando por varios centros de Fe-S hasta un receptor artificial de electrones, el ferricianuro de potasio. En este ensayo se utiliza rotenona, un inhibidor del complejo I que actúa sobre el sitio de unión de la ubiquinona al complejo enzimático, impidiendo la transferencia de electrones a esta coenzima, permitiendo que todos sean utilizados para la reducción del aceptor artificial de electrones ([Hatefi, 1985](#)). Además, también se utiliza KCN, un inhibidor del complejo IV, el cual impide la transferencia de los electrones hacia el oxígeno, impidiendo que exista una competencia entre el ferricianuro y el oxígeno como aceptores de los electrones provenientes del NADH ([Cayman Chemical, 2014](#)). El ión ferricianuro, que es de color amarillo, es reducido por el complejo I a ferrocianuro, el cual es incoloro, por lo que se puede determinar la actividad del complejo midiendo el cambio en la concentración de ferricianuro a través de su absorbancia a 420 nm ([Pujol-](#)

[Vila et al., 2016](#)) teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar $\epsilon_{420}=10200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ([Stellarnet, 2018](#)).

Como se observa en la figura 19, el carvacrol a 37.5 ppm disminuyó la actividad de la NADH deshidrogenasa en un $18.8 \pm 1.7\%$, mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

Este resultado muestra que el carvacrol afectó la tasa de oxidación del NADH por medio del complejo I, impidiendo que la misma cantidad de electrones llegasen al ferricianuro en comparación con el control. Por lo tanto, uno de los sitios de inhibición del carvacrol a la cadena transportadora de electrones de mitocondrias de *R. microplus* es el complejo I.

Figura 19. Actividad de la NADH deshidrogenasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm



Nota. El control fue tomado como el 100% y tiene un valor de 556.6 ± 57.7 nmol de ferricianuro reducidas/min*mg de proteína de garrapata. Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk ($p>0.05$) y prueba t para datos pareados. (*) Representa diferencias significativas ($p<0.05$).

4.2.4. Succinato deshidrogenasa

La enzima succinato deshidrogenasa cataliza la oxidación del succinato a fumarato, proceso que tiene efectos tanto en la fosforilación oxidativa, debido a que los electrones producidos

MECANISMO DE ACCIÓN ACARICIDA SOBRE *R. microplus*

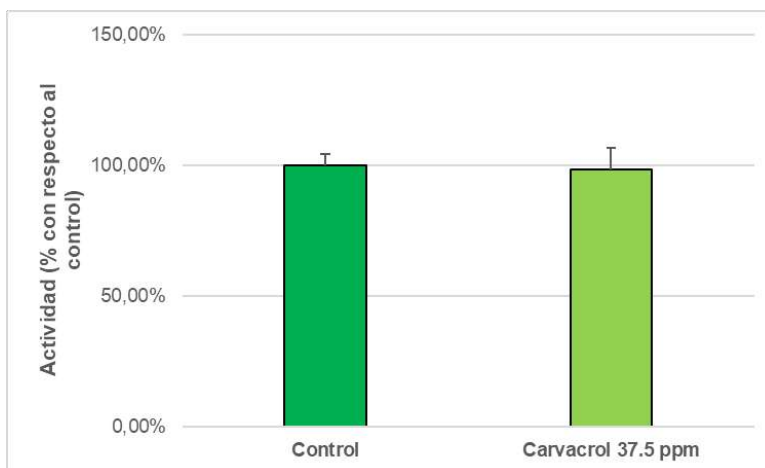
de esta oxidación se utilizan para la reducción del FAD en FADH₂ y posterior entrega a los centros de Fe-S para la reducción de la ubiquinona; como en el ciclo de Krebs, ya que el fumarato podrá continuar con el ciclo al ser transformado en malato por la enzima fumarasa ([Nelson & Cox, 2021](#); [Rutter et al., 2010](#)).

Con este ensayo se muestra el paso de los electrones desde el succinato hasta el receptor artificial DCPIP en presencia de rotenona, PMS y KCN. La rotenona y el KCN cumplen funciones similares a las que tenían en el ensayo de NADH deshidrogenasa. Por su parte, el PMS se utiliza como un intermediario para la transferencia de electrones desde el complejo II hasta el DCPIP, facilitando su reducción y coloración ([Jones & Hirst, 2013](#)). El aceptor artificial de electrones DCPIP, que en su forma oxidada es de color azul, es reducido por acción del complejo II a DCPIPH₂, el cual es incoloro, por lo que se puede determinar la actividad del complejo a través del cambio en la concentración de DCPIP midiendo su absorbancia a 600 nm ([Jones & Hirst, 2013](#)) teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar $\epsilon_{420}=12500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ([Basner & Antranikian, 2014](#)).

Como se observa en la figura 20, el carvacrol a 37.5 ppm no afectó la actividad de la succinato deshidrogenasa, debido a que no se muestra ninguna diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Por lo tanto, el carvacrol no es un inhibidor del complejo II mitocondrial de *R. microplus*.

La actividad de la succinato deshidrogenasa es notoriamente menor a la actividad de la NADH deshidrogenasa, lo que se observa en los valores del control. Esto demuestra que la actividad del complejo II, como se observó en los ensayos de oxidasas, es bastante menor comparada con la actividad del complejo I.

Figura 20. Actividad de la succinato deshidrogenasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.



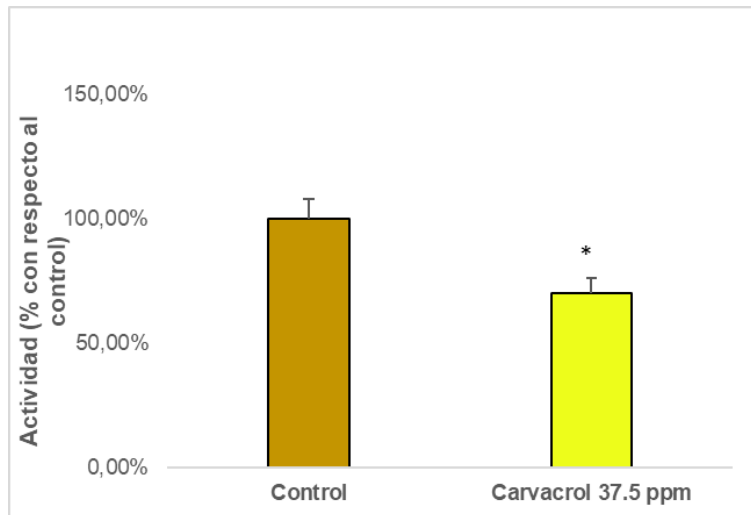
Nota. El control fue tomado como el 100% y tiene un valor de 92.6 ± 3.9 nmol de DCPIP reducidas/min*mg de proteína de garrapata. Se realizaron pruebas de normalidad ($p > 0.05$) y prueba t para datos pareados. No se encontraron diferencias significativas ($p = 0.9527$).

4.2.5. NADH citocromo c reductasa

La enzima ubiquinol-citocromo c reductasa (Complejo III) cataliza la reducción del citocromo c utilizando los electrones de la oxidación del ubiquinol proveniente de los complejos I y II, en donde se oxidaron los sustratos NADH y succinato respectivamente. El ensayo de NADH citocromo c reductasa muestra el paso de los electrones desde el ubiquinol proveniente de la oxidación del NADH en el complejo I hasta el citocromo c hasta lograr reducirlo, esto en presencia de KCN, que cumple la misma función explicada en ensayos anteriores. Para este ensayo, el aceptor de electrones es el citocromo c oxidado, el cual se reducirá por acción del complejo III al añadir el NADH como fuente de electrones. El citocromo c reducido, que será el producto de la reacción, posee un color rojo más intenso que el citocromo c oxidado, el cual puede medirse a 550 nm para determinar la actividad del complejo III teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar $\epsilon_{550} = 21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Metzger et al., 1997).

Como se observa en la figura 21, el carvacrol redujo la actividad de la citocromo c reductasa alimentada de los electrones provenientes de la reducción del NADH en el complejo I en un $30.0 \pm 3.3\%$, mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

Figura 21. Actividad de la NADH citocromo c reductasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.



Nota. El control fue tomado como el 100% y tiene un valor de 59.1 ± 4.68 nmol de citocromo c reducidas/min*mg de proteína de garrapata. Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y prueba t para datos pareados. (*) Representa diferencias significativas ($p < 0.05$).

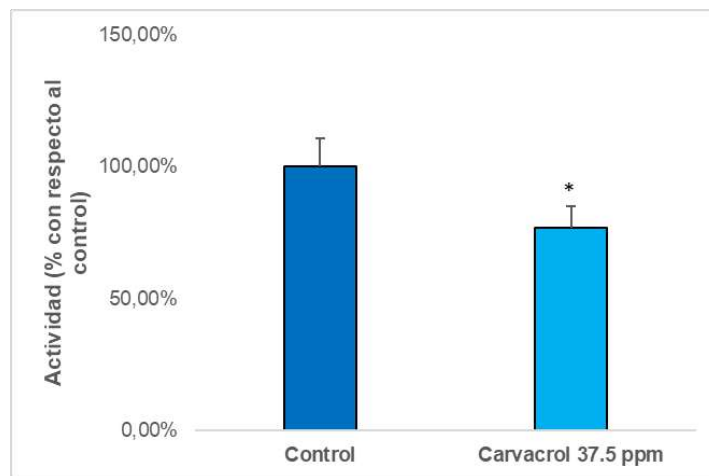
Estos resultados muestran que el carvacrol impidió la reducción del citocromo c en el complejo III cuando este estaba siendo alimentado de electrones por medio del complejo I. Sin embargo, ya se mostró que el carvacrol también reduce la actividad del complejo I, en consecuencia, al complejo III no llegará el mismo flujo de electrones que en el control, por lo que, con este resultado no se puede concluir que el carvacrol tenga un efecto inhibitorio sobre el complejo III. Por lo tanto, se procedió a analizar también la actividad del complejo III en presencia de carvacrol, pero considerando el flujo de electrones proveniente del complejo II.

4.2.6. Succinato citocromo c reductasa

Al igual que en el ensayo anterior, la enzima succinato citocromo c reductasa cataliza la reducción del citocromo c acoplada a la oxidación del ubiquinol. Sin embargo, en este caso, se utiliza rotenona para inhibir el paso de los electrones a la ubiquinona en el complejo I y se utiliza como sustrato el succinato. La determinación de la concentración citocromo c reducido se da también a 550 nm.

Como se observa en la figura 22, el carvacrol inhibió la actividad de la citocromo c reductasa con flujo de electrones proveniente del complejo II en un $23.1 \pm 4.6\%$, mostrando diferencia estadísticamente significativas con respecto al control.

Figura 22. Actividad de la succinato citocromo c reductasa en presencia de carvacrol a 37.5 ppm.



Nota. El control fue tomado como el 100% y tiene un valor de 38.9 ± 4.2 nmol de citocromo c reducidos/min*mg de proteína de garrapata. Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y prueba t para datos pareados. (*) Representa diferencias significativas ($p < 0.05$).

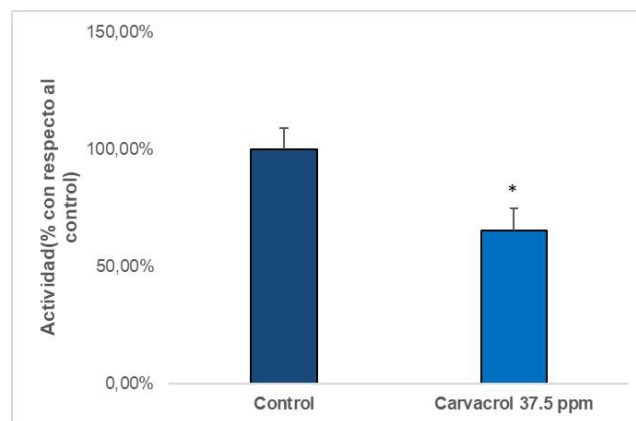
Este resultado muestra que el carvacrol es capaz de inhibir el paso de electrones al citocromo c desde el ubiquinol proveniente de la reducción del succinato en el complejo II.

Teniendo en cuenta el resultado de la actividad sobre la succinato deshidrogenasa, donde el tratamiento con carvacrol no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, la reducción obtenida en este ensayo es netamente la inhibición sobre el complejo III. Este resultado, sumado al obtenido en el ensayo de NADH citocromo c reductasa (Sección 4.2.5) muestran que el carvacrol bloquea parcialmente el paso de electrones hacia el citocromo c, teniendo actividad inhibitoria sobre el complejo III.

4.2.7. Citocromo c oxidasa

La enzima citocromo c oxidasa (complejo IV) es la última de la cadena transportadora de electrones, y cataliza la oxidación del citocromo c proveniente del complejo III utilizando los electrones para la reducción del oxígeno molecular para finalmente producir agua. En este ensayo se mide la velocidad de oxidación del citocromo c previamente reducido por columna utilizando ditionito de sodio. En este caso no es necesario el uso de los sustratos NADH o succinato, ni de los inhibidores rotenona o KCN.

Figura 23. Actividad de la citocromo c oxidasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.



Nota. El control fue tomado como el 100% y tiene un valor de 40.6 ± 3.7 nmol de citocromo c reducidas/min*mg de proteína de garrapata. Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y prueba t para datos pareados. (*) Representa diferencias significativas ($p < 0.05$).

Como se muestra en la figura 23, el carvacrol inhibió la actividad de la citocromo c oxidasa en $34.8 \pm 4.4\%$, mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Este resultado muestra que el carvacrol tiene una actividad inhibitoria sobre el complejo IV, impidiendo la oxidación del citocromo c reducido proveniente del complejo III.

4.2.8. ATP sintasa (ATPasa)

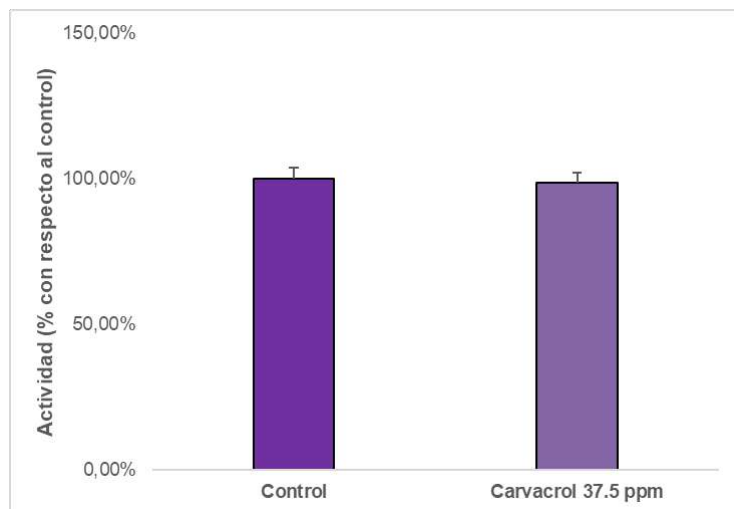
La ATP sintasa es la enzima encargada de la síntesis del ATP utilizando el potencial de membrana creado por la cadena transportadora de electrones. Sin embargo, bajo ciertas condiciones específicas, la ATP sintasa también tiene actividad como ATPasa, hidrolizando el ATP en ADP y fosfato ([Nicholls & Ferguson, 2014](#)); por lo tanto, se puede determinar la actividad de esta enzima a través de la hidrólisis de ATP y producción de fosfato. En este ensayo se mide la concentración de fosfato producido por la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa. Para esto, se debe tener un medio de reacción en el que el ATP se mantenga en concentraciones altas, que es la principal condición necesaria para que la ATP sintasa tenga actividad de ATPasa, condición que se logra con la adición de la piruvato quinasa (PK) y el fosfoenolpiruvato (PEP). La PK es una enzima que participa en la glucólisis, y cataliza la conversión de PEP en piruvato utilizando ADP y produciendo ATP ([Israelsen & Vander Heiden, 2015](#)). De esta forma se mantiene la concentración de ATP alta para que se conserve la actividad ATPasa de la enzima, a la cual también se le adiciona el cofactor Mg^{2+} a través de sulfato de magnesio para su correcto funcionamiento.

Una vez se ha producido el fosfato y se ha detenido la reacción adicionando TCA, se procede a inducir la reacción del fosfato con molibdato de amonio, formando un complejo azulado de fosfomolibdato al cual se le puede leer la absorbancia a 820 nm y se puede calcular su concentración teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar $\epsilon_{820}=10025 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ([Divya et](#)

[al., 2019](#)). Es importante mencionar que para la correcta formación del fosfomolibdato, es necesario un pH ácido, que se proporciona adicionando ácido sulfúrico. Por otro lado, para poder formar el complejo de fosfomolibdato, debe haber una reducción del molibdeno, la cual se realiza adicionando ácido ascórbico ([Murphy & Riley, 1962](#)).

Como se observa en la figura 24, el tratamiento con carvacrol no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Por lo tanto, la concentración de fosfato que reaccionó con el molibdato de amonio para formar el complejo de fosfomolibdato se mantuvo constante, mostrando que el carvacrol no es un inhibidor de la ATP sintasa.

Figura 24. Actividad de la ATPasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.



Nota. El control fue tomado como el 100% y tiene un valor de 0.58 ± 0.02 nmol de fosfato producidos/mg de proteína de garrapata. Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y prueba t para datos pareados. No se hallaron diferencias significativas ($p = 0.3328$).

En resumen, la actividad inhibitoria que se obtuvo sobre la NADH oxidasa implica una reducción de la actividad de la cadena transportadora de electrones en presencia de carvacrol, afectando los complejos I, III y IV. Al realizar los ensayos enzimáticos se observó una disminución

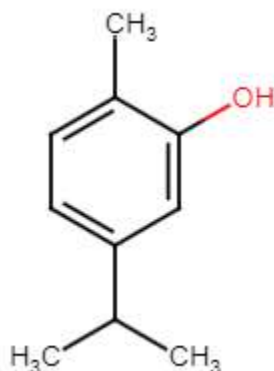
en la actividad de estos mismos complejos, siendo los complejos III y IV los más afectados. La actividad sobre el complejo II, determinada por el ensayo de succinato deshidrogenasa, no se vio afectada en presencia de carvacrol, al igual que la actividad de la enzima ATP sintasa.

En investigaciones previas realizadas en nuestros grupos de investigación GIBIM-CINTROP, se han encontrado inhibiciones similares del carvacrol sobre el metabolismo bioenergético mitocondrial en otras especies. Por ejemplo, sobre larvas de mosquito *Aedes aegypti* se realizaron los trabajos “Actividad insecticida de metabolitos de plantas medicinales que influyen en la bioenergética mitocondrial y la acetilcolinesterasa en larvas de mosquitos *Aedes aegypti*” de [Angarita et. al. \(2022\)](#) y “Actividad larvicida de metabolitos de plantas que afectan la bioenergética mitocondrial de mosquitos *Aedes aegypti*” de [Pérez et. al. \(2022\)](#), donde se obtuvieron inhibiciones por parte del carvacrol a una concentración de 9,7 ppm de los complejos I, III y IV en tejido permeabilizado, comparable con los resultados obtenidos en este trabajo a una concentración de carvacrol de 37.5 ppm.

La actividad inhibitoria del carvacrol (Figura 21) sobre estos complejos puede explicarse debido a su estructura. El anillo aromático le da un carácter lipofílico a la molécula que, junto a su pequeño tamaño, hace que tenga mayor facilidad en la interacción con las membranas de las células, tanto la citosólica como las mitocondriales, alterando así la fluidez y organización de las mismas, desestabilizando las funciones catalíticas de los complejos enzimáticos ([Nelson & Cox, 2021](#)). Por otro lado, los grupos hidroxilo son centros activos en muchas reacciones enzimáticas, y podrían jugar un papel importante en la interacción del carvacrol con los complejos mitocondriales para su inhibición, pudiendo interactuar con diferentes residuos aminoácidos polares importantes en la actividad catalítica de la enzima, formando puentes de hidrógeno con

residuos como la serina o el ácido glutámico, teniendo consecuencias graves como por ejemplo la interrupción de la unión de la enzima con su sustrato ([Hadjiivanov, 2014](#)).

Figura 25. Estructura del carvacrol



Nota. Estructura del carvacrol (C₁₀H₁₄O). Peso molecular: 150,22 g/mol ([Sigma Aldrich, 2022](#)).

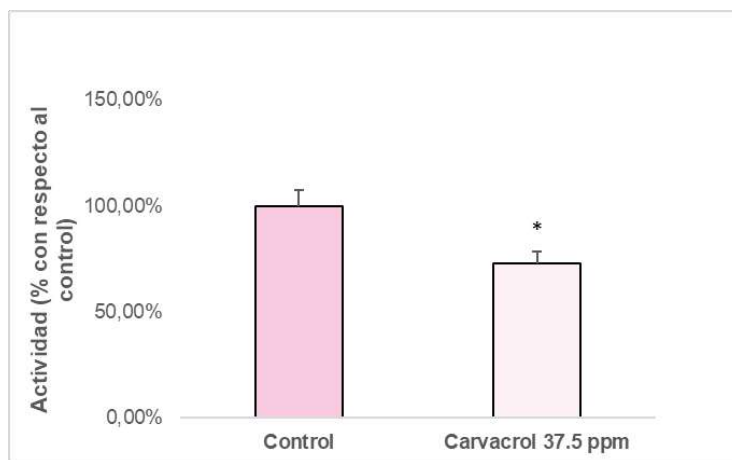
Realizada mediante el software ChemDraw.

4.3. Actividad sobre la acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es una enzima neuronal que cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en acetato y colina. Para este ensayo, la acetilcolinesterasa presente en el extracto rompe el enlace éster de la acetilcolina liberando tiocolina. El grupo tiol (-SH) reacciona con el DTNB rompiendo el enlace disulfuro y formando un compuesto tiol-DTNB y 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB⁻), un anión de coloración amarilla que puede ser detectado a 405 nm, calculando la concentración de tiocolina formada y por tanto, la actividad de la acetilcolinesterasa ([Worek et al., 1999](#)) teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar $\epsilon_{405}=13300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ([Eyer et al., 2003](#)).

Como se observa en la figura 26, el carvacrol inhibió la actividad de la acetilcolinesterasa en un $27.02 \pm 2.95\%$, presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

Figura 26. Actividad de la acetilcolinesterasa en presencia de carvacrol 37.5 ppm.



Nota. El control fue tomado como el 100% y tiene un valor de 0.87 ± 0.07 nmol de TNB producidos/min*mg de proteína de garrapata. Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) y prueba t para datos pareados. (*) Representa diferencias significativas ($p < 0.05$).

Esto muestra que el carvacrol impidió la hidrólisis de la acetilcolina por parte de la acetilcolinesterasa, produciendo una menor concentración de tiocolina que reaccionó con el DTNB formando una menor cantidad de iones TNB^- , haciendo al carvacrol un inhibidor enzimático de la acetilcolinesterasa.

En investigaciones previas realizadas en nuestro grupo de investigación reportadas en el trabajo de grado de [Angarita et. al. \(2022\)](#) se probó el efecto del carvacrol sobre la acetilcolinesterasa del mosquito *Aedes aegypti*, obteniendo una inhibición del 14.92% a 9.7 ppm.

Al contrastarlo con los resultados de este trabajo, se observa un comportamiento similar, en donde hay una reducción de la actividad de la enzima.

La actividad inhibitoria del carvacrol sobre la acetilcolinesterasa puede ser explicada por medio de las interacciones de este compuesto con el sitio activo de la enzima. La AChE cuenta con una triada catalítica compuesta de residuos de serina, histidina y ácido glutámico ([Zhang et al., 2002](#); Y. [Zhou et al., 2010](#)). El grupo hidroxilo del carvacrol le permitiría interactuar tanto con el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la serina, como con el grupo carboxílico del ácido glutámico, proporcionando una mayor estabilidad a la estructura enzima-carvacrol, impidiendo la interacción con la acetilcolina. Lo cual es observado en los resultados de la actividad de la enzima.

5. Conclusiones

1. El método de maceración ideal para la extracción de proteína de larvas *R. microplus* es el que implica una maceración mecánica fuerte, con el que se extrajo una mayor concentración de proteína y mejores resultados de respiración mitocondrial.
2. La respiración de las mitocondrias de *R. microplus* usando succinato como sustrato es significativamente menor que usando NADH. Lo que puede ser explicado mediante el bajo metabolismo que tienen las larvas de la especie, probablemente causado por el fenómeno de diapausa en el que entran en su estado larvario.
3. El carvacrol inhibe la respiración de la mitocondria usando NADH como sustrato a una concentración 37.5 ppm, impidiendo el flujo de electrones a través de los complejos de la cadena transportadora de electrones.

4. El carvacrol a 37.5 ppm inhibe el complejo I en un $18.78 \pm 1.67\%$, el complejo III en un $29.95 \pm 3.30\%$ a través de NADH y un $23.16 \pm 4.55\%$ a través de succinato; el complejo IV en un $34.83 \pm 4.41\%$ y la acetilcolinesterasa en un $27.02 \pm 2.95\%$.

6. Recomendaciones

Es posible estudiar a la garrapata *R. microplus* desde otros estadios, analizando la inhibición de los metabolitos sobre los huevos, las ninfas, las adultas y las hembras ingurgitadas. Esto con el fin de determinar el metabolismo de la especie en diferentes estadios debido a las diferencias que existe en su comportamiento a lo largo de su ciclo de vida.

Se recomienda el análisis de otros compuestos con actividad acaricida sobre las larvas de *R. microplus*, con el fin de buscar posibles mezclas sinérgicas con las cuales se puedan desarrollar acaricidas con concentraciones menores y distintos mecanismos de acción.

Finalmente, se puede ampliar el número de dianas farmacológicas a la cual se les realiza la evaluación enzimática, como por ejemplo estudiar la inhibición de enzimas de rutas metabólicas diferentes a la fosforilación oxidativa como la hexoquinasa en la glucólisis.

7. Divulgación científica

El trabajo en el proyecto 3739 “Formulación de un ixodicida y/o ixorepelente diseñado en laboratorio con validación en campo proyectado para la prevención de la infestación de garrapatas en bovinos” me permitió la participación en el evento “V Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular C2B2” con el proyecto titulado “Identificación de metabolitos secundarios con propiedades repelentes mediante ensayos *in silico* utilizando como diana farmacológica una proteína G y una proteína semejante a una OBP (Odorant Binding Protein) de insectos proveniente de *Amblyomma americanum* (Ixodidae) reportadas como posibles receptores odorantes en garrapatas *Rhipicephalus microplus* (Ixodidae)” (Anexo 1).

8. Anexos

Anexo 1. Certificado de participación en el V Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular C2B2



9. Bibliografía

- Acevedo-Gutiérrez, L. Y., Paternina, L. E., Pérez-Pérez, J. C., Londoño, A., López, G., & Rodas, J. D. (2020). Garrapatas duras (Acari: Ixodidae) de Colombia, una revisión a su conocimiento en el país. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 126–139.
- Adenubi, O. T., Ahmed, A. S., Fasina, F. O., McGaw, L. J., Eloff, J. N., & Naidoo, V. (2018). Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. *Industrial Crops and Products*, 123, 779–806. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.075>
- Adenubi, O. T., Fasina, F. O., McGaw, L. J., Eloff, J. N., & Naidoo, V. (2016). Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. *South African Journal of Botany*, 105, 178–193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.010>
- Agwunobi, D. O., Yu, Z., & Liu, J. (2021). A retrospective review on ixodid tick resistance against synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 173, 104776. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104776>
- Alfonso, B., Méndez, S., Duque, J., & Avendaño, G. (2024). Estudio in silico e in vivo de metabolitos secundarios de plantas con posible acción inhibitoria sobre proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y la acetilcolinesterasa de *Rhipicephalus microplus* [Tesis de pregrado]. Universidad Industrial de Santander.
- Alonso, J.-R., Cardellach, F., López, S., Casademont, J., & Miró, Ò. (2003). Carbon Monoxide Specifically Inhibits Cytochrome C Oxidase of Human Mitochondrial Respiratory Chain.

Pharmacology & Toxicology, 93(3), 142–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.930306.x>

Anderson, J. A., & Coats, J. R. (2012). Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(2), 124–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.12.002>

Angarita, D., Méndez, S., Duque, J., & Vesga, L. (2022). Actividad insecticida de metabolitos de plantas medicinales que influyen en la bioenergética mitocondrial y la acetilcolinesterasa en larvas de mosquitos *Aedes aegypti* [Tesis de pregrado]. Universidad Industrial de Santander.

Araújo, L. X., NOVATO, T. P. L., ZERINGOTA, V., MATURANO, R., MELO, D., DA SILVA, B. C., DAEMON, E., DE CARVALHO, M. G., & MONTEIRO, C. M. O. (2016). Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 30(4), 377–382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mve.12181>

Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(1), 1–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>

Badawy, M. E. I., El-Arami, S. A. A., & Abdelgaleil, S. A. M. (2010). Acaricidal and quantitative structure activity relationship of monoterpenes against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Experimental and Applied Acarology*, 52(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s10493-010-9363-y>

Bandaranayaka, K. O., Dissanayaka, U. I., & Rajakaruna, R. S. (2021). Experimental aspects of life cycles of two hard tick species *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Hyalomma isaaci* (Acari: Ixodidae), on New Zealand white rabbits. *Ceylon Journal of Science*. <https://doi.org/10.4038/cjs.v50i1.7846>

- Basner, A., & Antranikian, G. (2014). Isolation and Biochemical Characterization of a Glucose Dehydrogenase from a Hay Infusion Metagenome. *PLoS ONE*, 9(1), e85844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085844>
- Bauer, M. M. T., & Schnapp, G. (2007). 3.19 - Protein Production for Three-Dimensional Structural Analysis. In J. B. Taylor & D. J. Triggle (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (pp. 411–432). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00092-4>
- Belozero, V. N. (1982). CHAPTER 13 - Diapause and Biological Rhythms in Ticks. In F. D. OBENCHAIN & R. GALUN (Eds.), *Physiology of Ticks* (pp. 469–500). Pergamon. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-024937-7.50018-4>
- Benelli, G., & Pavea, R. (2018). Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—A systematic review. *Acta Tropica*, 179, 47–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.025>
- Beugnet, F., & Franc, M. (2012). Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. *Trends in Parasitology*, 28(7), 267–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.04.004>
- Borrero-Landazabal, M. A., Duque, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2019). 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 & Pharmacology*, 229, 108664. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108664>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Braz, V., Gomes, H., Galina, A., Saramago, L., Braz, G., da Silva Vaz, I., Logullo, C., da Fonseca, R. N., Campos, E., & Moraes, J. (2019). Inhibition of energy metabolism by 3-bromopyruvate in the hard tick *Rhipicephalus microplus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 218, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.12.010>
- Burden, D. (2012). Guide to the Disruption of Biological Samples – 2012 . *Random Primers*, 12, 1–25.
- Byun, H., Kim, H. Y., Lim, J. J., Seo, Y., & Yoon, G. (2008). Mitochondrial dysfunction by complex II inhibition delays overall cell cycle progression via reactive oxygen species production. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(5), 1747–1759. <https://doi.org/10.1002/jcb.21741>
- Calvano, M. P. C. A., Brumatti, R. C., Garcia, M. V., Barros, J. C., & Andreotti, R. (2019). Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and effect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. *Experimental and Applied Acarology*, 79(3), 459–471. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00446-5>
- Cardoso, A. dos S., Santos, E. G. G., Lima, A. da S., Temeyer, K. B., Pérez de León, A. A., Costa, L. M., & Soares, A. M. dos S. (2020). Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. *Veterinary Parasitology*, 280, 109090. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109090>
- Caro-Gamboa, L. J., Forero-Castro, M., & Dallo-Báez, A. E. (2020). Inhibición de la colinesterasa como biomarcador para la vigilancia de población ocupacionalmente expuesta a plaguicidas organofosforados. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(3), 1–23. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1562
- 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 & Pharmacology, 221, 29–37.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.006>

Cayman Chemical. (2014). MitoCheck Complex I Activity Assay Kit.

(CFSPH). (2008). Babesiosis bovina.

Chen, P. S., Toribara, T. Y., & Warner, Huber. (1956). Microdetermination of Phosphorus. Analytical Chemistry, 28(11), 1756–1758. <https://doi.org/10.1021/ac60119a033>

Choi, J.-Y., Chon, K., Kim, J., Vasamsetti, B. M. K., Kim, B.-S., Yoon, C.-Y., Hwang, S., Park, K.-H., & Lee, J.-H. (2024). Assessment of Lambda-Cyhalothrin and Spinetoram Toxicity and Their Effects on the Activities of Antioxidant Enzymes and Acetylcholinesterase in Honey Bee (*Apis mellifera*) Larvae. Insects, 15(8), 587. <https://doi.org/10.3390/insects15080587>

Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. Current Neuropharmacology, 11(3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>

Cossio-Bayugar, R., Miranda-Miranda, E., & Kumar, S. (2023). A Laboratory Manual on *Rhipicephalus microplus*.

Cruz, E. M. de O., Costa-Junior, L. M., Pinto, J. A. O., Santos, D. de A., Araujo, S. A. de, Arrigoni-Blank, M. de F., Bacci, L., Alves, P. B., Cavalcanti, S. C. de H., & Blank, A. F. (2013). Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Veterinary Parasitology, 195(1), 198–202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.046>

da Silva, G. D., de Lima, H. G., de Freitas, H. F., da Rocha Pita, S. S., dos Santos Luz, Y., de Figueiredo, M. P., Uzêda, R. S., Branco, A., Costa, S. L., Batatinha, M. J. M., & Botura, M. B. (2021a). In vitro and in silico studies of the larvicidal and anticholinesterase activities of berberine and

piperine alkaloids on *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(2), 101643.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101643>

da Silva Lima, A., Soares Rocha, A. P., Serejo, R. S., de Almeida Lima, G. D., de Sousa Lima Neto, J., Machado Ferreira, M. C., Viteri Jumbo, L. O., Costa-Junior, L. M., de Oliveira, E. E., & da Rocha, C. Q. (2021b). Acaricide activity of extract and an isolated compound of *Lithraea brasiliensis* on *Rhipicephalus microplus* and selectivity actions against a non-target organism. *Veterinary Parasitology*, 300, 109597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109597>

Dalefield, R. (2017). Chapter 8 - Insecticides and Acaricides. In R. Dalefield (Ed.), *Veterinary Toxicology for Australia and New Zealand* (pp. 87–109). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420227-6.00008-6>

Davoudi, M., Kallijärvi, J., Marjavaara, S., Kotarsky, H., Hansson, E., Levéen, P., & Fellman, V. (2014). A mouse model of mitochondrial complex III dysfunction induced by myxothiazol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(4), 1079–1084. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.058>

Deb, D. D., Parimala, G., Saravana Devi, S., & Chakraborty, T. (2011). Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chemico-Biological Interactions*, 193(1), 97–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.05.009>

Delgado, E. H. B., Streck, E. L., Quevedo, J. L., & Dal-Pizzol, F. (2006). Mitochondrial Respiratory Dysfunction and Oxidative Stress after Chronic Malathion Exposure. *Neurochemical Research*, 31(8), 1021–1025. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9111-1>

Dennehy, T. J., Nyrop, J. P., & Martinson, T. E. (1990). Characterization and Exploitation of Instability of Spider Mite Resistance to Acaricides. In *Managing Resistance to Agrochemicals* (Vol. 421, pp. 77–91). American Chemical Society. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-1990-0421.ch005>

- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J.-M. (2007). The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52(Volume 52, 2007), 81–106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), 870–879. <https://doi.org/10.1038/nrm2275>
- Divya, S., Sharmila, P., Dinakaran, J., Yamal, G., Rao, K. S., & Pardha-Saradhi, P. (2019). Specific H⁺ level is crucial for accurate phosphate quantification using ascorbate as a reductant. *PROTOPLASMA*, 257(1), 319-330. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01424-9>
- Domínguez, D., Torres, F., & Rosario, R. (2016). Economic evaluation of tick (*Rhipicephalus microplus*) control in Mexico. *CIBA Revista Iberoamericana De Las Ciencias Biológicas Y Agropecuarias*, 5(9), 43–52.
- Duerr, J. M., & Podrabsky, J. E. (2010). Mitochondrial physiology of diapausing and developing embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: implications for extreme anoxia tolerance. *Journal of Comparative Physiology B*, 180(7), 991–1003. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0478-6>
- Duque, J. E., Urbina, D. L., Vesga, L. C., Ortiz-Rodríguez, L. A., Vanegas, T. S., Stashenko, E. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2023). Insecticidal activity of essential oils from American native plants against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): an introduction to their possible mechanism of action. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30046-8>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

- Elmore, S. E., & La Merrill, M. A. (2019). Oxidative Phosphorylation Impairment by DDT and DDE. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00122>
- Estrela, A., Seixas, A., & Termignoni, C. (2007). A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) larvae with vitellin digestion activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(4), 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.07.009>
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., & Reiner, E. (2003). Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry*, 312(2), 224–227. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00506-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00506-7)
- Feng, J., Wang, R., Chen, Z., Zhang, S., Yuan, S., Cao, H., Jafari, S. M., & Yang, W. (2020). Formulation optimization of D-limonene-loaded nanoemulsions as a natural and efficient biopesticide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 596, 124746. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124746>
- Ferreira, G. C. M., Canozzi, M. E. A., Peripolli, V., Moura, G. de P., Sánchez, J., & Martins, C. E. N. (2022). Prevalence of bovine *Babesia* spp., *Anaplasma marginale*, and their co-infections in Latin America: Systematic review-meta-analysis. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(4), 101967. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101967>
- Ferreira, L. L., De Oliveira Filho, J. G., Mascarin, G. M., De León, A. A. P., & Borges, L. M. F. (2017). In vitro repellency of DEET and β -citronellol against the ticks *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and *Amblyomma sculptum*. *Veterinary Parasitology*, 239, 42-45. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.021>
- Flampouri, E., Theodosi-Palimeri, D., & Kintzios, S. (2018). Strobilurin fungicide kresoxim-methyl effects on a cancerous neural cell line: oxidant/antioxidant responses and in vitro migration.

Toxicology Mechanisms and Methods, 28(9), 709–716.

<https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1506848>

Forkink, M., Basit, F., Teixeira, J., Swarts, H. G., Koopman, W. J. H., & Willems, P. H. G. M. (2015).

Complex I and complex III inhibition specifically increase cytosolic hydrogen peroxide levels without inducing oxidative stress in HEK293 cells. *Redox Biology*, 6, 607–616.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.003>

França, S. M. de, Breda, M. O., Badji, C. A., & Oliveira, J. V. de. (2013). The Use of Behavioral

Manipulation Techniques On Synthetic Insecticides Optimization. In S. Trdan (Ed.), *Insecticides* (p. Ch. 6). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/53354>

Gao, A.-H., Fu, Y.-Y., Zhang, K.-Z., Zhang, M., Jiang, H.-W., Fan, L.-X., Nan, F.-J., Yuan, C.-G., Li,

J., Zhou, Y.-B., & Li, J.-Y. (2014). Azoxystrobin, a mitochondrial complex III Qo site inhibitor, exerts beneficial metabolic effects in vivo and in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -*

General Subjects, 1840(7), 2212–2221.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.04.002>

García-Ponce, R., Villarreal Villarreal, J., Alvarez Roman, R., Rivas-Morales, C., & Galindo, S. (2024).

El enemigo persistente de la ganadería en México: estado actual y control de “la garrapata.”

Ghosh, A., Chowdhury, N., & Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The*

Indian Journal of Medical Research, 135(5), 581–598.

Glinka, Y. Y., & Youdim, M. B. H. (1995). Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-

hydroxydopamine. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*, 292(3), 329–332. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0926-6917\(95\)90040-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0926-6917(95)90040-3)

Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S. L., Bhattacharyya, A., & Benelli, G. (2016). Eugenol, α -

pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides

- against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. *Parasitology Research*, 115(2), 807–815. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4809-0>
- Gray, J. S., & De Vos, A. J. (1981). Studies on a bovine Babesia transmitted by *Hyalomma marginatum rufipes* Koch, 1844. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 48(4), 215–223.
- Grisi, L., Leite, R. C., Martins, J. R. de S., Barros, A. T. M. de, Andreotti, R., Cançado, P. H. D., León, A. A. P. de, Pereira, J. B., & Villela, H. S. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23.
- Guo, L., Shestov, A. A., Worth, A. J., Nath, K., Nelson, D. S., Leeper, D. B., Glickson, J. D., & Blair, I. A. (2016). Inhibition of Mitochondrial Complex II by the Anticancer Agent Lonidamine*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(1), 42–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M115.697516>
- Gupta, R. C. (2011). Chapter 80 - Placental toxicity. In R. C. Gupta (Ed.), *Reproductive and Developmental Toxicology* (pp. 1067–1085). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382032-7.10080-3>
- Gupta, R. C. (2014). Rotenone. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition) (pp. 185–187). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00194-9>
- Gupta, S., Sangwan, N., Sangwan, A. K., Mann, S., Gupta, S., Kumar, A., & Kumar, S. (2023). Understanding the resistance mechanisms of *Rhipicephalus microplus* ticks to synthetic pyrethroids and organophosphates in south-west regions of Haryana, North India. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 196, 105634. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105634>
- Gutiérrez-Wong, J. R., Rosado-Aguilar, J. A., & Rodríguez-Vivas, R. I. (2023). First report of acaricidal efficacy from plumbagin on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*

resistant to conventional acaricides. *Experimental Parasitology*, 255, 108632.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108632>

Hadjiivanov, K. (2014). Identification and Characterization of Surface Hydroxyl Groups by Infrared Spectroscopy (pp. 99–318). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800127-1.00002-3>

Hatefi, Y. (1985). THE MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), 1015–1069.

<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.005055>

Heinz, S., Freyberger, A., Lawrenz, B., Schladt, L., Schmuck, G., & Ellinger-Ziegelbauer, H. (2017). Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Scientific Reports*, 7(1), 45465.

<https://doi.org/10.1038/srep45465>

Henriques, B. S., Garcia, E. S., Azambuja, P., & Genta, F. A. (2020). Determination of Chitin Content in Insects: An Alternate Method Based on Calcofluor Staining. *Frontiers in Physiology*, 11.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00117>

Hosseini, M.-J., Shaki, F., Ghazi-Khansari, M., & Pourahmad, J. (2013). Toxicity of Arsenic (III) on Isolated Liver Mitochondria: A New Mechanistic Approach. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 12(Suppl), 121–138.

Israelsen, W. J., & Vander Heiden, M. G. (2015). Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 43, 43–51.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.004>

J. Mosqueda, A. Olvera-Ramirez, G. Aguilar-Tipacamu, & G. J. Canto. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1504–1518.

<https://doi.org/10.2174/092986712799828355>

- Jacob, S. S., Sengupta, P. P., Paramanandham, K., Suresh, K. P., Chamuah, J. K., Rudramurthy, G. R., & Roy, P. (2020). Bovine babesiosis: An insight into the global perspective on the disease distribution by systematic review and meta-analysis. *Veterinary Parasitology*, 283, 109136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109136>
- Jayaraj, R., Megha, P., & Sreedev, P. (2016). Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology*, 9(3–4), 90–100. <https://doi.org/doi:10.1515/intox-2016-0012>
- Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity — USA. *Apidologie*, 41(3), 312–331. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>
- Jones, A. J. Y., & Hirst, J. (2013). A spectrophotometric coupled enzyme assay to measure the activity of succinate dehydrogenase. *Analytical Biochemistry*, 442(1), 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.018>
- Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., & Milos, M. (2007). In Vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21(3), 259–261. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ptr.2063>
- Kanduma, E. G., Emery, D., Githaka, N. W., Nguu, E. K., Bishop, R. P., & Šlapeta, J. (2020). Molecular evidence confirms occurrence of *Rhipicephalus microplus* Clade A in Kenya and sub-Saharan Africa. *Parasites & Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04266-0>
- Karami-Mohajeri, S., Hadian, M. R., Fouladdel, S., Azizi, E., Ghahramani, M. H., Hosseini, R., & Abdollahi, M. (2013). Mechanisms of muscular electrophysiological and mitochondrial dysfunction following exposure to malathion, an organophosphorus pesticide. *Human & Experimental Toxicology*, 33(3), 251–263. <https://doi.org/10.1177/0960327113493300>

- Karp, G., Iwasa, J., & Marshall, W. (2020). Karp's Cell and Molecular Biology.
- Kilbride, S. M., Gluchowska, S. A., Telford, J. E., O'Sullivan, C., & Davey, G. P. (2011). High-level inhibition of mitochondrial complexes III and IV is required to increase glutamate release from the nerve terminal. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 53. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-53>
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167(2), 95–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>
- Korotkov, Yu. S. (2016). Geographic variability of morphogenetic diapause in larvae and nymphs of the taiga tick *Ixodes persulcatus* (Acarina, Ixodidae). *Entomological Review*, 96(5), 634–645. <https://doi.org/10.1134/S0013873816050109>
- Leal, B., Zamora, E., Fuentes, A., Thomas, D. B., & Dearth, R. K. (2020). Questing by Tick Larvae (Acari: Ixodidae): A Review of the Influences That Affect Off-Host Survival. *Annals of the Entomological Society of America*, 113(6), 425–438. <https://doi.org/10.1093/aesa/saaa013>
- Leal, B., Thomas, D., & Dearth, R. (2018). Population Dynamics of Off-Host *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) Larvae in Response to Habitat and Seasonality in South Texas. *Veterinary Sciences*, 5(2), 33. <https://doi.org/10.3390/vetsci5020033>
- Lieberman, M., & Md, P. (2017). Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach (5th ed.).
- Ling, S., Shan, Q., Liu, P., Feng, T., Zhang, X., Xiang, P., Chen, K., Xie, H., Song, P., Zhou, L., Liu, J., Zheng, S., & Xu, X. (2017). Metformin ameliorates arsenic trioxide hepatotoxicity via inhibiting mitochondrial complex I. *Cell Death & Disease*, 8(11), e3159–e3159. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.482>

- Liot, G., Bossy, B., Lubitz, S., Kushnareva, Y., Sejbuk, N., & Bossy-Wetzel, E. (2009). Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death & Differentiation*, 16(6), 899–909. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.22>
- Lu, X., Vandenhole, M., Tsakireli, D., Pergantis, S. A., Vontas, J., Jonckheere, W., & Van Leeuwen, T. (2023). Increased metabolism in combination with the novel cytochrome b target-site mutation L258F confers cross-resistance between the Qo inhibitors acequinocyl and bifenthrin in *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 192, 105411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105411>
- Lümmen, P. (1998). Complex I inhibitors as insecticides and acaricides1Dedicated to the memory of Dr. Gerhard Salbeck.1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1364(2), 287–296. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00034-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00034-6)
- Makenov, M. T., Toure, A. H., Korneev, M. G., Sacko, N., Porshakov, A. M., Yakovlev, S. A., Radyuk, E. V., Zakharov, K. S., Shipovalov, A. V., Boumbaly, S., Zhurenkova, O. B., Grigoreva, Y. E., Morozkin, E. S., Fyodorova, M. V., Boiro, M. Y., & Karan, L. S. (2021). *Rhipicephalus microplus* and its vector-borne haemoparasites in Guinea: further species expansion in West Africa. *Parasitology Research*, 120(5), 1563-1570. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07122-x>
- Mason, T. L., Poyton, R. O., Wharton, D. C., & Schatz, G. (1973). Cytochrome c Oxidase from Bakers' Yeast: I. ISOLATION AND PROPERTIES. *Journal of Biological Chemistry*, 248(4), 1346–1354. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)44305-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)44305-6)
- Mathers, K. E., McFarlane, S. V, Zhao, L., & Staples, J. F. (2017). Regulation of mitochondrial metabolism during hibernation by reversible suppression of electron transport system enzymes.

Journal of Comparative Physiology B, 187(1), 227–234. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1022-0>

Menichini, F., Tundis, R., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Marrelli, M., Statti, G. A., Menichini, F., & Conforti, F. (2009). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition of ethanolic extract and monoterpenes from *Pimpinella anisoides* V Brig. (Apiaceae). *Fitoterapia*, 80(5), 297–300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.03.008>

Metzger, S. U., Cramer, W. A., & Whitmarsh, J. (1997). Critical analysis of the extinction coefficient of chloroplast cytochrome f. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1319(2), 233–241. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(96\)00164-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728(96)00164-8)

Mirhassani, R., & Seyedjafari, E. (2016). Kinetics of infected insect cell osmolysis and enhanced protein release using a modified disruption method. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(11), 1729–1735. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1648-z>

Miyazawa, M., & Yamafuji, C. (2005). Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Bicyclic Monoterpenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1765–1768. <https://doi.org/10.1021/jf040019b>

Montagut, D. C., Bueno, Y., Vesga, L. C., Stashenko, E. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2022). *Cymbopogon flexuosus* (nees ex steud.) w. watson essential oil effect on mitochondrial bioenergetics. *Journal of Essential Oil Research*, 34(3), 233–239. <https://doi.org/10.1080/10412905.2022.2050315>

Monteiro, C., Lage, T. C. de A., Marchesini, P., Vale, L., Perinotto, W. M. de S., Lopes, W. D. Z., Fernandes, S. A., Bittencourt, V. R. E. P., Furlong, J., & Prata, M. C. de A. (2021). Combination of entomopathogenic nematodes with acaricides or essential oil of *Lippia triplinervis* against

MECANISMO DE ACCIÓN ACARICIDA SOBRE R. microplus

Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 23, 100526. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100526>

Monteiro, I. N., Monteiro, O. dos S., Costa-Junior, L. M., da Silva Lima, A., Andrade, E. H. de A., Maia, J. G. S., & Mouchrek Filho, V. E. (2017). Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 238, 54–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.016>

Monzote, L., Stamberg, W., Staniek, K., & Gille, L. (2009). Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3), 337–347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.001>

Mota, T. F., Silva, C. M. de A., Conceição, M. dos S., Fraga, D. B. M., Brodskyn, C. I., Neto, M. F. de A., Santana, I. B., Mesquita, P. R. R., Leite, F. H. A., & Magalhães-Júnior, J. T. (2022). Screening organic repellent compounds against *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) present in plant essential oils: Bioassay plus an in silico approach. *Acta Tropica*, 229, 106367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106367>

Mowery, P. C., Ackrell, B. A. C., Singer, T. P., White, G. A., & Thorn, G. D. (1976). Carboxins: Powerful selective inhibitors of succinate oxidation in animal tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(1), 354–361. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90290-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90290-4)

Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31–36. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)

MECANISMO DE ACCIÓN ACARICIDA SOBRE R. microplus

- Mwangi, E. N., Essuman, S., Kaaya, G. P., Nyandat, E., Munyinyi, D., & Kimondo, M. G. (1995). Repellence of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* by the grass *Melinis minutiflora*. *Tropical Animal Health and Production*, 27(4), 211–216. <https://doi.org/10.1007/BF02250692>
- Nelson, D., & Cox, M. (2021). *Lehninger principles of biochemistry* (8th ed.).
- Nicholls, D., & Ferguson, S. (2014). *Bioenergetics*.
- Nolan, J. (1981). Current developments in resistance to amidine and pyrethroid tickicides in Australia. In G. Whitehead & J. Gibson (Eds.), *Tick biology and control: proceedings of an International Conference*.
- Novato, T. P., Milhomem, M. N., Marchesini, P. B. C., Coutinho, A. L., Silva, I. S., de Souza Perinotto, W. M., de Azevedo Prata, M. C., Ferreira, L. L., Lopes, W. D. Z., Costa-Júnior, L. M., & de Oliveira Monteiro, C. M. (2022). Acaricidal activity of carvacrol and thymol on acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) populations and combination with cypermethrin: Is there cross-resistance and synergism? *Veterinary Parasitology*, 310, 109787. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109787>
- Nuñez, J., Muñoz, M., & Moltedo, H. (1982). *Boophilus microplus*: la garrapata comun del ganado vacuno.
- Panella, N. A., Dolan, M. C., Karchesy, J. J., Xiong, Y., Peralta-cruz, J., Khasawneh, M., Montenieri, J. A., & Maupin, G. O. (2005). Use of Novel Compounds for Pest Control: Insecticidal and Acaricidal Activity of Essential Oil Components from Heartwood of Alaska Yellow Cedar. *Journal of Medical Entomology*, 42(3), 352–358. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.3.352>
- Pereira, D. F. S., Ribeiro, H. S., Gonçalves, A. A. M., da Silva, A. V., Lair, D. F., de Oliveira, D. S., Boas, D. F. V., Conrado, I. dos S. S., Leite, J. C., Barata, L. M., Reis, P. C. C., Mariano, R. M. da S., Santos, T. A. P., Coutinho, D. C. O., Gontijo, N. de F., Araujo, R. N., Galdino, A. S., Paes, P.

- R. de O., Melo, M. M., ... Giunchetti, R. C. (2022). *Rhipicephalus microplus*: An overview of vaccine antigens against the cattle tick. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(1), 101828. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101828>
- Pérez, M., Méndez, S., Duque, J., & Vesga, L. (2022). Actividad larvicida de metabolitos de plantas que afectan la bioenergética mitocondrial de mosquitos *Aedes aegypti* [Tesis de pregrado]. Universidad Industrial de Santander.
- Podrabsky, J. E., & Hand, S. C. (2015). Physiological strategies during animal diapause: lessons from brine shrimp and annual killifish. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1897–1906. <https://doi.org/10.1242/jeb.116194>
- Politi, F. A. S., Figueira, G. M., Araújo, A. M., Sampieri, B. R., Mathias, M. I. C., Szabó, M. P. J., Bechara, G. H., dos Santos, L. C., Vilegas, W., & Pietro, R. C. L. R. (2012). Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Parasites & Vectors*, 5(1), 295. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-295>
- Porrini, M. P., Garrido, P. M., Umpiérrez, M. L., Porrini, L. P., Cuniolo, A., Davyt, B., González, A., Eguaras, M. J., & Rossini, C. (2020). Effects of Synthetic Acaricides and *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) on Molecules Associated with Chemical Communication and Recognition in Honey Bees. *Veterinary Sciences*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/vetsci7040199>
- Pujol-Vila, F., Vigués, N., Guerrero-Navarro, A., Jiménez, S., Gómez, D., Fernández, M., Bori, J., Vallès, B., Riva, M. C., Muñoz-Berbel, X., & Mas, J. (2016). Paper-based chromatic toxicity bioassay by analysis of bacterial ferricyanide reduction. *Analytica Chimica Acta*, 910, 60–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.006>

- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A., & Racker, E. (1960). Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation: I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 235(11), 3322–3329. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81361-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81361-1)
- Quadros, D. G., Johnson, T. L., Whitney, T. R., Oliver, J. D., & Oliva Chávez, A. S. (2020). Plant-Derived Natural Compounds for Tick Pest Control in Livestock and Wildlife: Pragmatism or Utopia? *Insects*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/insects11080490>
- Ren, Z., & Gould, M. N. (1994). Inhibition of ubiquinone and cholesterol synthesis by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Letters*, 76(2), 185–190. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)90396-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3835(94)90396-4)
- Richey, E. J. (1991). Bovine Anaplasmosis. *American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings*, 3–11. <https://doi.org/10.21423/aabppro19916695>
- Roberts, M., Roberts, M. B., & Monger, G. (2000). *Advanced Biology* (Nelson Thornes).
- Rodriguez Vivas, R. I., Rosado-Aguilar, J., Ojeda, M., Perez-Cogollo, L. C., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1, 295–308. <https://doi.org/10.19136/era.a1n3.660>
- Rodriguez-Berriguete, G., Puliyadi, R., Machado, N., Barberis, A., Prevo, R., McLaughlin, M., Buffa, F. M., Harrington, K. J., & Higgins, G. S. (2024). Antitumour effect of the mitochondrial complex III inhibitor Atovaquone in combination with anti-PD-L1 therapy in mouse cancer models. *Cell Death & Disease*, 15(1), 32. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06405-8>
- Rodriguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, 117(1), 3–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>

- Rustin, P., Munnich, A., & Rötig, A. (2002). Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *European Journal of Human Genetics*, 10(5), 289–291. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200793>
- Rutter, J., Winge, D. R., & Schiffman, J. D. (2010). Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion*, 10(4), 393–401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.03.001>
- Sangjin, H., & L, P. P. (2008). ATP Synthase and the Actions of Inhibitors Utilized To Study Its Roles in Human Health, Disease, and Other Scientific Areas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 590–641. <https://doi.org/10.1128/membr.00016-08>
- Satti, R. A., Awadelkareem, E. A., Suganuma, K., Salim, B., Inoue, N., Xuan, X., Rehan, S., & Mossaad, E. (2021). Cattle anaplasmosis and babesiosis: Major tick-borne diseases affecting the cattle industry in Khartoum State, Sudan. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 26, 100632. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100632>
- Senbill, H., Hazarika, L. K., Baruah, A., Borah, D. K., Bhattacharyya, B., & Rahman, S. (2018). Life cycle of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini 1888 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Systematic and Applied Acarology*, 23(6), 1169. <https://doi.org/10.11158/saa.23.6.12>
- Shanmuganath, C., Kumar, S., Singh, R., Sharma, A. K., Saminathan, M., Saini, M., Chigure, G., Fular, A., Kumar, R., Juliet, S., Upadhaya, D., Kumar, B., Srivastava, S., & Ghosh, S. (2021). Development of an efficient antitick natural formulation for the control of acaricide-resistant ticks on livestock. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(3), 101655. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101655>
- Sigma Aldrich. (2022). Ficha de Seguridad Carvacrol.

- Singer, T. P. (1974). Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and α -Glycerophosphate Dehydrogenases. In *Methods of Biochemical Analysis* (pp. 123–175). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470110423.ch3>
- Singh, K., Kumar, S., Sharma, A. K., Jacob, S. S., RamVerma, M., Singh, N. K., Shakya, M., Sankar, M., & Ghosh, S. (2022). Economic impact of predominant ticks and tick-borne diseases on Indian dairy production systems. *Experimental Parasitology*, 243, 108408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108408>
- Soderlund, D. M. (2010). Chapter 77 - Toxicology and Mode of Action of Pyrethroid Insecticides. In R. Krieger (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)* (pp. 1665–1686). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00077-X>
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*, 86(2), 165–181. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0726-x>
- Somlo, M. (1965). Induction des lactico-cytochrome c reductases (d-et l-) de la levure aerobie par les lactates (d- et l-). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 97(2), 183–201. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4165\(65\)90083-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4165(65)90083-8)
- Sonenshine, D. E., LANE, R. S., & NICHOLSON, W. L. (2002). 24 - TICKS (Ixodida). In G. MULLEN & L. DURDEN (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology* (pp. 517–558). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012510451-7/50026-8>
- Sousa, J. S., D'Imprima, E., & Vonck, J. (2018). Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. In J. R. Harris & E. J. Boekema (Eds.), *Membrane Protein Complexes: Structure and Function* (pp. 167–227). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7
- Spare, M. R., Hanzlicek, G. A., Wootten, K. L., Anderson, G. A., Thomson, D. U., Sanderson, M. W., Ganta, R. R., Reif, K. E., & Raghavan, R. K. (2020). Bovine anaplasmosis herd prevalence and

MECANISMO DE ACCIÓN ACARICIDA SOBRE R. microplus

- management practices as risk-factors associated with herd disease status. *Veterinary Parasitology*, 277, 100021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2019.100021>
- Sparks, T., & Deamicis, C. (2012). Inhibitors of mitochondrial electron transport: acaricides and insecticides. *Modern Crop Protection Compounds*, 1078–1108.
- Stellarnet. (2018). Redox Titration of Ferricyanide to Ferrocyanide with Ascorbic Acid .
- Tabor, A. E., Ali, A., Rehman, G., Rocha Garcia, G., Zangirolamo, A. F., Malardo, T., & Jonsson, N. N. (2017). Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-Host Interface: A Review of Resistant and Susceptible Host Responses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00506>
- Terry, A. V. (2012). Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(3), 355–365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.001>
- Thinnabut, K., Rodpai, R., Sanpool, O., Maleewong, W., & Tangkawanit, U. (2023). Genetic diversity of tick (Acari: Ixodidae) populations and molecular detection of Anaplasma and Ehrlichia infesting beef cattle from upper-northeastern Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 107, 105394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105394>
- Thullner, F., Willadsen, P., & Kemp, D. (2007). Acaricide Rotation Strategy for Managing Resistance in the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarina: Ixodidae): Laboratory Experiment with a Field Strain from Costa Rica. *Journal of Medical Entomology*, 44(5), 817–821. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.5.817>
- Tihelka, E. (2018). Effects of synthetic and organic acaricides on honey bee health: a review. *Slovenian Veterinary Research*, 55(3). <https://doi.org/10.26873/SVR-422-2017>

MECANISMO DE ACCIÓN ACARICIDA SOBRE R. microplus

- Underwood, W. J., Blauwiekel, R., Delano, M. L., Gillesby, R., Mischler, S. A., & Schoell, A. (2015). Chapter 15 - Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle). In J. G. Fox, L. C. Anderson, G. M. Otto, K. R. Pritchett-Corning, & M. T. Whary (Eds.), *Laboratory Animal Medicine* (Third Edition) (pp. 623–694). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00015-8>
- Uribe, S., Alvarez, R., & Peña, A. (1984). Effects of β -pinene, a nonsubstituted monoterpene, on rat liver mitochondria. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22(1), 43–50.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90008-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90008-7)
- Uribe, S., Rangel, P., & Peña, A. (1991). Molecular association enhances the toxic effects of non-substituted monoterpene suspensions on isolated mitochondria. *Xenobiotica*, 21(5), 679–688.
<https://doi.org/10.3109/00498259109039508>
- USDA. (2024). Pest Alert - Cattle fever ticks and cattle fever. Animal and Plant Health Inspection Service.
- Valencia, C. E., Appel, V. A., Ruíz, G. A., & Salazar, H. (2017). Identification and prevalence of ticks (ACARI: Ixodidae) in bovines in five municipalities of the Popayán plateau (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 30(3), 239–247. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v30n3a07>
- van Wieren, S. E., Braks, M. A. H., & Lahr, J. (2016). 19. Effectiveness and environmental hazards of acaricides applied to large mammals for tick control (pp. 265–278). Wageningen Academic.
https://doi.org/10.3920/978-90-8686-838-4_19
- Vanegas-Estévez, T., Duque, F. M., Urbina, D. L., Vesga, L. C., Mendez-Sanchez, S. C., & Duque, J. E. (2024). Design and elucidation of an insecticide from natural compounds targeting mitochondrial proteins of *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry And Physiology*, 198, 105721.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105721>

- Venkatesh, S., Ramachandran, A., Zachariah, A., & Oommen, A. (2009). Mitochondrial ATP synthase inhibition and nitric oxide are involved in muscle weakness that occurs in acute exposure of rats to monocrotophos. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 19(3), 239–245.
<https://doi.org/10.1080/15376510802455354>
- Vidau, C., González-Polo, R. A., Niso-Santano, M., Gómez-Sánchez, R., Bravo-San Pedro, J. M., Pizarro-Estrella, E., Blasco, R., Brunet, J.-L., Belzunces, L. P., & Fuentes, J. M. (2011). Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *NeuroToxicology*, 32(6), 935–943.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.04.006>
- Whitehouse, D., May, B., & Moore, A. (2019). Respiratory Chain and ATP Synthase.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95732-5>
- WOAH. (2023a). Anaplasmosis bovina. In *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres: Vol. 3.4.1.* (12th ed.).
- WOAH. (2023b). Babesiosis bovina. In *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres: Vol. 3.4.2.*
- Wojtovich, A. P., & Brookes, P. S. (2008). The endogenous mitochondrial complex II inhibitor malonate regulates mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: Implications for ischemic preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(7), 882–889.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2008.03.025>
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., & Eyer, P. (1999). Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta*, 288(1–2), 73–90.
[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00144-8)

- Yadav, N., Upadhyay, R., Ravi, K., & Upadhyay. (2022). Acaricidal potential of various plant natural products: A review. *International Journal of Green Pharmacy*, 15, 353.
- Yang, Q., Wang, L., Liu, J., Cao, W., Pan, Q., & Li, M. (2021). Targeting the complex I and III of mitochondrial electron transport chain as a potentially viable option in liver cancer management. *Cell Death Discovery*, 7(1), 293. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00675-x>
- Yin, Q., Yan, F., Zu, X.-Y., Wu, Y., Wu, X., Liao, M., Deng, S., Yin, L., & Zhuang, Y. (2012). Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64(1), 43–51. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9389-y>
- Yoshida, J., Ohishi, T., Abe, H., Ohba, S., Inoue, H., Usami, I., Amemiya, M., Oriez, R., Sakashita, C., Dan, S., Sugawara, M., Kawaguchi, T., Ueno, J., Asano, Y., Ikeda, A., Takamatsu, M., Amori, G., Kondoh, Y., Honda, K., ... Kawada, M. (2021). Mitochondrial complex I inhibitors suppress tumor growth through concomitant acidification of the intra- and extracellular environment. *IScience*, 24(12), 103497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103497>
- Zhang, Y., Kua, J., & McCammon, J. A. (2002). Role of the Catalytic Triad and Oxyanion Hole in Acetylcholinesterase Catalysis: An ab initio QM/MM Study. *Journal of the American Chemical Society*, 124(35), 10572–10577. <https://doi.org/10.1021/ja020243m>
- Zhang, Y., Luo, M., Xu, W., Yang, M., Wang, B., Gao, J., Li, Y., & Tao, L. (2016). Avermectin Confers Its Cytotoxic Effects by Inducing DNA Damage and Mitochondria-Associated Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(36), 6895–6902. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02812>
- Zhou, X., & Fenical, W. (2016). The unique chemistry and biology of the piericidins. *The Journal of Antibiotics*, 69(8), 582–593. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.71>

Zhou, Y., Wang, S., & Zhang, Y. (2010). Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase Determined by Born–Oppenheimer Ab Initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(26), 8817–8825. <https://doi.org/10.1021/jp104258d>