

EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* Y SUS METABOLITOS MAYORITARIOS SOBRE EL DESARROLLO LARVAL
DE
Aedes aegypti Linnaeus, 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)

Adriana Lisseth Rodríguez Villamizar

Informe final del trabajo de investigación para optar por el título de
Química

Director

Stelia Carolina Méndez Sánchez, Ph.D.

Grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM)

Codirectores

Jonny Edward Duque Luna, Ph.D.

Ruth Mariela Castillo Morales, MSc.

Centro de investigaciones de enfermedades tropicales (CINTROP)

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

Primero a Dios por permitirme terminar el presente proyecto de grado. Igualmente, quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional durante este tiempo. Por otra parte, quiero agradecer a mis directores, el profesor Jonny Duque y la profesora Stelia Méndez por su confianza, apoyo y supervisión durante la realización de este trabajo. Al centro de investigaciones de enfermedades tropicales- CINTROP y al laboratorio de espectrometría de masas (Sol) por facilitar sus instalaciones y equipos para el desarrollo del proyecto.

Finalmente, quiero agradecer a mis compañeros del grupo de investigación a Ruth por su paciencia, enseñanzas y apoyo, a Luisa (la ingenierita), Mafe, Gustavo, Sebastián, Diana, Edwin, Ramiro, Diego, Vanesa, y Juliana por sus supervisiones y buena energía, que más que compañeros se convirtieron en amigos. Por ultimo a Alexandra, Ximena y Lunita por hacer parte de mi vida y creer en mí y a todos aquellos que hicieron parte de mi formación.

Tabla de contenido

<i>Introducción</i>	13
1 Objetivos	16
1.1 Objetivo general	16
1.2 Objetivos específicos.	16
2 Fundamento teórico	17
2.1 <i>Aedes aegypti</i>	17
2.1.1 Ciclo de vida	17
2.2 Regulación hormonal del ciclo de vida	18
2.2.1 Ecdisona.	20
2.2.2 Hormona Juvenil	23
2.3 Mecanismos de resistencia de <i>Aedes aegypti</i> a insecticidas	24
2.3.1 Reguladores de crecimiento en insectos (RCI)	27
2.4 Cuantificación de la hormona juvenil (HJ) y hormona de la muda (HM).	29
2.5 Aceites esenciales	29
2.5.1 El aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i>	31
2.6 Modelado molecular	32
3 Metodología	33
3.1 Material biológico	33

3.2	Obtención del Aceite esencial y compuestos mayoritarios	33
3.3	Determinación del efecto inhibitorio del <i>C. flexuosus</i> y sus compuestos mayoritarios	
	34	
3.4	Método de obtención de los niveles de hormona juvenil y hormona de la muda	35
3.5	Modelado molecular.....	38
4	Resultados.....	39
4.1	Actividad inhibitoria del crecimiento del aceite esencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i>	39
	sobre <i>Aedes aegypti</i>.....	39
4.1.1	Efecto del <i>Cymbopogon flexuosus</i>	40
4.2	Modelado molecular.....	45
4.2.1	Biosíntesis de la Hormona de la Muda	46
4.2.2	Biosíntesis de la Hormona Juvenil.....	48
4.2.3	Hormona Juvenil III con su receptor.....	51
4.2.4	Hormona de la muda con su receptor.....	52
4.3	HPLC.....	53
4.3.1	Hormona de la Muda (Patrón).....	53
4.3.2	Hormona Juvenil III (Patrón)	56
5	Discusión	60
6	Conclusiones	64
7	Recomendaciones.....	65
	Referencias Bibliográficas.....	66

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Alternativas de control de Ae. aegypti en estados inmaduros recomendados por la OMS. (Villarreal, 2012)</i>	26
Tabla 2. <i>Gradiente de Elusión (Zhou et al 2011)</i>	37
Tabla 3. <i>Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre los diferentes compuestos Acetato de geranilo, citral(isómeros), diflubenzuron, metopreno y las enzimas involucradas en la biosíntesis de la Hormona de la Muda.</i>	46
Tabla 4. <i>Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre las enzimas involucradas en la biosíntesis de la Hormona de la muda y sus correspondientes sustratos asociados a la ruta metabólica</i>	48
Tabla 5. <i>Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre los diferentes compuestos Acetato de geranilo, citral(isómeros), diflubenzuron, metopreno y las enzimas involucradas en la biosíntesis de la Hormona Juvenil III.</i>	48
Tabla 6. <i>Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre las enzimas involucradas en la biosíntesis de la Hormona Juvenil III y sus correspondientes sustratos asociados a la ruta metabólica</i>	50
Tabla 7. <i>Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre el receptor MetI y los sustratos Acetato de geranilo, citral(isómeros), diflubenzuron, metopreno, Hormona de la muda y Hormona juvenil III.</i>	51
Tabla 8. <i>Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre el receptor USP y los sustratos Acetato de geranilo, citral(isómeros), diflubenzuron, metopreno, Hormona juvenil III y Hormona de la muda.</i>	52

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> . (http://www.investigacionyciencia.es/blogs/	18
Figura 2. Variación en las concentraciones hormonales en ecdisona y HJ. (Dow AgroScience, n.d.).....	19
Figura 3. Fórmula estructural de la Hormona de la muda (ecdisona). (Klowden, 2007)	20
Figura 4. Fórmula estructural de la 20-hidroxiecdisona. (Klowden, 2007).....	21
Figura 5. Biosíntesis de la hormona Juvenil y de la hormona de la muda. https://www.kegg.jp/pathway/aag00981	22
Figura 6. Fórmula estructural de la Hormona juvenil (JH III). (Klowden, 2007)	23
Figura 7. Fórmula estructural del Diflubenzuron. (Klowden, 2007).....	28
Figura 8. Fórmula estructural Metopreno. (Klowden, 2007).....	28
Figura 9. Estructura del citral (isómeros) y acetato de geranilo, componentes mayoritarios del AE de <i>Cymbopogon flexuosus</i> .(Martínez, 2001; Quintans-Júnior et al., 2013).....	32
Figura 10. Vista general de un equipo de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas. Fuente: Lab Espectrometría de Masas. UIS-Guatiguara.....	38
Figura 11. Duración en días de los estadios larvales 3 y 4(L3-4), pupa y adulto de <i>Aedes aegypti</i> , tratadas con el aceite <i>Cymbopogon flexuosus</i> a las concentraciones de 3 mg. L ⁻¹ y 6mg.L ⁻¹	40
Figura 12. Duración en días de los estadios larvales 3 y 4(L3-4), pupa y adulto de <i>Aedes aegypti</i> , tratadas con el Diflubenzuron y metopreno a las concentraciones de 3 mg. L ⁻¹ y 6mg. L ⁻¹	41
Figura 13. Promedio en mm de medición de cabeza, sifón y largo de la larva en <i>Aedes aegypti</i> tratamiento control. ^a diferencias estadísticas significativas entre AE 3 mg. L ⁻¹ y diflubenzuron 3 mg. L ⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo (Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,56182, df = 15,000); ^b diferencias estadísticas significativas entre AE 6 mg. L ⁻¹ y	

diflubenzuron 6 mg. L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo 6 mg. L⁻¹ Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,53133, df = 15,000). 42

Figura 14. Duración en días de los estadios larvales 3 y 4(L3-4), pupa y adulto de *Aedes aegypti*, tratadas con citral a las concentraciones de 18 mg. L⁻¹, 30 mg. L⁻¹ y 42 mg. L⁻¹ 43

Figura 15. Promedio en mm de medición de cabeza, sifón y largo de la larva en *Aedes aegypti* tratamiento control. ^a diferencias estadísticas significativas entre Citral 18 mg. L⁻¹ y Diflubenzuron 3 mg. L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo citral 18 mg. L⁻¹ diflubenzuron 3 mg. L⁻¹ Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,45783, df = 15,000); ^b diferencias estadísticas significativas entre Citral 30 mg.L⁻¹ y Diflubenzuron 6 mg.L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo 30 citral 6 ppm Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,48252, df = 15,000). 43

Figura 16. Duración en días de los estadios larvales 3 y 4(L3-4), pupa y adulto de *Aedes aegypti*, tratadas con acetato de geranilo a las concentraciones de 18 mg. L⁻¹, 30 mg. L⁻¹ y 42 mg. L⁻¹ ... 44

Figura 17. Promedio en mm de medición de cabeza, sifón y largo de la larva en *Aedes aegypti* tratamiento control. ^a diferencias estadísticas significativas entre Citral 18 mg. L⁻¹ y Diflubenzuron 3 mg. L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo acetato de geranilo 18 mg. L⁻¹ diflubenzuron 3 mg. L⁻¹ Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,45783, df = 15,000); ^b diferencias estadísticas significativas entre acetato de geranilo 30 mg.L⁻¹ y Diflubenzuron 6 mg.L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo 30 citral 6 ppm Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,48252, df = 15,000). 45

Figura 18. Espectro obtenido después de corrida la muestra de patrón de Hormona de la muda, el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo(minutos) que tarda en salir determinada señal..... 54

Figura 19. Espectro obtenido después de corrida la muestra de patrón de Hormona de la muda, el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo(minutos) que tarda en salir determinada señal..... 55

Figura 20. Espectro obtenido después de corrida la muestra de patrón de Hormona Juvenil III, el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo(minutos) que tarda en salir determinada señal..... 57

Figura 21. Espectro obtenido después de corrida la muestra de patrón de la Hormona Juvenil III, el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo(minutos) que tarda en salir determinada señal..... 57

Figura 22. Espectro obtenido después de corrida la muestra de diflubenzuron a 6 mg. L^{-1} , el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo(minutos) que tarda en salir determinada señal..... 59

Figura 23. Espectro obtenido después de corrida la muestra de metopreno a 6 mg. L^{-1} , el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo(minutos) que tarda en salir determinada señal..... 60

Resumen

TÍTULO: EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Cymbopogon flexuosus* Y SUS METABOLITOS MAYORITARIOS SOBRE EL DESARROLLO LARVAL DE *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae)¹

AUTOR: ADRIANA LISSETH RODRIGUEZ VILLAMIZAR²

PALABRAS CLAVE: Reguladores de crecimiento, hormona juvenil, hormona de la muda, *Aedes aegypti*, *Cymbopogon flexuosus*.

DESCRIPCIÓN:

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) es el principal vector de arbovirus causantes de enfermedades como dengue, zika y chikungunya. Actualmente la principal estrategia de control de la transmisión consiste en el uso de insecticidas químicos pero debido al uso continuado de estos insecticidas han generado poblaciones resistentes a los diferentes principios activos. Por tal razón se plantean nuevas alternativas como evaluar la acción inhibitoria del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre el desarrollo del ciclo de vida de *Ae. aegypti*. Para esto, se tomaron larvas L3 a evaluar con el AE a concentraciones sub-letales de 3 mg. L⁻¹ y 6 mg. L⁻¹ y sus compuestos mayoritarios (citral y acetato de geranilo) a 18 mg. L⁻¹, 30 mg. L⁻¹ y 42 mg. L⁻¹. Como control positivo se empleó Diflubenzuron (3 mg. L⁻¹ y 6 mg. L⁻¹) y Metopreno (3 mg. L⁻¹ y 6 mg. L⁻¹). De cada tratamiento se tomaron 5 larvas para identificar posibles cambios morfológicos en tamaño de la larva, diámetro de cabeza y largo del sifón. Se encontraron diferencias estadísticas significativas en el diámetro de cabeza, tamaño de la larva y largo de sifón entre las diferentes concentraciones del aceite de *C. flexuosus* y sus controles positivos. A diferencia de las larvas tratadas con los compuestos mayoritarios citral y acetato de geranilo con sus respectivas concentraciones donde no se evidencio cambios morfológicos al compararlos con el tratamiento control evidenciándose otro mecanismo de acción a diferencia del aceite esencial. Adicionalmente, para aclarar las alteraciones en los niveles hormonales, se usó la técnica de HPLC acoplada a masas para corroborar los resultados biológicos y Modelado molecular, que mostro que posiblemente hay interacción entre las enzimas involucradas en la biosíntesis de la hormona juvenil III y hormona de la muda en larvas tratadas con los compuestos mayoritarios citral y acetato de geranilo.

¹ Trabajo de pregrado.

² Facultad de ciencias básicas. Escuela de Química. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Profesor Titular. Co-directores: Jonny Edward Duque Luna, Ruth Mariela Castillo Morales.

Abstract

TITLE: EVALUATION OF THE INHIBITORY EFFECT OF THE ESSENTIAL OIL OF *Cymbopogon flexuosus* AND ITS MAJORITY METABOLITES ON THE LARVAL DEVELOPMENT OF *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae)³

AUTHOR: ADRIANA LISSETH RODRIGUEZ VILLAMIZAR⁴

KEYWORDS: Regulators of growth, juvenile hormone, molting hormone, *Aedes aegypti*, *Cymbopogon flexuosus*

DESCRIPTION:

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) is the main vector of arboviruses that cause diseases such as dengue, zika, and chikungunya. Currently, the main transmission control strategy consists of the use of chemical insecticides, but due to the continued use of these insecticides, they have generated populations resistant to the different active ingredients. For this reason, new alternatives are proposed such as evaluating the inhibitory action of the essential oil of *Cymbopogon flexuosus* on the development of the life cycle of *Ae. aegypti*. For this, larvae L3 were taken to evaluate the EA at sub-lethal concentrations of 3 mg. L⁻¹ and 6 mg. L⁻¹ and its major compounds (citral and geranyl acetate) at 18 mg. L⁻¹, 30 mg. L⁻¹ and 42 mg. L⁻¹. Diflubenzuron (3 mg. L⁻¹ and 6 mg. L⁻¹) and Methoprene (3 mg. L⁻¹ and 6 mg. L⁻¹) were used as a positive control. Five larvae were taken from each treatment to identify possible morphological changes in larval size, head diameter, and siphon length. Significant statistical differences were found in head diameter, larval size and siphon length between the different concentrations of *C. flexuosus* oil and its positive controls. Unlike the larvae treated with the major compounds citral and geranyl acetate with their respective concentrations where no morphological changes were observed when compared with the control treatment, another mechanism of action was observed, unlike the essential oil. Additionally, to clarify alterations in hormone levels, the mass-coupled HPLC technique was used to corroborate the biological results and molecular modeling, which showed that there is possibly an interaction between the enzymes involved in the biosynthesis of juvenile hormone III and hormone molting in larvae treated with the major compounds citral and geranyl acetate.

³ Undergraduate thesis.

⁴ Facultad de ciencias básicas. Escuela de Química. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez, Profesor Titular. Co-directores: Jonny Edward Duque Luna, Ruth Mariela Castillo Morales.

Introducción

Anualmente más de 2,5 billones de personas están en riesgo de contraer diferentes arbovirosis como dengue, zika y chikungunya, principalmente áreas urbanas y periurbanas ubicadas en zonas tropicales y subtropicales, debido principalmente a la presencia del vector *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Bhatt *et al.*, 2013; Guzman *et al.*, 2010; Organización Mundial de la Salud, 2016).

En la actualidad no hay tratamiento específico ni vacuna efectiva para ninguna de las tres enfermedades (Rodríguez, 2002) , por ello, la principal estrategia de control consiste en limitar el crecimiento poblacional del vector mediante la aplicación de insecticidas químicos que ocasionen una disminución poblacional de los estadios juveniles y adultos (temefos para estadios larvales y piretroides como deltametrina, lambdacialotrina, ciflutrina y malation para adultos) (Galvis & Soto, 2010; Santacoloma *et al.*, 2010). Entre los productos químicos que cuenta con mayor grado de especificidad se encuentran los reguladores de crecimiento de insectos (Insect Growth Regulators IGR). Estos productos difieren ampliamente de los insecticidas convencionales debido a que causan cambios morfológicos y fisiológicos durante el proceso de desarrollo y la metamorfosis (Villareal, 2012) . Entre los reguladores de crecimiento más usados se encuentran el diflubenzuron (inhibidor de la síntesis de quitina) y el metopreno (Análogo a la hormona juvenil) (McGraw *et al.*, 2013).

Sin embargo, el uso inadecuado e indiscriminado de estos productos tradicionales ha generado poblaciones resistentes a los principios activos (Grisales *et al.*, 2013; Harris *et al.*, 2010; Lima *et*

al., 2011; OMS, 1992). Por ello, los estudios se han enfocado en contrarrestar la generación de diferentes mecanismos de resistencia a los insecticidas (Badii *et al.*, 2007; Bisset, 2002; Muñoz *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha buscado reemplazar el uso de productos químicos por productos alternos que se descompongan fácilmente, a corto plazo, no generen residuos y sean ambientalmente seguros (Kishore *et al.*, 2011; Mullai *et al.*, 2008; Pala *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta la urgente necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control, han surgido algunas alternativas como el uso de controladores biológicos (depredadores naturales, bacterias y hongos entomopatógenos) y el uso de sustancias derivadas de plantas, como los aceites esenciales y extractos (Amariles *et al.*, 2013). Una de las principales alternativas de reemplazo contempla el uso de aceites esenciales y sus componentes mayoritarios. Los aceites esenciales están constituidos por monoterpenos y sesquiterpenos junto con otros hidrocarburos volátiles, que actúan en forma sinérgica en diferentes puntos diana de los insectos y son capaces de ejercer un efecto xenobiótico (Demirci *et al.*, 2013). Diferentes autores han demostrado su acción insecticida, de repelencia, como inhibidores de la metamorfosis y causantes de daños reproductivos en las hembras (Isman 2006; Kishore *et al.*, 2011; Shaalan *et al.*, 2005). También se ha demostrado ampliamente el efecto de diferentes aceites esenciales en el control de *Ae. aegypti*, mediante una acción de tipo ovicida, larvicida, adulticida, de inhibición del crecimiento, repelencia, y acción deterrente (Coria *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012; Lucia *et al.*, 2007; Prajapati, Tripathi *et al.*, 2005; Tennyson *et al.*, 2013).

Considerando que la fase juvenil de los mosquitos se desarrolla en ambientes acuáticos y que cualquier interferencia o alteración ocasionada por fuentes externas de hormonas o reguladores de crecimiento puede dar lugar a la interrupción del ciclo de vida e incluso anomalías en el desarrollo de los adultos (Hoffmann & Lorenz, 1998), el presente trabajo busca determinar la duración del estadio L3 en larvas del mosquito *Ae. Aegypti* así como evaluar los efectos en la morfología de las larvas tratadas con el aceite esencial *Cymbopogon flexuosus* y sus componentes mayoritarios (citral y acetato de geranilo); además de buscar posibles alteraciones en los niveles hormonales (Hormona juvenil y Hormona de la muda) de larvas de tercer instar usando la técnica de HPLC acoplada a masas, y mediante modelado molecular determinar la especificidad de respuesta de los componentes mayoritarios y los patrones (metopreno y diflubenzuron) a los sitios activos de los sustratos involucrados en la biosíntesis de las principales hormonas involucradas en el desarrollo del mosquito.

1 Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el potencial efecto inhibitorio del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* y sus compuestos mayoritarios (Citral y acetato de geranilo) sobre el 3er estadio larval de *Aedes aegypti*.

1.2 Objetivos específicos.

- Establecer la duración en tiempo del estadio L3 en larvas de *Ae. aegypti* durante el tratamiento con el aceite esencial de *C. flexuosus* y sus compuestos mayoritarios citral y acetato de geranilo.
- Identificar cambios morfológicos en larvas de 3er instar de *Ae. aegypti* de desarrollo tratadas con *C. flexuosus* y sus compuestos mayoritarios citral y acetato de geranilo.
- Identificar mediante análisis *in silico* la posible interacción de los compuestos mayoritarios citral y acetato de geranilo con algunas proteínas involucradas en la biosíntesis de la hormona juvenil y de la hormona de la muda.
- Determinar mediante la técnica de HPLC acoplada a espectrometría de masas los niveles de hormona juvenil y de la muda, en larvas de *Ae. aegypti* tratadas con el aceite esencial de *C. flexuosus* y sus compuestos mayoritarios citral y acetato de geranilo.

2 Fundamento teórico

2.1 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti es un pequeño insecto descrito por Linneo en 1762, pertenecientes a la clase Insecta, orden Díptera, familia Culicidae, subfamilia Culicinae, género *Aedes*, y subgénero *Stegomyia*. La especie tiene su origen en África, en la región etiópica donde se concentra la mayor cantidad de especies del subgénero. Es un artrópodo hematófago de color oscuro, que se caracteriza por tener en el mesonotum escamas plateadas, y un diseño parecido a una lira, además de antenas filiformes y abdomen con franjas claras y franja basal pálida. (Torres & Solano, 2014).

2.1.1 Ciclo de vida. El *Ae. Aegypti* es un insecto con metamorfosis completa u holometábolo. Su ciclo de vida se desarrolla en primera instancia en el agua, con 4 estadios larvales, las cuales únicamente difieren en tamaño; luego pasa a pupa y finalmente pasa a adulto (Solomon *et al.*, 1996). Después de aproximadamente 24 horas de la emergencia del adulto, la hembra se aparea y busca alimentarse de sangre, la cual es necesaria para la maduración de los huevos. La hembra selecciona un lugar adecuado para realizar la ovoposición, de preferencia un contenedor con agua limpia. Bajo condiciones óptimas de alimentación y temperatura, el ciclo completo de huevo a adulto se desarrolla en aproximadamente 10 a 15 días (Figura 1) (Salvatella, 1996; Torres & Solano, 2014).

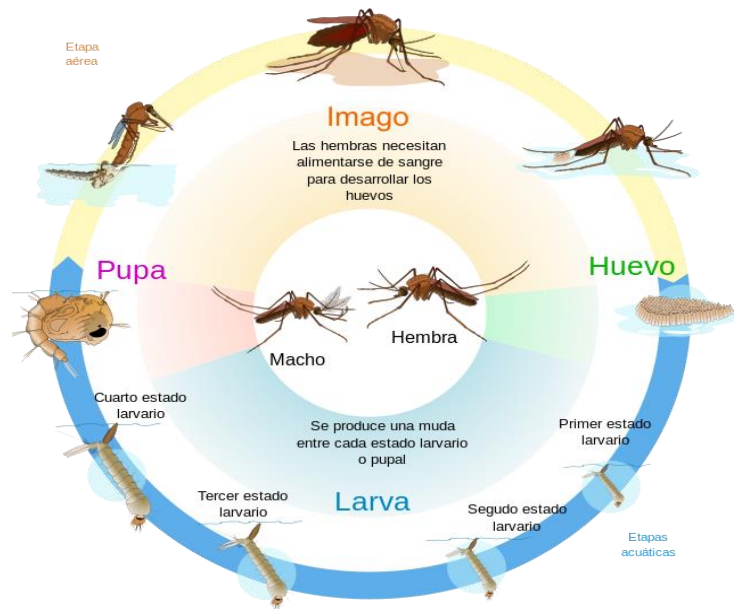


Figura 1. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. (<http://www.investigacionyciencia.es/blogs/Medicina-y-biología/43/posts/el-virus-zika-y-los-mosquitos>)

2.2 Regulación hormonal del ciclo de vida

En los insectos el ciclo de vida está regulado por un sistema hormonal complejo en el que intervienen principalmente la ecdisona u hormona de la muda (HM) y la hormona juvenil (HJ). Las concentraciones relativas de estas hormonas determinan el paso de los estadios del insecto en todas sus fases hasta el estado adulto (Viñuela *et al.*, 1991).

Como insectos holometábolos, los mosquitos atraviesan una metamorfosis completa antes de llegar a su estado adulto. A medida que las larvas pasan por los cuatro instar, el exoesqueleto se convierte en un inconveniente para crecer, el cual se soluciona mediante el proceso de ecdisis o de muda (Belles 2013; Harburger, 2011). Este proceso se inicia cuando el insecto alcanza cierta talla crítica, aunque puede influir el ensanchamiento del abdomen, la temperatura, la humedad, la

disponibilidad de oxígeno o la ingesta de determinados compuestos. En cualquiera de estos casos la hormona protoracicotrópica (PTTH) se libera y actúa sobre las glándulas protorácicas estimulando la producción de ecdisona (Figura 2), que es un compuesto precursor de la hormona de la muda (20-hidroxiecdisona). Los niveles de producción de la hormona de la muda aumentan rápidamente, alcanzan valores máximos y después decrecen, manteniéndose bajos hasta el próximo ciclo de muda. El ciclo termina con la ecdisis donde actúa la hormona de la eclosión (EH), y la última etapa es la esclerotización (endurecimiento de la nueva cutícula) que de igual manera es regulada por otra hormona llamada bursicón. (Belles 2013).

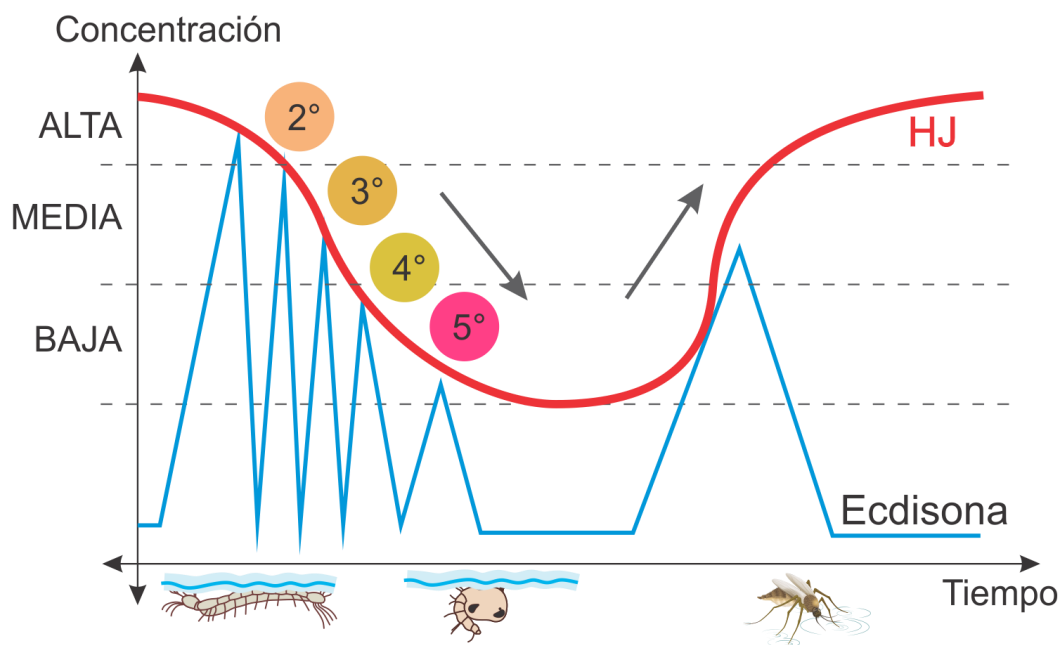


Figura 2. Variación en las concentraciones hormonales en ecdisona y HJ. (Dow AgroScience, n.d.)

La ecdisona y la hormona juvenil que están vinculadas directamente a la metamorfosis del mosquito se describen a continuación:

2.2.1 Ecdisona. La ecdisona (Figura 3) es considerada como una pro-hormona, ya que por medio de la enzima 20-hidroximonoxygenasa es convertida a su forma más activa, la 20- hidroxiecdisona (Figura 4), la cual se encuentra presente en muchos tejidos de los insectos (túbulos de Malpighi, intestino, cuerpos grasos, etc.) (Harburger, 2011; Liu *et al.*, 2013; Neubueser *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2016).

La 20-hidroxiecdisona (20E), que es la hormona de la muda activa, es secretada por la glándula protorácica como una hormona ecdisteroide polihidroxilada, que se derivan de la modificación enzimática de colesterol por enzimas p450. Debido a que la ecdisona no puede ser almacenada en las glándulas protorácicas y no posee un mecanismo de degradación, a medida que es producida es liberada a la hemolinfa, y su síntesis depende de la presencia de la hormona protoracicotrópica PTTH (Miyashita *et al.*, 2011; Simpson & Marcellini, 2006).

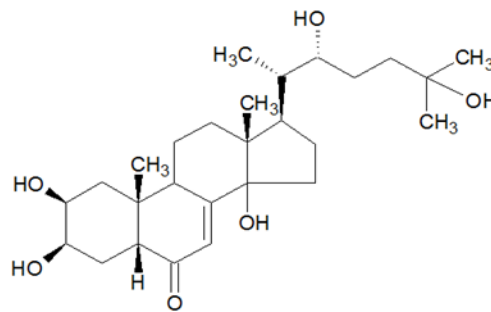


Figura 3. Fórmula estructural de la Hormona de la muda (ecdisona). (Klowden, 2007)

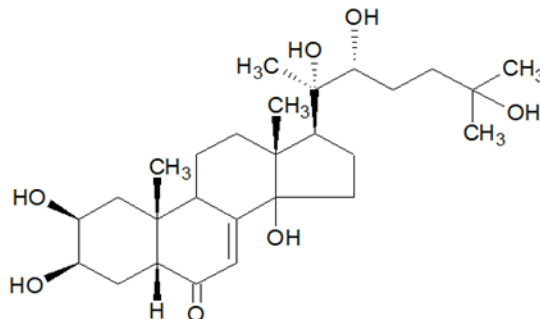


Figura 4. Fórmula estructural de la 20-hidroxiecdisona. (Klowden, 2007)

La 20E tiene un efecto anabólico para mejorar la síntesis de proteínas mediante el montaje de aminoácidos, además de controlar el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Liu *et al.*, 2017). La vía metabólica de la ecdisona se da a partir de la síntesis del colesterol, los insectos no pueden sintetizarlo, entonces el colesterol contenido en los alimentos se convierte en ecdisona por una serie de enzimas particulares (Figura 5), después la ecdisona es liberada a la hemolinfa y en los tejidos periféricos convertida a su forma activa (Gilbert *et al.*, 2005; Miyakawa *et al.*, 2017; Saito *et al.*, 2016).

La vía de señalización de la 20- hidroxiecdisona comienza cuando se une a su receptor nuclear denominado receptor de la ecdisona (ECR) y forma una molécula activa al unirse al Ultraespiraculo (USP) para formar un complejo heterodimerico. Este complejo heterodimerico se une al elemento de respuesta hormonal del gen y activa diferentes factores de inducción de la transcripción. Este complejo inicia una cascada de transcripción de los genes de respuesta primaria 20E, da una respuesta de los genes (BR-C y E93) (Liu *et al.*, 2017; Miyakawa *et al.*, 2017).

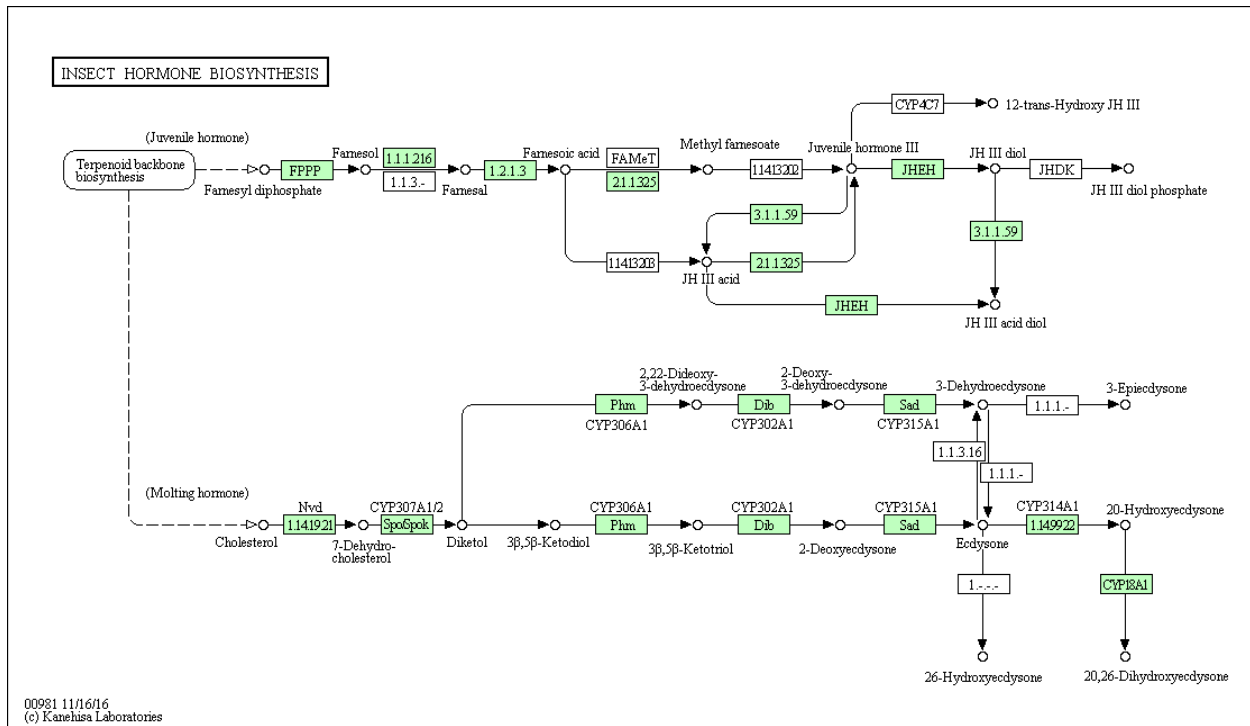


Figura 5. Biosíntesis de la hormona Juvenil y de la hormona de la muda.
<https://www.kegg.jp/pathway/aag00981>

2.2.2 Hormona Juvenil. El descubrimiento de la hormona juvenil (HJ) se debe a los experimentos de Vincent Wigglesworth en la década de 1930. Varias HJ han sido identificadas y caracterizadas en los insectos, siendo la JH III la más extendida (Figura 6). Las hormonas juveniles (HJs) son derivados de ácidos grasos (intermedio en la síntesis del colesterol) y sesquiterpenoides lipofílicos sintetizados en los cuerpos alados (corpora *allata*) (CA), las cuales son pequeñas glándulas esféricas situadas detrás del cerebro (Belles 2013). Una característica estructural común para todas las HJs es la presencia de un grupo epóxido cerca de un extremo y un éster metílico en el otro (Figura 6) (Ramirez *et al.*, 2016). Estas hormonas desempeñan procesos de desarrollo de insectos y la reproducción, incluyendo la inhibición de la metamorfosis, estimulación del vuelo, la regulación de la diapausa, el estrés, la resistencia, y el envejecimiento (Areiza *et al.*, 2015 ; Ichikawa *et al.*, 2007 ; Riddiford, 2012; Rivera-Perez *et al.*, 2014 ; Zhou *et al.*, 2011).

La síntesis de la hormona juvenil está vinculada al balance entre la alatotropina y la alatostatina, ambos neuromoduladores producidos por las células neurosecretoras en el protocerebro (De Loof *et al.*, 2015; S. Liu *et al.*, 2008). Los insectos controlan los niveles de hormona juvenil por dos vías de degradación: una consiste en la hidrólisis del éster metílico por una esterasa resultando la conversión del éster metílico en un ácido carboxílico y la otra implica la hidrólisis del grupo epóxido por una hidrolasa microsomal epóxido que resulta en un diol (Kamita *et al.*, 2003).

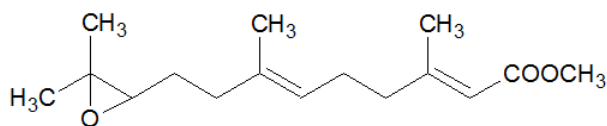


Figura 6. Fórmula estructural de la Hormona juvenil (JH III). (Klowden, 2007)

La vía metabólica que conduce a la formación de la hormona juvenil coincide con las primeras etapas de la biosíntesis del colesterol. El proceso se inicia a partir del acetil coenzima A y se lleva a cabo mediante la condensación de unidades de isopreno a través de intermediarios de mevalonato y farnesol, seguido de una oxidación del farnesol a ácido farnesioico, luego se da un proceso de esterificación con formación de metilfarnesoato y por último la sustitución del doble enlace con la función epoxi (Figura 5) (Bellés, 2005; Miyakawa *et al.*, 2017; Qu *et al.*, 2018). La vía de señalización de la hormona Juvenil III inicia cuando atraviesa la membrana celular, y se une a sus receptores. La Hormona juvenil induce la fosforilación de Hsp 90 vía PLC-PKC (Fosfolipasa - Proteína quinasa C), e ingresa al núcleo, uniéndose a su receptor que es una proteína denominada Methoprene tolerant (Met1) que junto a otras proteínas como bHLH/PAS son necesarias para la respuesta de la hormona juvenil (Qu *et al.*, 2018). El complejo hormona-receptor se une a porciones específicas de factores de transcripción, para iniciar el proceso de transcripción de genes específicos (Br y kr-h1), la respuesta de estos genes están involucrados en la síntesis de nuevas proteínas y actúan en el proceso de maduración y producción de huevos en el mosquito (Liu *et al.*, 2017; Miyakawa *et al.*, 2017).

2.3 Mecanismos de resistencia de *Aedes aegypti* a insecticidas

Uno de los obstáculos más serios en los programas de control de vectores es el desarrollo de resistencia a los insecticidas usados (Ramar *et al.*, 2013; Villareal, 2012). La resistencia es un proceso dinámico que puede aumentar o disminuir dependiendo de la presión que los insecticidas ejercen sobre los vectores y se da como resultado de cambios genéticos que alteran la fisiología, morfología o el comportamiento en las especies. Estos cambios se presentan en los sitios

específicos de acción, ocasionando que una determinada población sea capaz de sobrevivir a la aplicación de dosis altas de insecticidas, que generalmente causarían la muerte de la mayor parte de los individuos expuestos (Fonseca *et al.*, 2005; Gonzales, 2013).

Los mecanismos de resistencia se dividen en cuatro categorías: penetración reducida, comportamiento, metabolismo elevado e insensibilidad del sitio blanco. En la primera categoría existe una disminución en las tasas de penetración de los insecticidas, es decir en los insectos resistentes se presenta una menor penetración del tóxico; en la segunda categoría hay cambios de comportamiento en el insecto con el propósito de evitar el contacto con el insecticida; en la tercera categoría existe un aumento en la tasa de detoxificación a los insecticidas a productos no tóxicos, y por último, la insensibilidad al sitio blanco sucede cuando el insecticida no logra unirse a su sitio de acción (Fonseca *et al.*, 2005).

En 1946 se reportó el primer caso de resistencia en insectos en moscas domesticas (*Drosophila melanogaster*) frente a Dicloro difenil tricloroetano (DDT). Desde entonces, aproximadamente el 40% de los 506 artrópodos de importancia médica presentan algún grado de resistencia a insecticidas (Fonseca *et al.*, 2005). De estas especies, alrededor del 50% son especies de mosquitos vectores de malaria, dengue, fiebre amarilla y filariasis (De la Cruz-Gallardo *et al.*, 2014;Gonzales, 2013).

En Colombia, desde hace más de dos décadas se ha empleado la estrategia combinada de los insecticidas organofosforados malatión y temefos para el control de la especie *Ae. aegypti*, en estado adulto, y en estado larval, así como otras alternativas como miméticos de la hormona juvenil

e inhibidores de la biosíntesis de quitina en etapas tempranas del desarrollo del mosquito (Tabla 1) (MPS, 2010).

Tabla 1. *Alternativas de control de Ae. aegypti en estados inmaduros recomendados por la OMS. (Villarreal, 2012)*

Grupo principal y grupo de acción primario	Subgrupo químico ó materia activa	Ingrediente activo
Grupo 1: Inhibidores de la acetilcolinesterasa	Subgrupo 1B. Organofosforados	Temefós
Grupo 7. Miméticos de hormonas juvenoides	Subgrupo 7A. Análogos de hormonas juvenoides	Metopreno Hidropreno
	Subgrupo 7C. Piriproxifen	Piriproxifen
Grupo 15. Inhibidores de la biosíntesis de quitina	Tipo 0. Benzoil úreas	Diflubenzurón Triflumurón Novalurón

Sin embargo, con el paso de los años se ha evidenciado el desarrollo de poblaciones resistentes reportándose niveles de resistencia en sitios blanco como acetilcolinesterasa (organofosforados y carbamatos), a nivel de los canales de sodio dependientes de voltaje (piretroides) y los que interfieren sobre el flujo de cationes en el sistema nervioso (organoclorados) (Bisset *et al.*, 2014; De la Cruz-Gallardo *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2005; Gonzales, 2013).

Teniendo en cuenta esta problemática, se han desarrollado técnicas alternas que buscan retardar la generación de poblaciones resistentes mediante el uso de sustancias que retardan el desarrollo normal del mosquito. Este es el caso de los aceites esenciales, los cuales actúan como sinergistas de diferentes sustancias sintéticas (Fonseca *et al.*, 2005; Villarreal, 2012).

2.3.1 Reguladores de crecimiento en insectos (RCI). Los RCI, son un grupo de compuestos químicos sintéticos específicos contra estados inmaduros de insectos. Existen dos grandes grupos de reguladores de crecimiento: los miméticos de hormonas juveniles y los inhibidores de la biosíntesis de la quitina (Viñuela *et al.*, 1991). Los miméticos de hormonas juveniles son compuestos que tienen estructura parecida a la hormona juvenil y los inhibidores de la síntesis de quitina, actúan específicamente sobre la cutícula de los insectos, específicamente sobre las células epidérmicas que producen quitina y ejercen un efecto en el metabolismo de la hormona de la muda (Hoffmann & Lorenz, 1998). El principal modo de acción de los RCI es por ingestión en holometábolos (Lepidoptera, Coleóptera y Díptera) aunque también exhiben un pequeño efecto por contacto en algunas especies hemimetabolos (Viñuela *et al.*, 1991). Algunas de las principales ventajas del uso de RCI es un espectro de acción más estrecho y la ausencia o baja toxicidad para la mayoría de organismos, pues no afectan a insectos benéficos ni a mamíferos (Villarreal, 2012).

Se ha comprobado la efectividad de los RCI en estados juveniles en *Ae. aegypti* debido a su fácil manejo como larvicida alterno (Villareal, 2012). Un ejemplo de RCI es el diflubenzuron (Figura 7), un análogo de la Ecdisona, que actúa selectivamente en la larva al bloquear los mecanismos de la ecdisis e interfiere en la síntesis de quitina (Viñuela *et al.*, 1991). Las larvas al ser tratadas con el diflubenzuron, pierden la capacidad de mudar y son incapaces de escapar de las exuvias, llegando a morir debido a un daño en la cuticula recién producida, e incluso al poco tiempo después de mudar (Mulder *et al.*, 1973).

Como consecuencia de su modo de acción, los inhibidores de síntesis de quitina (clasificados como benzoil úreas) no son de acción rápida, por lo tanto, para evaluar su residualidad, se requiere más tiempo de observación que con los insecticidas clásicos. En comparación con la hormona juvenil o de análogos de imitación hormonal, las benzoil úreas pueden afectar todos los estadios larvales, aunque en general la eficacia disminuye con el tiempo de desarrollo del insecto (Villarreal, 2012).

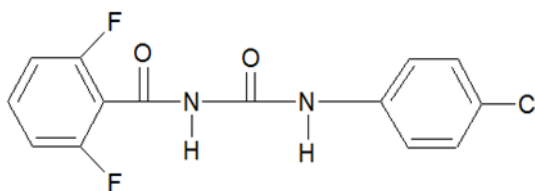


Figura 7. Fórmula estructural del Diflubenzuron. (Klowden, 2007)

Otro RCI de gran importancia es el metopreno ($C_{19}H_{34}O_3$) (Figura 8) un insecticida homólogo de la hormona juvenil, (Ritchie *et al.*, 1997) que actúa sobre la muda, permitiendo que la larva aumente de tamaño, pero evitando su paso a pupa (Sawby *et al.*, 1992). Además de alterar la fisiología reproductiva normal, actuando como un método de control de la natalidad (Berti-moser *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2007).

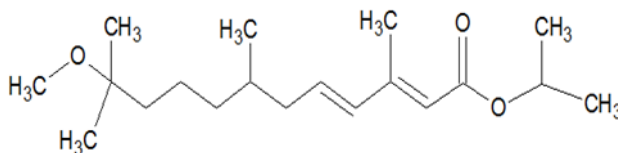


Figura 8. Fórmula estructural Metopreno. (Klowden, 2007)

2.4 Cuantificación de la hormona juvenil (HJ) y hormona de la muda (HM).

Existe una variedad de métodos para la determinación de la HJ y de la HM. La cuantificación de la HJ (en cuerpos alados), y de la HM (en glándula protorácica) o directamente en la hemolinfa permite conocer el estado de la muda del insecto (Blais *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011). Sin embargo, dada la naturaleza lipófila de estas hormonas, junto con su baja concentración en los tejidos y la susceptibilidad a la degradación, dificultan su cuantificación efectiva (Zhou *et al.*, 2011). Los métodos de separación y cuantificación actualmente aplicados para el análisis de estas hormonas son la cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas (LC-MS), espectrometría de masas en trampa de iones operado en modo de ionización química, resonancia magnética nuclear, espectroscopia infrarroja o análisis directo rápido en espectrometría de masas en tiempo real (DART-MS) (Blais *et al.*, 2010; Destrez *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011). Los métodos analíticos como la cromatografía líquida, acoplados a la espectrometría de masas muestran una identificación inequívoca y una cuantificación de los compuestos, por lo tanto, se consideran los más precisos para el análisis en insectos como *Ae. aegypti* (Zhao *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2011).

2.5 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son una mezcla de metabolitos, de naturaleza química compleja, productos del metabolismo secundario de las plantas (Stashenko 2009). La mayoría de los aceites esenciales contienen hidrocarburos terpénicos (monoterpenos y sesquiterpenos) y derivados oxigenados (Bakkali *et al.*, 2008). Los monoterpenos se forman a partir del acoplamiento de dos unidades de isopreno (compuestos que contienen 10 átomos de carbono a menudo dispuestos en un anillo o en

forma acíclica) y representan aproximadamente el 90% de los aceites esenciales, mientras que los sesquiterpenos se forman a partir del ensamblaje de tres unidades de isopreno (compuestos que contienen 15 átomos de carbono) los cuales son portadores del olor en las plantas aromáticas (Koul *et al.*, 2008).

En los últimos 10 años, se han investigado el uso de aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales contra alternativa al uso de insecticidas convencionales, reportándose entre 230 plantas con bioactividad contra ácaros, insectos de productos almacenados y de importancia médica (Amariles *et al.*, 2013; Zoubiri *et al.*, 2014). Gran parte de los compuestos reportados actúan con efecto insecticida y, repelente, llegando a afectar algunos parámetros biológicos tales como tasa de crecimiento, duración del ciclo de vida y reproducción (Bakkali *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2014).

En diversos aceites esenciales se ha evidenciado actividad pupicida en mosquitos como *Culex quinquefasciatus* (Ramar *et al.*, 2013; Soonwera *et al.*, 2017) y se ha demostrado la actividad insecticida en extractos metanólicos de *Gliricidia sepium*, *Sapindus saponaria* y *Annona muricata* sobre larvas de tercer estadio de *Ae. aegypti* (Amariles *et al.*, 2013). De igual manera se ha encontrado actividad insecticida en diferentes estadios en otros aceites esenciales tales como *Tagetes lucida*, *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Citrus sinensis*, *Swinglea glutinosa*, *Phoenix dactylifera*, *Lippia sidoides*, *Croton nepetaefolius*, *argyrophylloides*, *Croton*, *Croton sonderianus* y *Cananga odorata*, sobre el mismo vector (Castillo *et al.*, 2017; Pacelli *et al.*, 2013; Demirci *et al.*, 2013; Lucia *et al.*, 2013; Vera *et al.*, 2014).

2.5.1 El aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*. El género *Cymbopogon* comprende alrededor de 120 especies de plantas, las cuales se encuentran distribuidas en regiones tropicales y subtropicales. Aunque pocas poáceas (Familia Poaceae) presentan en sus hojas aceites esenciales, las más importantes pertenecen al género *Cymbopogon* (Khanuja *et al.*, 2005). El rendimiento del aceite esencial extraído del material vegetal varía entre 0.5-1.6% con una variada combinación de compuestos terpénicos en sus aceites esenciales (Khanuja *et al.*, 2005; Luthra *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2000), los cuales son usados en perfumería, cosméticos y preparaciones farmacéuticas.

Los principales componentes del aceite esencial de la mayoría de especies del género *Cymbopogon* son el citral (monoterpeno acíclico consistente en una mezcla de 2 isómeros geranial y neral) y acetato de geranilo (monoterpeno), reportados con actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antiparasitaria, de repelencia de mosquitos, de estimulación de la oviposición, e inhibición de eclosión de los huevos (Gonçalves *et al.*, 2012; Quintans-Júnior *et al.*, 2013; Serrano, 2015; Vera *et al.*, 2014). El metabolito citral es un importante material para la perfumería, confitería, licores, y se emplea como materia prima en la síntesis de las iononas, sustancias aromáticas con fuerte olor a violetas, así como en la síntesis de la vitamina A (Luthra *et al.*, 2007).

El monoterpeno acetato de geranilo, es un constituyente natural de más de 60 aceites esenciales, que además de sus propiedades antioxidantes, se utiliza como un componente de perfumes para cremas, jabones y como un ingrediente saborizante (James *et al.*, 1987).

El aceite esencial de la especie *Cymbopogon flexuosus* es de color amarillo, con intenso olor a limón, siendo su principal componente el citral (70 - 85%) (Quintanilla *et al.*, 2012), además de la presencia de intermedeol (Kumar *et al.*, 2008) y geraniol (Oussalah *et al.*, 2006 ;Nath *et al.*, 2002). Se ha reportado el potencial insecticida de este frente a una amplia gama de mosquitos, incluida la especie *Ae. Aegypti*, con bioactividad larvica, pupicida, adulticida (Castillo *et al.*, 2017; Manimaran *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2009; Tennyson *et al.*, 2013; Vera *et al.*, 2014), así como actividad reguladora del crecimiento del aceite esencial y de sus compuestos mayoritarios (citral y acetato de geraniol) (**Figura 9**) a dosis sub-letales (Serrano, 2015).

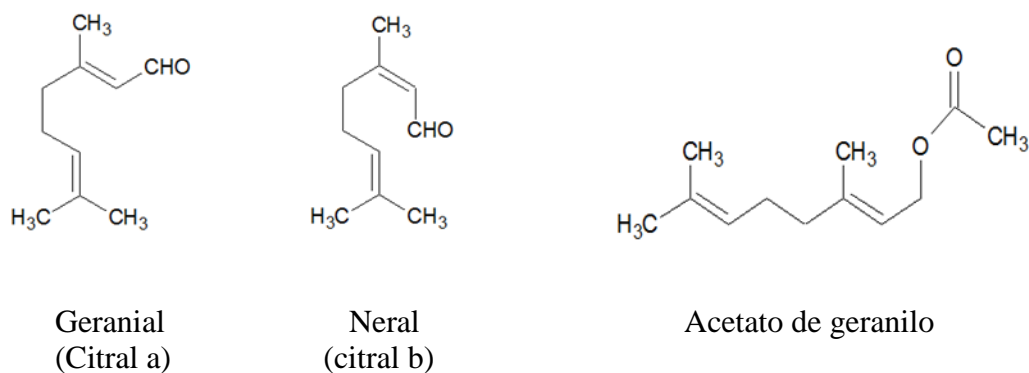


Figura 9. Estructura del citral (isómeros) y acetato de geraniol, componentes mayoritarios del AE de *Cymbopogon flexuosus*. (Martínez, 2001; Quintans-Júnior *et al.*, 2013).

2.6 Modelado molecular.

Es una técnica computacional que estudia la interacción entre un ligando y su receptor mediante el estudio de las energías de enlace (fuerzas de unión como los enlaces covalentes e interacciones no covalentes) entre ambas moléculas (Flores-Herrera *et al.*, 2008; Gago, 1994). Esta técnica es empleada para explorar interacciones y estructuras, constituyéndose en un método eficaz y de alta precisión para entender mecanismos de reacción de proteínas con sustratos (Flores-Herrera *et al.*,

2008). Busca encontrar la orientación predilecta de una o más moléculas en los sitios activos de las proteínas basándose en los datos de energía libre de Gibbs (ΔG) para determinar la afinidad proteína- ligando y definir la complementariedad entre los sitios de unión (Font Maté, 2017).

3 Metodología

3.1 Material biológico

El Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales-CINTROP cuenta con una colonia de *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller, mantenida en condiciones de laboratorio ($T = 25 \pm 5^\circ\text{C}$; humedad de $70 \pm 5\%$, fotoperiodo 12:12), libre de infección, de la cual se obtuvo el material biológico para realizar todos los experimentos.

La colonia se alimentó periódicamente con rata albina tipo Wistar suministrada por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, con el fin de obtener huevos y posteriormente la cantidad suficiente de larvas. Las larvas se mantuvieron en bandejas plásticas con agua libre de cloro y fueron alimentadas con alimento para peces TetraMin Tropical Flakes®.

3.2 Obtención del Aceite esencial y compuestos mayoritarios

El aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* fue suministrado por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales CENIVAM-UIS. La extracción del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus*, así como la composición química, se llevó a cabo basado en el protocolo reportado por Stashenko *et al* (2004). El aceite esencial fue obtenido por hidrodestilación simple (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD). Los componentes fueron identificados mediante la comparación de sus tiempos de retención relativa y espectrometría de masas con los de compuestos estándar.

La descripción de la caracterización química del aceite esencial se encuentra reportada por Vera *et al.*, 2014. Donde los compuestos mayoritarios son acetato de geranilo (10.0%), geraniol (9.0%), β -Bourboneno trans β -cariofileno (2.0%), citral (geranial (37.5%) y neral (28.2%)). Conociendo la caracterización química el aceite esencial, los componentes mayoritarios Citral y acetato de geranilo fueron obtenidos de manera comercial de la empresa Sigma Aldrich para su evaluación.

3.3 Determinación del efecto inhibitorio del *C. flexuosus* y sus compuestos mayoritarios

Con el fin de conocer el efecto inhibitorio del AE de *C. flexuosus* sobre el desarrollo larval en L3 y conocer los posibles cambios morfológicos, se establecieron dos concentraciones sub-letales de 3 mg. L⁻¹ y 6 mg. L⁻¹ partiendo de la concentración letal 50 (CL50) para actividad larvicida reportada por Vera *et al.* (2014): CL50=17,1 mg. L⁻¹. Para evaluar los componentes mayoritarios Acetato de geranilo y Citral, se establecieron tres concentraciones sub-letales (18 mg. L⁻¹, 30 mg. L⁻¹ y 42 mg. L⁻¹) con base en los valores reportados en literatura. Como control positivo se empleó

Metopreno a 3 mg. L⁻¹ y 6 mg. L⁻¹ y Diflubenzuron a 3 mg. L⁻¹ y 6mg. L⁻¹. Como control negativo se empleó Dimetilsulfóxido (DMSO). En todas las diluciones se utilizó como disolvente DMSO, manteniendo una concentración máxima de 0.5%.

Para establecer el efecto de los diferentes tratamientos sobre el desarrollo de las larvas, se modificó la metodología de Leyva *et al.*, (2013): se seleccionaron 10 larvas de tercer estadio y se transfirieron mediante pipetas pasteur a vasos plásticos de 200 mL a los cuales se les adicionó 99.5 mL de agua libre de cloro y 0.5 mL de cada tratamiento a evaluar (Control negativo, aceite esencial de *C. flexuosus*, componente Mayoritario Citral, componente Mayoritario acetato de geranilo, Control Positivo Metopreno, y Control Positivo Diflubenzuron). Todos los experimentos se realizaron por triplicado en diferentes días. Por experimento se utilizó un total de 120 larvas, para un total de 1560 larvas en todos los experimentos.

A todos los tratamientos se les suministró alimento para peces en dilución al 2% todos los días con el fin de garantizar la supervivencia de las mismas. A las 24 horas de tratamiento, se extrajeron las larvas muertas y las sobrevivientes se mantuvieron en el agua de exposición hasta la pupación. A las 48 horas se tomaron 5 larvas por cada tratamiento, las cuales fueron empleadas para la medición de diferentes parámetros morfológicos mediante un estereoscopio marca Advanced Optical tamaño de larva (largo en mm), diámetro cefálico (en mm) y largo de sifón (en mm).

3.4 Método de obtención de los niveles de hormona juvenil y hormona de la muda

Para poder conocer la posible afectación en los niveles de la hormona juvenil y de la hormona de la muda en las larvas, para cada tratamiento se seleccionaron 200 larvas recién emergidas en

estadio L3 y se trataron con el aceite esencial de *C. flexuosus* a las concentraciones de 3 mg. L⁻¹ y 6 mg. L⁻¹ y 200 larvas para ser tratadas con cada una de las concentraciones de Acetato de geranilo y citral a las concentraciones de 18 mg. L⁻¹, 30 mg. L⁻¹ y 42 mg. L⁻¹. Como patrón positivo se emplearon dos tratamientos, uno con metopreno y otro con diflubenzuron.

Después de 24 horas, a las larvas de cada tratamiento se les adiciono 2 ml de una solución de tampón fosfato a pH 7.4 y 50 Mm y fueron homogeneizadas utilizando un equipo homogeneizador (BeadBug™ Mini Homogeneizer marca Benchmark modelo D1030) hasta que se obtuviera una solución uniforme. El homogenato fue filtrado en lana de vidrio a presión en una jeringa de 5 mL para eliminar impurezas. El extracto obtenido fue entonces analizado por la técnica HPLC acoplado a un espectrómetro de masas.

Se realizó un total de 6 experimentos con su respectiva curva de calibración, empleando como patrón la Hormona de la muda y Hormona juvenil (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 mg. L⁻¹.

Para la cuantificación de la Hormona Juvenil (HJ) y la Hormona de la Muda (HM) por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (ESI – IT) se empleó una adaptación de la metodología Zhou *et al* (2011). Para el análisis se empleó un cromatógrafo líquido Elite LabChrom (Hitachi-VWR), de Rango de detección: 190 – 600 nm (UV), volumen de inyección: 0.1 – 90 µL, y rango de flujo: 0.001 – 10 mL/min acoplado a un espectrómetro de Masas (Ionización por electrospray – Analizador de trampa iónica (ESI – IT)) (figura 10). Con una columna de Octadecilsiloxano-ODS Zorbax XDB-C18 (4,6 mm x 10 mm, 2,0µm) y se utilizó primero como fase móvil Agua (0.1% Acido Formico) y Acetonitrilo (0.1% Acido Formico), y

luego Agua (0.1% Acido Formico) y Metanol (0.1% Acido Formico) aplicando un gradiente binario (Tabla 2) a un flujo de 0,30 mL/min con un volumen de inyección de 10 μ L. La detección por UV se llevó a cabo a una longitud de onda de 254 nm. El tiempo total de corrida del equipo fue de 15 minutos para poder observar en que tiempo de retención se obtenía la señal de cada una de las hormonas y poder determinar sus niveles de concentración en cada tratamiento.

Tabla 2. *Gradiente de Elusión (Zhou et al 2011)*

Tiempo (min)	%Agua (0.1% Acido Formico)	%Acetonitrilo (0.1% Acido Formico)
0.00	80.00	20.00
0.50	80.00	20.00
0.60	0.50	99.50
4.80	0.50	99.50
4.90	80.00	20.00
30.00	80.00	20.00

Para el análisis por Espectrometría de Masas se empleó un Espectrómetro de Masas Amazon X (Bruker Daltonics) con nebulización por Electrospray (ESI) y analizador de trampa iónica (IT), en las siguientes condiciones: Temperatura de 250°C y 5000 V en el capilar. Como gas nebulizador se empleó nitrógeno con flujo de 5 L/min y presión de 8 psi. Los análisis se llevaron a cabo empleando una fuente de polaridad positiva, operando en modo Full Scan en un rango de masas de 70 – 1500 m/z con Mass Target de 481,5 m/z y 267,2 m/z que corresponden a la masa molecular más un hidrogeno (M+H), de los iones esperados para HJ y HM, respectivamente.



Figura 10. Vista general de un equipo de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas. Fuente: Lab Espectrometría de Masas. UIS-Guatemala

3.5 Modelado molecular

Los softwares utilizados para el modelado molecular fueron: Swissdock y Chimera1.12. SwissDock es un servicio web para predecir las interacciones moleculares que pueden ocurrir entre una proteína diana y una molécula pequeña a partir de los valores de energía (ΔG). Chimera1.12 es un programa que permite visualizar diversas interacciones, a partir de los valores de energía ΔG mediante interacciones no covalentes como puentes de hidrogeno y así analizar las estructuras moleculares y datos relacionados.

El método que se siguió fue el siguiente:

1. Obtención de las proteínas de la base de datos Protein Data Bank. Se eligieron las enzimas cuya estructura se ha obtenido mediante cristalización de rayos-X o resonancia magnética nuclear y con secuencia de aminoácidos homologa a las enzimas involucradas en la

biosíntesis de las hormonas en *Ae. aegypti*. Para la biosíntesis de la Hormona juvenil III se escogieron 5 enzimas (Farnesol difosfato pirofosfatasa, farnesol oxidasa, farnesol deshidrogenasa, JH metil transferasa y JH epoxidasa) y para la hormona de la muda 6 enzimas (Oxidasa nvd, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 25-hidroxilasa, 22-hidroxilasa, 2-hidroxilasa y 20-hidroxilasa).

2. Se envió las estructuras correspondientes tanto de los ligandos como de los receptores para obtener los resultados requeridos del software Swissdock.
3. El programa calcula los sitios de interacción posibles, mostrando los valores de menor energía que corresponden a la mayor afinidad del sustrato al receptor.
4. Los datos fueron recopilados para poder analizar los resultados de energía de unión entre ligando y receptor suministrados por el software Swissdock.
5. Por último, se analizan los resultados con la ayuda del software Chimera 1.12 y así establecer la posible interacción entre el sustrato y la enzima.

Los datos obtenidos permitirán conocer los valores de afinidad entre los sitios de unión y los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. flexuosus*, y los patrones comerciales empleados como inhibidores de las hormas juvenil y de la muda.

4 Resultados

4.1 Actividad inhibitoria del crecimiento del aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* sobre *Aedes aegypti*

4.1.1 Efecto del *Cymbopogon flexuosus*. Después de la toma de datos diario para determinar si el AE presentaba efecto inhibitorio, los resultados se compararon con el tratamiento control, y se determinó el estadio en que se encontraban las larvas a lo largo de la duración del experimento (Figura 11). En la figura (parte a) se observa que las larvas se desarrollan de manera normal sin ninguna alteración de su ciclo de vida pasando por estadios restantes L4, pupa y adulto. A diferencia de las larvas tratadas con las dos concentraciones del AE (figura parte b) donde se determinó que las larvas permanecieron en el estadio en que se inició los experimentos L3, sin pasar a los otros estadios L4, pupa y adulto, evidenciándose que fue alterada el normal desarrollo de las larvas y en consecuencia la metamorfosis del mosquito.

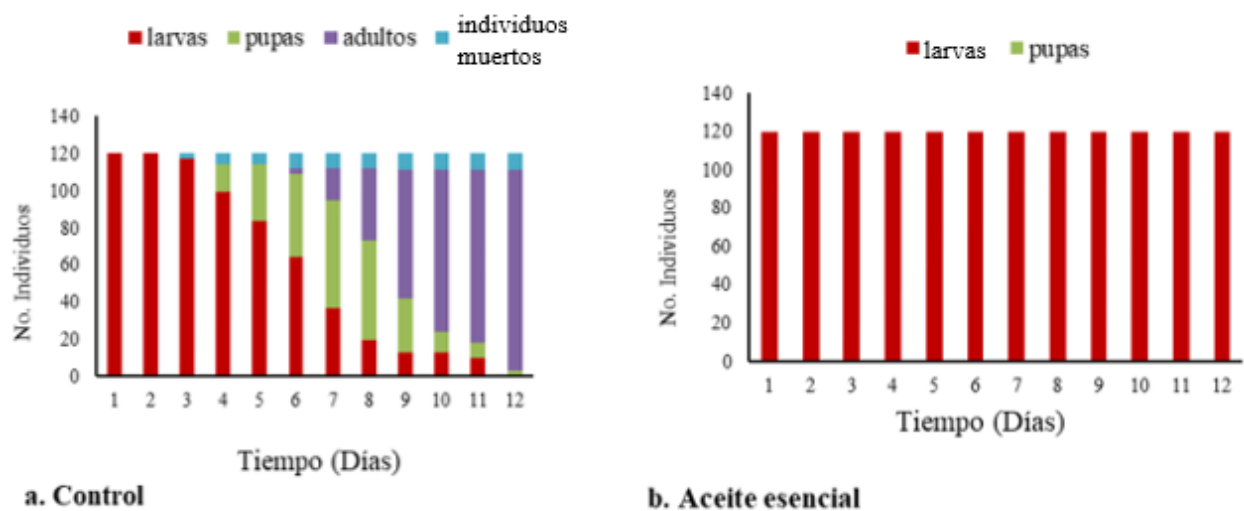


Figura 11. Duración en días de los estadios larvales 3 y 4(L3-4), pupa y adulto de *Aedes aegypti*, tratadas con el aceite *Cymbopogon flexuosus* a las concentraciones de 3 mg. L⁻¹ y 6mg.L⁻¹.

Para determinar el comportamiento del AE, se utilizó dos patrones positivos el metopreno y el Diflubenzuron con el propósito de comparar los resultados con cada uno de ellos. Se encontró que en las larvas tratadas con diflubenzuron el tamaño se vio afectado observándose una disminución en el tamaño de estas mismas, mientras que para las larvas tratadas con metopreno las larvas

aumentaron de tamaño, debido a esto se evidencio diferencias significativas con las larvas tratadas con el Diflubenzuron comparados con el tamaño de las larvas tratadas con el AE y no se encontró diferencias significativas respecto a las larvas tratadas con el metopreno.

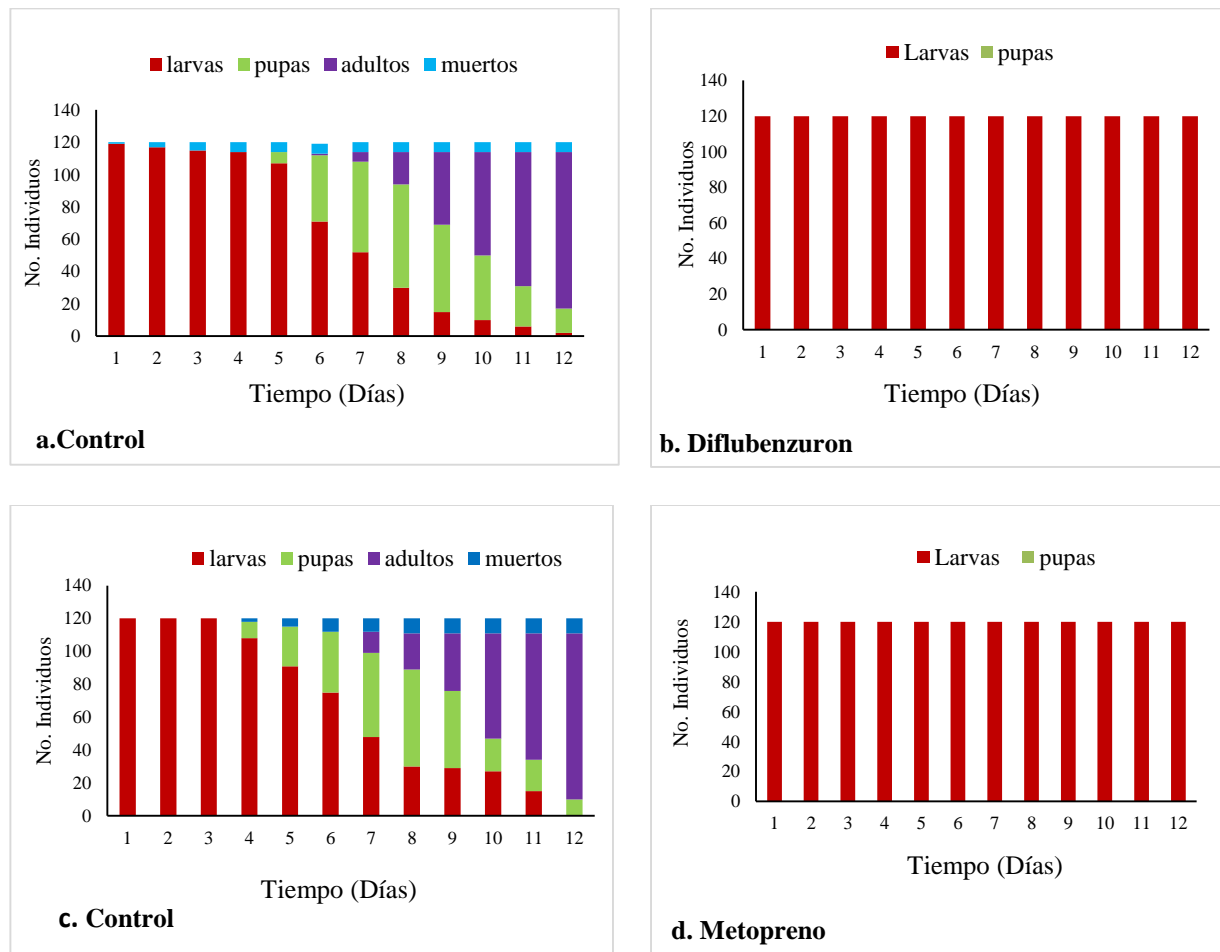


Figura 12. Duración en días de los estadios larvales 3 y 4(L3-4), pupa y adulto de *Aedes aegypti*, tratadas con el Diflubenzuron y metopreno a las concentraciones de 3 mg. L⁻¹ y 6mg. L⁻¹.

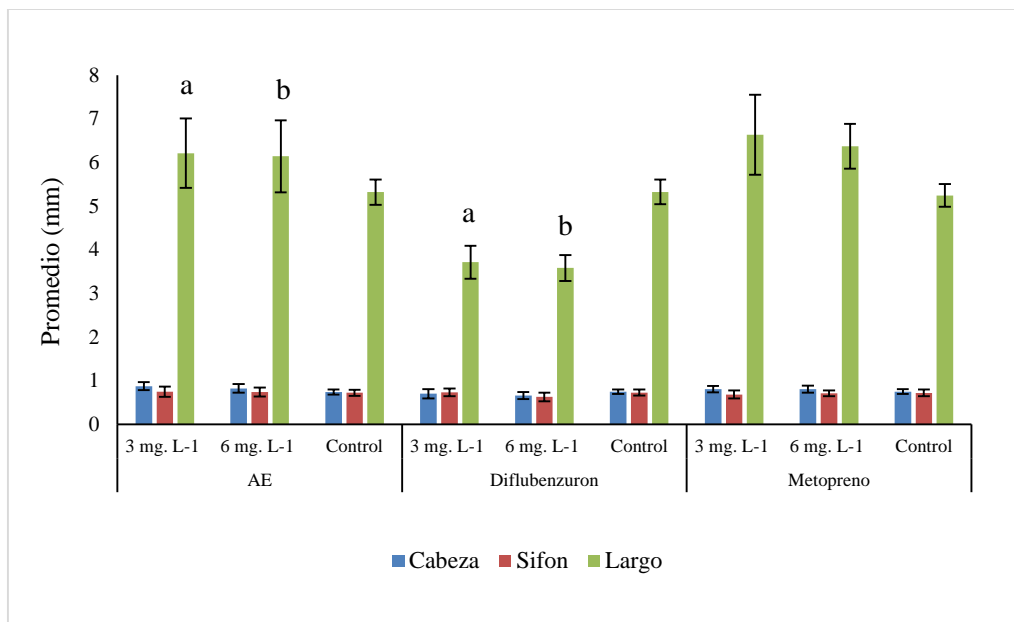


Figura 13. Promedio en mm de medición de cabeza, sifón y largo de la larva en *Aedes aegypti* tratamiento control. ^a diferencias estadísticas significativas entre AE 3 mg. L⁻¹ y diflubenzuron 3 mg. L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo (Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,56182, df = 15,000)); ^b diferencias estadísticas significativas entre AE 6 mg. L⁻¹ y diflubenzuron 6 mg. L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo 6 mg. L⁻¹ Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,53133, df = 15,000).

Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre el largo de las larvas tratadas con el Diflubenzuron a ambas concentraciones comparado con el largo de las larvas tratadas con el aceite esencial *C. flexuosus* a ambas concentraciones y no se encontró diferencias estadísticamente significativas con las larvas tratadas con el metopreno.

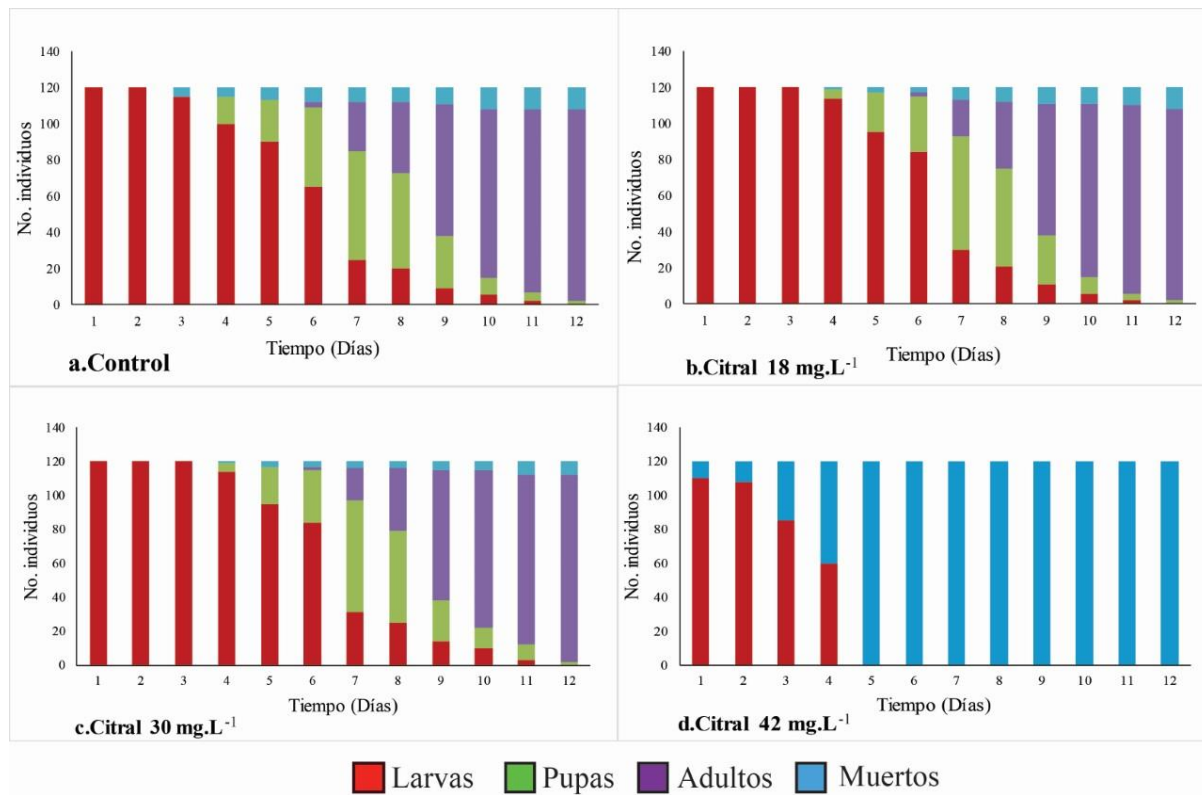


Figura 14. Duración en días de los estadios larvales 3 y 4(L3-4), pupa y adulto de *Aedes aegypti*, tratadas con citral a las concentraciones de 18 mg. L⁻¹, 30 mg. L⁻¹ y 42 mg. L⁻¹

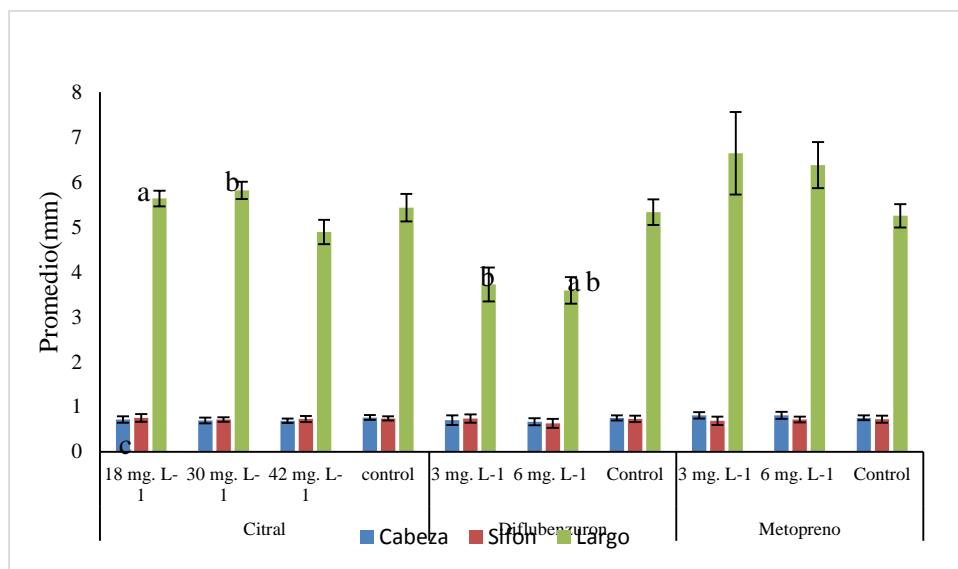


Figura 15. Promedio en mm de medición de cabeza, sifón y largo de la larva en *Aedes aegypti* tratamiento control. ^a diferencias estadísticas significativas entre citral 18 mg. L⁻¹ y diflubenzuron

3 mg. L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo citral 18 mg. L⁻¹ diflubenzuron 3 mg. L⁻¹ Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,45783, df = 15,000); ^b diferencias estadísticas significativas entre citral 30 mg.L⁻¹ y diflubenzuron 6 mg.L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo citral 30 y diflubenzuron 6 ppm Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,48252, df = 15,000).

Para las larvas tratadas con uno de los compuestos mayoritarios el citral, a las concentraciones de 18 mg. L⁻¹ y 30 mg. L⁻¹ se comportó de manera similar al control, pasando por los estadios correspondientes L4, pupa y adulto. Al comparar a la concentración de 42 mg. L⁻¹ se evidencia que a esta concentración las larvas mueren observándose un efecto de mortalidad a esta concentración.

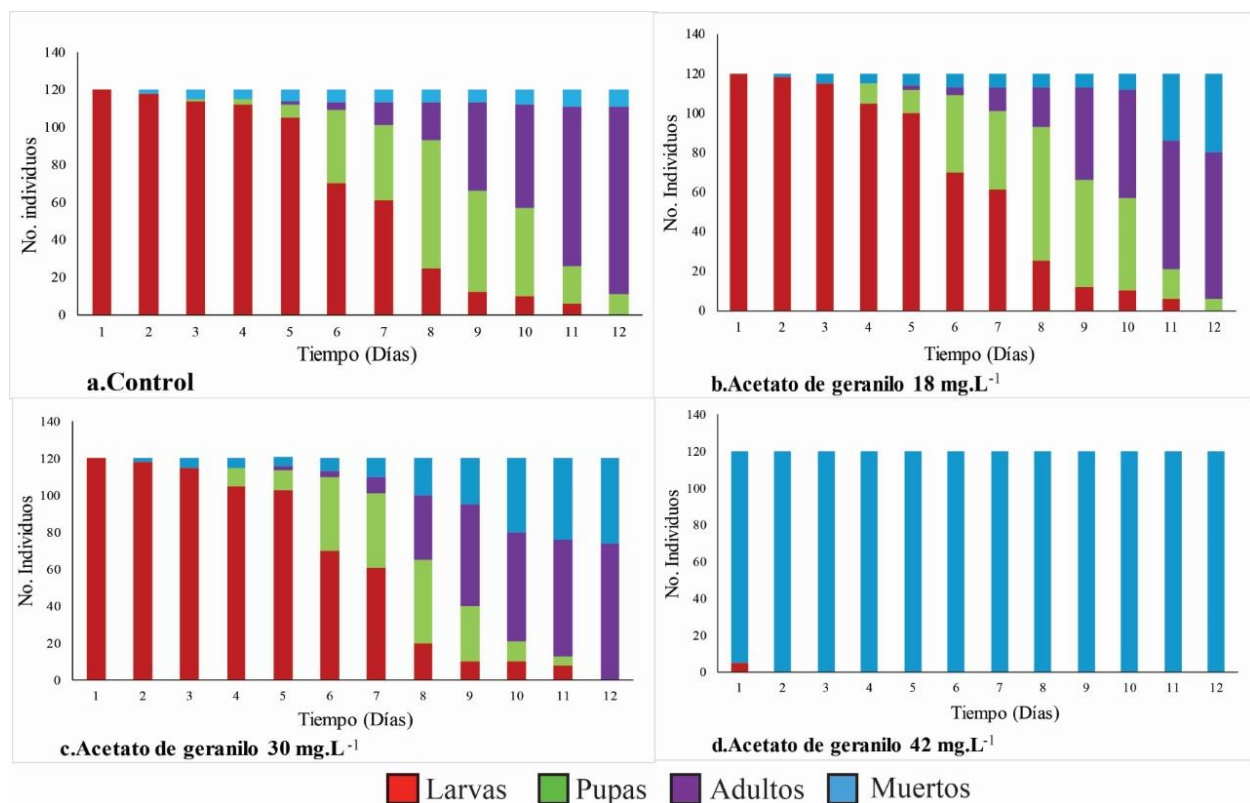


Figura 16. Duración en días de los estadios larvales 3 y 4(L3-4), pupa y adulto de *Aedes aegypti*, tratadas con acetato de geraniol a las concentraciones de 18 mg. L⁻¹, 30 mg. L⁻¹ y 42 mg. L⁻¹

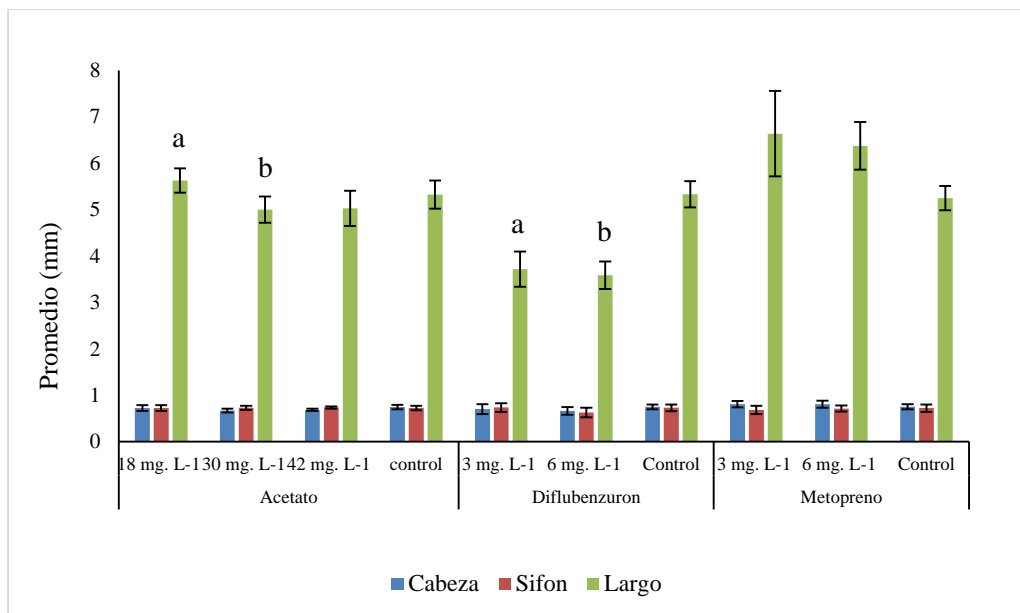


Figura 17. Promedio en mm de medición de cabeza, sifón y largo de la larva en *Aedes aegypti* tratamiento control. ^a diferencias estadísticas significativas entre acetato de geranilo 18 mg. L⁻¹ y diflubenzuron 3 mg. L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo acetato de geranilo 18 mg. L⁻¹ diflubenzuron 3 mg. L⁻¹ Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,45783, df = 15,000); ^b diferencias estadísticas significativas entre acetato de geranilo 30 mg.L⁻¹ y Diflubenzuron 6 mg.L⁻¹ (Tukey HSD test; variable largo acetato de geranilo 30 mg.L⁻¹ y Diflubenzuron 6 mg.L⁻¹ Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,48252, df = 15,000).

4.2 Modelado molecular

Mediante la técnica de modelado molecular se determinó el modo conformacional de interacción más probable para el complejo enzima-sustrato. Basándonos en los resultados de energía de enlace (kcal/mol) entre la enzima y su sustrato se toman los valores de mínima energía que sirve como guía para determinar la orientación preferida de la molécula y determinar principalmente las interacciones de puente de hidrogeno entre las enzimas y los sustratos.

4.2.1 Biosíntesis de la Hormona de la Muda. A continuación, se muestra los resultados de Energía de enlace (kcal/mol) entre los diferentes sustratos y enzimas utilizados en el modelado molecular involucradas en la biosíntesis de la Hormona de la muda.

Después de realizar el modelado molecular, se observa los valores que corresponden a las conformaciones más estable (valor de menor energía de enlace) de cada uno de los compuestos mayoritarios del AE de *C. flexuosus* respecto a las enzimas involucradas en la biosíntesis de la Hormona de la muda (Tabla 3), al comparar los datos obtenidos respecto a cada una de las enzimas respecto a su sustrato correspondiente se determina que el acetato de geranilo presenta mayor afinidad que los isómeros del citral por cada una de las enzimas respecto a los sustratos control y a los patrones positivos.

Tabla 3. Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre los diferentes compuestos Acetato de geranilo, citral(isómeros), diflubenzuron, metopreno y las enzimas involucradas en la biosíntesis de la Hormona de la Muda.

COMPUESTO	PROTEINA	ΔG (Kcal/mol)	AMINOACIDOS	DISTANCIA (Å)
Acetato de Geranilo	Oxidasa nvd (7,8-deshidrogenasa)	-7.0122976	TRY 338	2.073
	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	-7.3674593	-----	-----
	25-hidroxilasa	-7.07757356	ALA 74	2.223
	22-hidroxilasa	-7.0490355	SER 72	2.285
	2-hidroxilasa	-7.146089	SER 72	2.182
	20-hidroxilasa	-7.5947905	TYR 51	2.261

Citral(geranial)	Oxidasa nvd (7,8-deshidrogenasa)	-6.7783656	-----	-----
	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	-6.7601056	THR 24	2.641
	25-hidroxilasa	-6.7408338	SER 72	2.340
	22-hidroxilasa	-6.9128704	SER 72	2.306
	2-hidroxilasa	-6.6786156	SER 72	2.090
	20-hidroxilasa	-6.9726343	SER 72	1.823
	Citral2(neral)	Oxidasa nvd (7,8-deshidrogenasa)	-6.9158087	GLN 9
3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa		-6.713916	LEU 219	2.040
25-hidroxilasa		-6.6814876	HSD 408	2.053
22-hidroxilasa		-6.95453	SER 72	2.167
2-hidroxilasa		-6.733802	HSD 408 GLN 109	2.009 2.665
20-hidroxilasa		-7.0280695	TYR 51	2.189
Metopreno		Oxidasa nvd (7,8-deshidrogenasa)	-8.052025	-----
	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	-8.824071	THR 218	2.564
	25-hidroxilasa	-8.590129	-----	-----
	22-hidroxilasa	-8.590129	-----	-----
	2-hidroxilasa	-8.506646	GLN 189	2.161
	20-hidroxilasa	-8.963627	-----	-----
	Diflubenzuron	Oxidasa nvd (7,8-deshidrogenasa)	-7.4366436	GLY 135
3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa		-8.170486	ASN 167	2.335
25-hidroxilasa		-7.8663473	THR 436	2.468
22-hidroxilasa		- 7.8663473	THR 436	2.468
2-hidroxilasa		-8.235347	THR 436	2.012

20-hidroxilasa	-7.986736	ASP 231	2.024
		ASP 231	2.441

Tabla 4. Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre las enzimas involucradas en la biosíntesis de la Hormona de la muda y sus correspondientes sustratos asociados a la ruta metabólica

COMPUESTO	PROTEINA	ΔG (Kcal/mol)	AMINOACIDOS	DISTANCIA (Å)
Colesterol	Oxidasa nvd (7,8- deshidrogenasa)	-8.667408	GLU 247	1.836
7-dehidrocolesterol	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	-9.061984	-----	-----
Ketodiol	25-hidroxilasa	-8.869229	GLN 109	2.501
			GLN 109	2.115
			HSD 408	2.113
Ketotriol	22-hidroxilasa	-8.38909	THR 411	2.150
			ILE 385	2.639
			GLN 403	2.522
2-deoxiecdisona	2-hidroxilasa	-9.622677	GLN 109	2.124
			HSD 408	1.881
			PHE 379	2.047
			ASN 319	1.883
Ecdisona	20-hidroxilasa	-7.740378	THR 411	1.870

4.2.2 Biosíntesis de la Hormona Juvenil. A continuación, se muestra los resultados de Energía de enlace (kJ/mol) entre los diferentes sustratos y enzimas utilizados en el modelado molecular involucradas en la biosíntesis de la Hormona Juvenil III.

Se realiza una comparación de los diferentes compuestos en la biosíntesis de la hormona con cada una de las enzimas involucradas para determinar cuál de los dos compuestos del AE presenta mayor afinidad respecto a estas mismas (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre los diferentes compuestos Acetato de geranilo, citral(isómeros), diflubenzuron, metopreno y las enzimas involucradas en la biosíntesis de la Hormona Juvenil III.

COMPUESTO	PROTEINA	ΔG (Kcal/mol)	AMINOACIDOS	DISTANCIA (Å)
Acetato de Geranilo	Farnesil difosfato pirofosfatasa	-6.8211236	THR 54	2.420
	Farnesol oxidasa	-7.1657896	LYS 155	2.157
	Farnesol deshidrogenasa	-7.2210193	-----	-----
	JH metil transferasa	-6.733903	-----	-----
	JH epoxidasa	-7.0832133	TYR 298	2.096
Citral(geranial)	Farnesil difosfato pirofosfatasa	-6.752769	ARG 63	1.980
	Farnesol oxidasa	-6.650195	LYS 155	2.464
	Farnesol deshidrogenasa	-6.732428	GLN 326 GLN 329	2.576 2.103
	JH metil transferasa	-6.4090962	-----	-----
	JH epoxidasa	-6.4802084	-----	-----
Citral2(neral)	Farnesil difosfato pirofosfatasa	-6.6549325	GLU 34	1.528
	Farnesol oxidasa	-6.497602	-----	-----
	Farnesol deshidrogenasa	-6.8647046	GLN 326 GLN 329	2.468 2.359
	JH metil transferasa	-6.5342894	ILE 46 ALA 48	2.412 2.195
	JH epoxidasa	-6.5333257	-----	-----
Metopreno	Farnesil difosfato pirofosfatasa	-7.949654	-----	-----
	Farnesol oxidasa	-8.194795	LYS 155	2.601
	Farnesol deshidrogenasa	-7.9845233	TRP 146	2.297
	JH metil transferasa	-7.7736626	-----	-----
	JH epoxidasa	-8.194795	-----	-----
Diflubenzuron	Farnesil difosfato pirofosfatasa	-7.690054	-----	-----

Farnesol oxidasa	-7.4171576	PRO 181	2.034
Farnesol deshidrogenasa	-8.387681	GLN 326	2.427
		GLN 329	2.330
		GLN 329	2.312
		GLU 379	1.840
		GLU 379	2.125
JH metil transferasa	-7.675647	GLU 114	1.821
		GLU 114	2.515
		GLU 114	2.189
		GLU 114	2.563
JH epoxidasa	-7.760918	LYS 455	2.151
		GLU 144	1.848
		GLU 144	2.265

Para los resultados del análisis de modelado molecular de la biosíntesis de la Hormona Juvenil en la **Tabla 6**

Tabla 6. Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre las enzimas involucradas en la biosíntesis de la Hormona Juvenil III y sus correspondientes sustratos asociados a la ruta metabólica

COMPUESTO	PROTEINA	ΔG (Kcal/mol)	AMINOACIDOS	DISTANCIA (Å)
Farnesil pirofosfato	Farnesil difosfato pirofosfatasa	-13.956203	ARG 74	2.089
			ARG 74	2.433
			ARG 74	2.098
			ARG 71	1.762
			ARG 63	2.117
			ARG 63	2.373
			ARG 63	2.364
			ARG 63	2.329
Farnesol	Farnesol oxidasa	-7.4563985	TYR 151	2.099
Farnesal	Farnesol deshidrogenasa	-7.6096516	LYS 170	2.653
Ácido farnesoico	JH metil transferasa	-7.825651	LYS 25	1.912

Metil farnesoato	JH epoxidasa	-7.504202	-----	-----
---------------------	--------------	-----------	-------	-------

4.2.3 Hormona Juvenil III con su receptor. Se determinaron las posibles interacciones de los diferentes sustratos con el receptor de la Hormona Juvenil III (Met1), donde se muestra los valores que corresponden a la conformación más estable (valor de menor energía de enlace) Tabla 7 y se determina que para el receptor Met1 la energía de enlace al unirse a la Hormona juvenil III es de aproximadamente -9.09 kcal/mol y al compararse con los demás sustratos en orden ascendente de menor energía de enlace va seguido la hormona de la muda, el metopreno y luego el Diflubenzuron que corresponden a los patrones positivos, en ese orden el acetato de geranilo es quien posee mejor afinidad respecto a los isómeros del citral. Esto significa que estos sustratos poseen una probable interacción para unirse al centro activo de la enzima.

Tabla 7. Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre el receptor Met1 y los sustratos Acetato de geranilo, citral(isómeros), diflubenzuron, metopreno, Hormona de la muda y Hormona juvenil III.

PROTEINA	COMPUESTO	ΔG (Kcal/mol)	AMINOACIDOS	DISTANCIA (Å)
Met1	Acetato de Geranilo	-7.9035025	-----	-----
Met1	Citral(geranial)	-7.2739606	-----	-----
Met1	Citral2(neral)	-7.2739844	-----	-----
Met1	Diflubenzuron	-8.045123	-----	-----
Met1	Metopreno	-9.064671	-----	-----

Met1	Hormona juvenil III	-8.897782	TYR 129	1.956
Met1	Hormona de la muda	-9.096451	GLN 22 ARG 198 GLU 27	2.333 2.097 1.834

4.2.4 Hormona de la muda con su receptor. Para el receptor de la hormona de la muda (USP) se determina que la energía de enlace al unirse a su sustrato correspondiente es de aproximadamente -8.51 kcal/mol Tabla 8 que corresponde a la conformación más estable, al compararse con los demás sustratos se observa que la energía de enlace del receptor con la hormona de la muda presenta un valor de energía menor, seguido del metopreno y luego el Diflubenzuron. Pero para los compuestos mayoritarios del AE es el acetato de geranilo presenta mayor afinidad frente al receptor.

Tabla 8. Resultados de las Energías de enlace (Kcal/mol) entre el receptor USP y los sustratos Acetato de geranilo, citral(isómeros), diflubenzuron, metopreno, Hormona juvenil III y Hormona de la muda.

PROTEINA	COMPUESTO	ΔG (Kcal/mol)	AMINOACIDOS	DISTANCIA (Å)
USP	Acetato de Geranilo	-7.4326873	-----	-----
USP	Citral(geranial)	-6.8021946	-----	-----
USP	Citral2(neral)	-6.766911	-----	-----
USP	Diflubenzuron	-8.696462	GLU 320 GLU 320	1.932 1.852
USP	Metopreno	-9.050907	-----	-----

USP	Hormona de la muda	-9.105424	-----	-----
USP	Hormona juvenil III	-8.513672	-----	-----

4.3 HPLC

Mediante la Técnica de Hplc acoplada a masas se logró determinar la presencia de la hormona juvenil III y la hormona de la Muda en los patrones obtenidos de sigma-Aldrich. Se describen a continuación;

4.3.1 Hormona de la Muda (Patrón). La muestra de la Hormona de la Muda al utilizarse como fase móvil metanol se obtuvo en el cromatograma tres señales (Figura 18), en los tiempos de retención de 3.39 min, 3.51 min y 6.77 min. Para poder determinar cuál de estas tres señales correspondía a la Hormona de la Muda se confirmó mediante espectrometría de masas obteniéndose una masa de $481.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, la cual pertenecía a la segunda señal en el tiempo de retención a los 6.77 minutos.

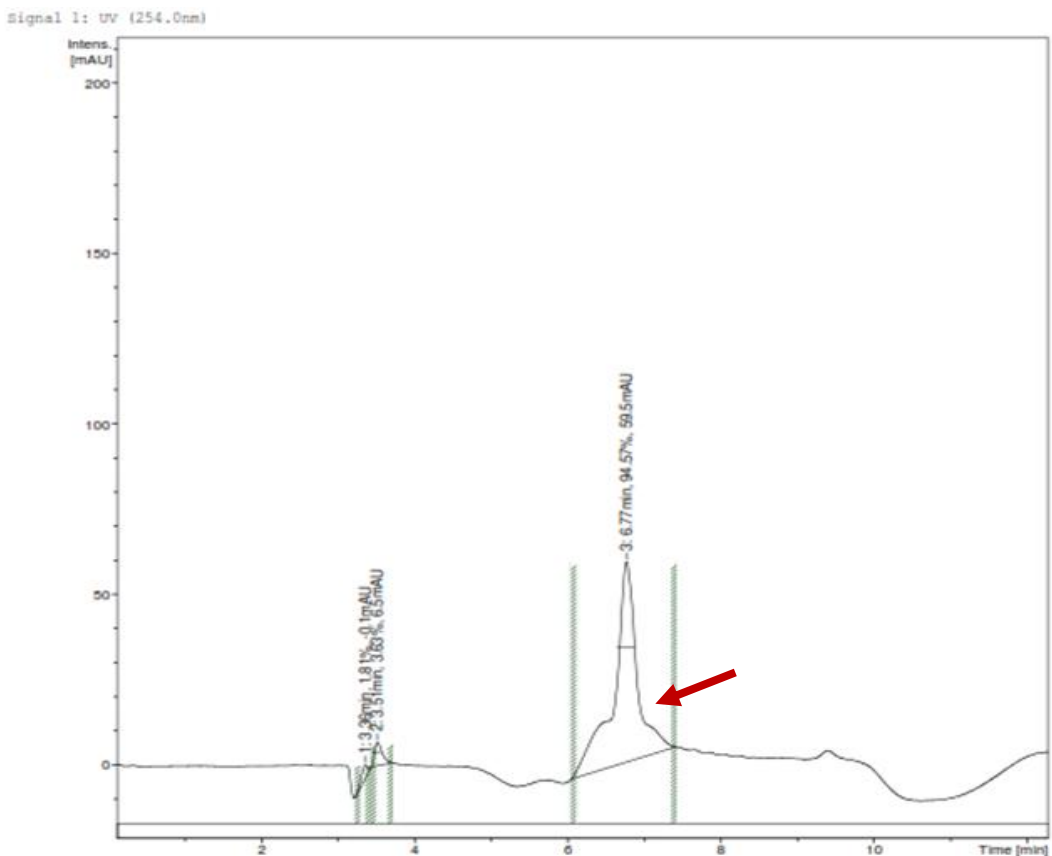


Figura 18. Espectro obtenido después de corrida la muestra de patrón de Hormona de la muda, el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo (minutos) que tarda en salir determinada señal.

Con el propósito de obtener una mejor separación de las señales de la muestra de Hormona de la Muda se varió la fase móvil utilizándose acetonitrilo, obteniéndose en el cromatograma cuatro señales de las cuales aparecieron a los 3.17 min, 3.69 min, 5.27 min, y 8.56 min (Figura 19). La señal al tiempo de retención de 5.27 minutos corresponde a la Hormona de la Muda, la cual se confirmó por espectrometría de masas. La masa correspondiente fue de $481.0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

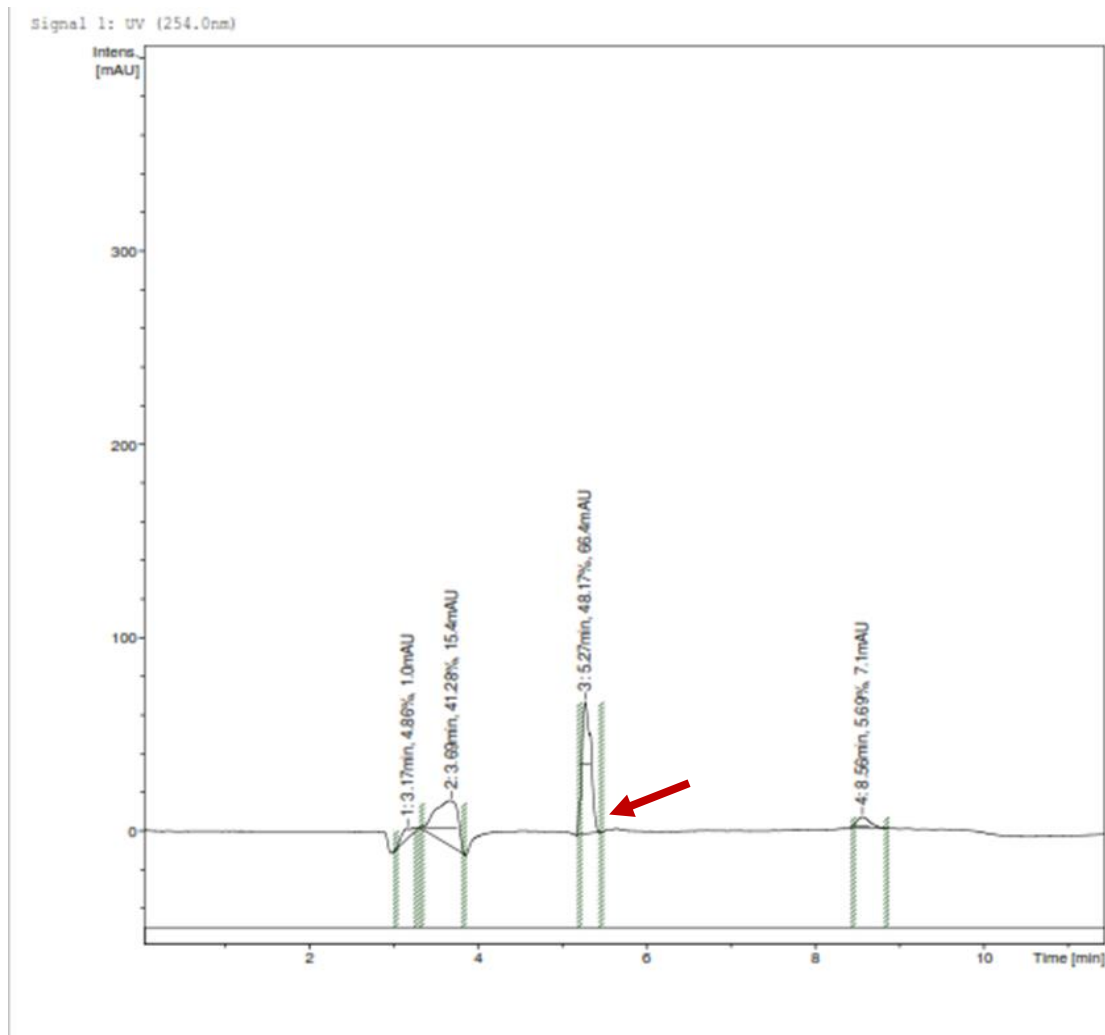


Figura 19. Espectro obtenido después de corrida la muestra de patrón de Hormona de la muda, el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo (minutos) que tarda en salir determinada señal.

4.3.2 Hormona Juvenil III (Patrón). Para los resultados obtenidos por la técnica de HPLC al pasar la muestra de Hormona Juvenil III con una fase móvil de metanol, en el cromatograma obtenido se observaron cinco señales en diferentes tiempos de retención: a los 3.24 min, 3.69 min, 8.60 min, 8.91 min y 10.06 min (Figura 20), para poder determinar cuál de estas señales pertenecía a la hormona se buscó por espectrometría de masas confirmar su masa correspondiente, determinándose que la señal a los 10.06 minutos correspondía a esta hormona. Donde se observó una fragmentación de la Hormona Juvenil III y se determinó las masas de 188.7 g.mol^{-1} a partir de su fragmentación del éster metílico, una masa de 266.6 g.mol^{-1} que corresponde al ion molecular y por último la masa 288.6 g.mol^{-1} que corresponde al ion aducto de sodio.

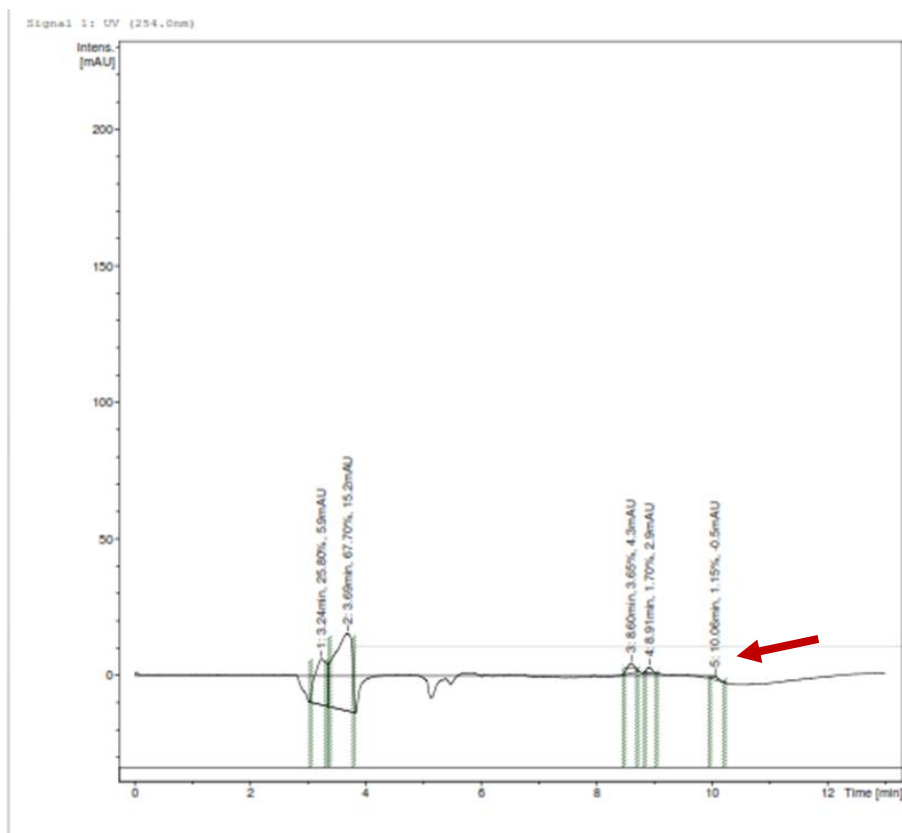


Figura 20. Espectro obtenido después de corrida la muestra de patrón de Hormona Juvenil III, el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo (minutos) que tarda en salir determinada señal.

De la misma manera que se buscó para la Hormona de la Muda que la señal saliera en un menor tiempo de retención se varió la fase móvil utilizándose ACN para la Hormona Juvenil III (figura 21) obteniéndose cinco señales 3.39 min, 6.51 min, 9.51 min, 9.86 min y 12.10 min de las cuales la señal que aparece en el tiempo de retención a los 9.86 minutos corresponde a la Hormona Juvenil, un poco antes de la señal que se observa en la Figura 20 en la que se utilizó como fase móvil metanol. La masa de la hormona se confirmó por espectrometría de masas, y se observó dos fragmentaciones $288.9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $266.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ que corresponden al ion aducto de sodio y al ion molecular respectivamente

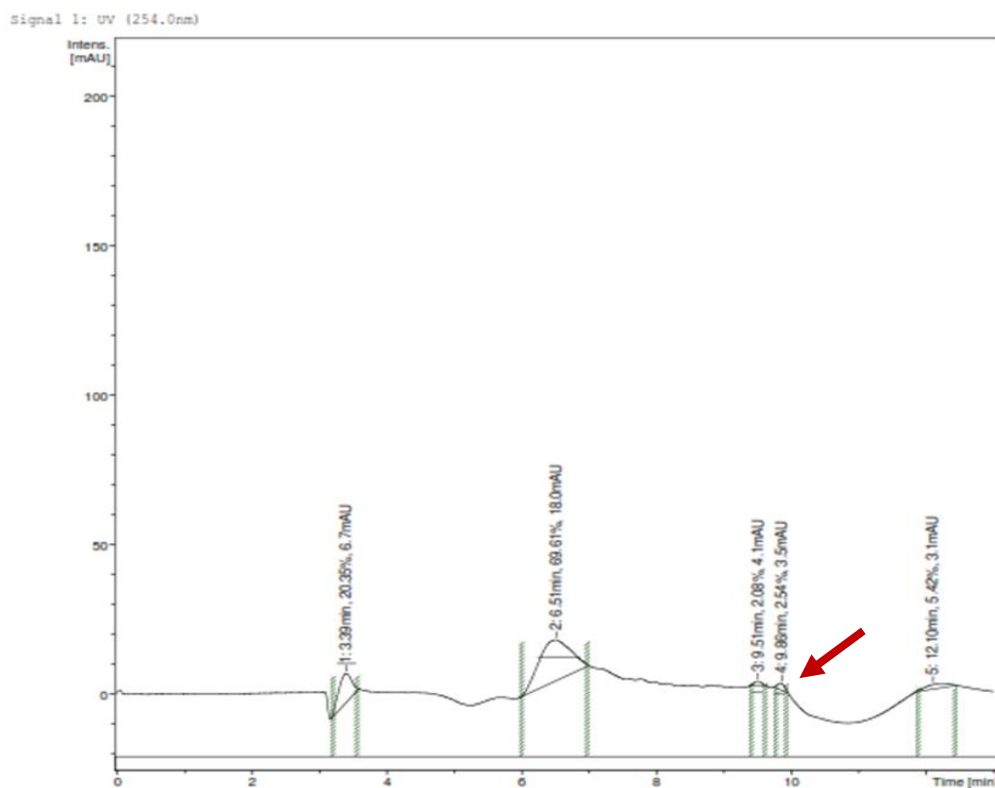


Figura 21. Espectro obtenido después de corrida la muestra de patrón de la Hormona Juvenil III, el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo (minutos) que tarda en salir determinada señal.

En las muestras tratadas con los diferentes compuestos del AE, los dos compuestos mayoritarios (cital y acetato de geranilo) y los dos patrones positivos (metopreno y diflubenzuron) a las correspondientes concentraciones, solo se obtuvo que para las muestras tratadas con diflubenzuron a la concentración de 6 mg. L^{-1} (Figura 22) y para las muestras tratadas con metopreno a la concentración de 6 mg. L^{-1} (Figura 23) la presencia de la Hormona de la Muda en muy bajas cantidades, para las muestras con diflubenzuron la señal apareció en un tiempo de retención a los 6.7 minutos. Para las otras muestras no se encontró las masas de las dos hormonas. Por espectrometría de masas se realizó un barrido para determinar en qué tiempo aparecía las masas correspondientes a las hormonas, pero solo se encontró la masa de 481.0 g.mol^{-1} que corresponde a la Hormona de la muda en el tiempo de retención ya mencionado.

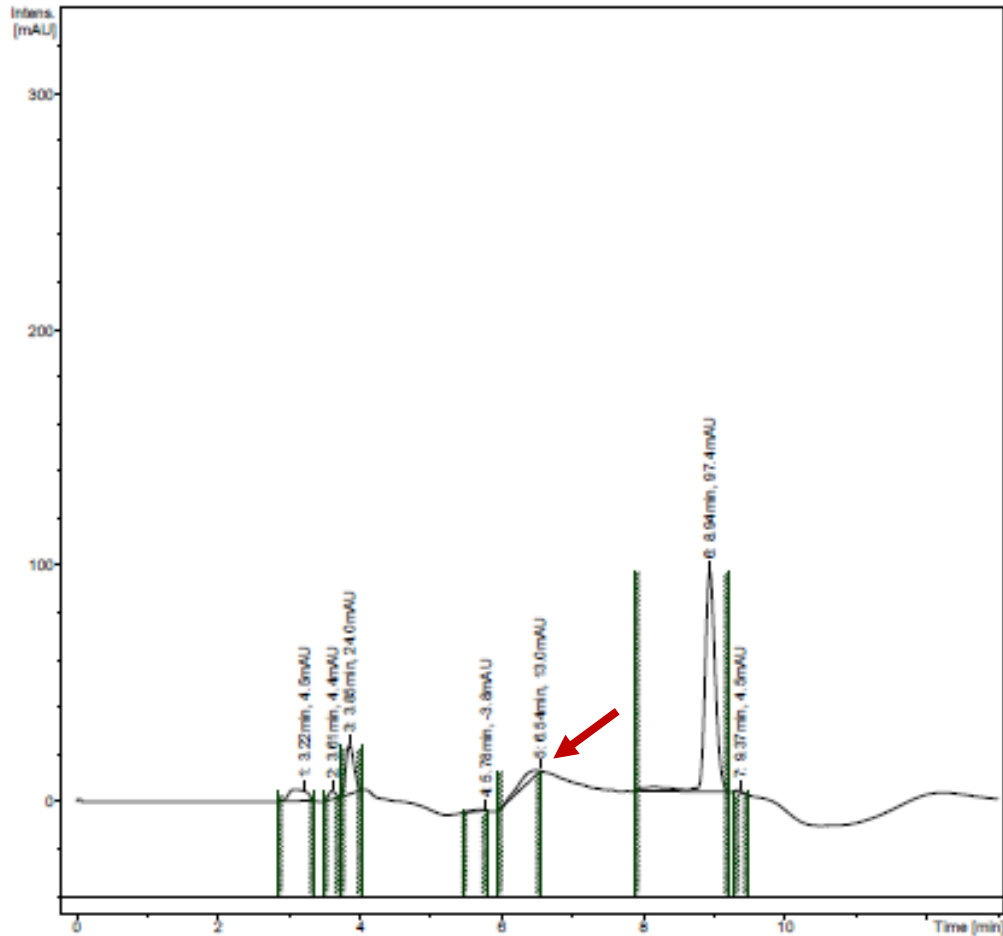


Figura 22. Espectro obtenido después de corrida la muestra de diflubenzuron a 6 mg. L^{-1} , el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo (minutos) que tarda en salir determinada señal.

Como se mencionó anteriormente, las muestras tratadas con metopreno a la concentración de 6 mg. L^{-1} (Figura 23) mostraron una señal en donde se observó la presencia de Hormona de la Muda en bajas cantidades a un tiempo de retención a los 7.8 minutos (Figura 23). La presencia de la hormona se corrobora por espectrometría de masas.

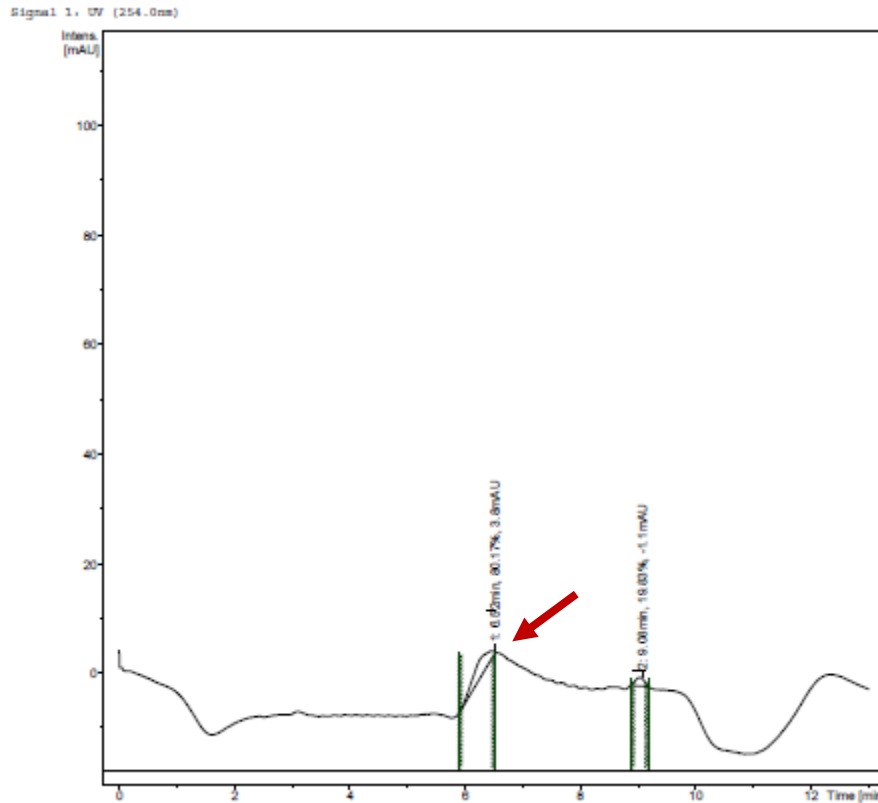


Figura 23. Espectro obtenido después de corrida la muestra de metopreno a 6 mg. L^{-1} , el eje y representa la intensidad de la señal (mAU) y eje x el tiempo (minutos) que tarda en salir determinada señal.

5 Discusión

En los bioensayos con el aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* se vio afectado el normal desarrollo de la metamorfosis del mosquito, se inhibió el paso del tercer estadio al estadio L4 (100% de inhibición). Además, debido a esta inhibición, las larvas presentaron cambios morfológicos en el tamaño larval. En ambas concentraciones que se evaluaron del aceite de *C. flexuosus* (3 mg. L^{-1} y 6 mg. L^{-1}) en los resultados se puede observar que se comportaron de manera similar, presentaron actividad inhibitoria frente al desarrollo del mosquito. Esta actividad de

inhibición puede deberse al efecto sinérgico de sus componentes la cual se potencializa generando una mayor respuesta biológica (Olivares *et al.*, 2013; Serrano, 2015).

Basándonos en los resultados obtenidos del Aceite esencial de *C. flexuosus* se evidencia que se comporta como un análogo de la Hormona Juvenil ya que comparado con los resultados de uno de los patrones el metopreno se observa que de manera similar en ambos casos se ve afectado el desarrollo del mosquito, y debido a esta inhibición del desarrollo, el tamaño de las larvas aumenta, a diferencia de las larvas tratadas con el patrón diflubenzuron que en los resultados se observa que a diferencia del metopreno las larvas presentan una notable disminución en el largo del tamaño (). (Dhadialla *et al.*, 1998; Villarreal, 2012; Viñuela *et al.*, 1991, Ware & Whitacre, 2004).

Los resultados presentados de los tratamientos con los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *C. flexuosus*, el citral y acetato de geranilo ocasionaron mortalidad a la concentración de 42 mg. L⁻¹ en las larvas de tercer estadio de *Ae. aegypti*. Adicionalmente, no se evidencio una notable actividad de inhibición del paso de un estadio a otro, en las concentraciones de 18 mg. L⁻¹ y 30 mg. L⁻¹ de las muestras tratadas con citral y acetato de geranilo, lo que sugiere otro mecanismo de acción en las larvas. En otros estudios se ha reportado que el citral pueden inhibir la acetilcolinesterasa. Aunque Serrano *et al.* (2015) reporta que el citral causa inhibición en estadios más tempranos del desarrollo del ciclo de vida del *Ae. aegypti* e inhibe el desarrollo del embrión y eclosión de los huevos, y el acetato de geranilo inhibe el paso de larva en L4 a pupa. Para el caso del citral esto puede deberse que a medida que la larva crece y se desarrolla es menos susceptible a este compuesto y en el caso del acetato de geranilo actúa sobre el ultimo estadio

larval. Lo que sugiere que estos compuestos mayoritarios no son los que le dan al aceite esencial de *C. flexuosus* la propiedad de inhibición.

Los datos con modelado molecular demuestran que el citral y acetato de geranilo probablemente actúan sobre los sustratos involucrados en la biosíntesis de las hormonas, al igual que el metopreno y el Diflubenzuron que presentaron valores de menor energía, aunque los valores que presentan los dos compuestos mayoritarios no son alejados respecto a estos compuestos patrones. Asimismo, en los resultados se identificó que el acetato de geranilo respecto al citral presenta mayor afinidad en la interacción de varias enzimas involucradas en la biosíntesis de las hormonas.

Los resultados de HPLC que se obtuvieron no son muy concluyentes, se dificultó el análisis de las hormonas ya que al momento de mezclar ambas hormonas para realizar la curva de calibración se observó un solapamiento de ambas lo que dificultó su análisis. Varias técnicas de análisis para la cuantificación de hormonas presentan dificultad debido a la baja volatilidad e inestabilidad térmica de las hormonas. Es necesario buscar metodologías que permitan verificar y cuantificar los niveles de estas hormonas. (Zhou *et al.*, 2011)

Los tratamientos con citral, acetato de geranilo, metopreno, diflubenzuron, y el aceite esencial analizados por HPLC acoplado a espectrometría de masas demostraron en los espectros diferentes señales de las cuales, corroborando por espectrometría de masas, muy pocas corresponden a la masa de alguna de las hormonas o a la fragmentación de estas. Lo que sugiere que la concentración de la hormona juvenil III o hormona de la muda en las muestras son muy bajas. También esto

puede deberse a que otro tipo de proteínas presentes en las muestras se ionicen mejor que las hormonas buscadas, o que en las muestras aún existen impurezas.

6 Conclusiones

El aceite esencial de *C. flexuosus* a dosis sub-letales inhibe el paso de un estadio a otro actuando como un análogo de la Hormona juvenil en larvas de tercer estadio.

El aceite esencial de *C. flexuosus* causa malformaciones en las larvas afectando el tamaño de la larva y el desarrollo normal de su ciclo de vida.

El citral y acetato de geranilo no le confieren al aceite esencial de *C. flexuosus* la propiedad de inhibición. Esta propiedad de inhibición puede deberse al sinergismo de los componentes que hacen parte del aceite esencial de *C. flexuosus*.

El citral y el acetato de geranilo causan mortalidad en larvas de tercer estadio sugiriendo otro tipo de mecanismo de acción.

Tras el modelado molecular realizado se observa posible afinidad del acetato de geranilo y el citral a unirse a algunas enzimas involucradas en la biosíntesis de la hormona juvenil y hormona de la muda.

7 Recomendaciones

Estudiar en cada uno de los estadios del *Ae. aegypti* el efecto inhibitorio tanto de los compuestos mayoritarios y minoritarios del aceite *C. flexuosus*, así como mezclas de estos compuestos.

Concentrar los niveles de las hormonas Juvenil y de la muda previo análisis por cromatografía.

Mejorar el protocolo de separación de las hormonas por la técnica de HPLC acoplado a masas.

8 Referencias Bibliográficas

- Amariles Barrera, S., Parra Henao, J. G., García Pajón, C. M., & Cotes Torres, M. J. (2013). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *Revista CES Medicina*, 27(2), 193-203.
- Areiza, M., Nouzova, M., Rivera-Perez, C., & Noriega, F. G. (2015). 20-Hydroxyecdysone Stimulation of Juvenile Hormone Biosynthesis By the Mosquito Corpora Allata. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 64, 100-105.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.08.001>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bellés ,X 2013. La metamorfosis de los insectos. 1ª edición,Editorial Catarata,pp.40-55.
- Bellés, X., Martín, D., & Piulachs, M.-D. (2005). the Mevalonate Pathway and the Synthesis of Juvenile Hormone in Insects. *Annual Review of Entomology*, 50(1), 181-199.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130356>
- Berti-moser, J., & Navarro-Bueno, E. (2008). Efectividad y persistencia de la actividad letal de metopreno sobre pupas de *Anopheles albimanus* (Diptera : Culicidae), 19(1), 27-34.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... Wint, G. R. W. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504-507.
<https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bisset Lazcano, J. a., Rodríguez, M. M. M., San Martín, J. L., Romero, J. E., Montoya, R., Brogdon, William G., ... Leyva, R. (2014). Evaluación de la resistencia a insecticidas en

- Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) de Argentina Evaluation of insecticidal resistance observed in *Aedes aegypti*. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 66(3), 360-369. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892009000900007>
- Blais, C., Blasco, T., Maria, A., Dauphin-Villemant, C., & Lafont, R. (2010). Characterization of ecdysteroids in *Drosophila melanogaster* by enzyme immunoassay and nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(13-14), 925-932. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.02.018>
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., ... Hay, S. I. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
- Castillo, R. M., Stashenko, E., & Duque, J. E. (2017). Insecticidal and repellent activity of several plant-derived essential oils against *Aedes Aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 33(1), 25-35. <https://doi.org/10.2987/16-6585.1>
- Castro, J., Díaz, D., & Correa, G. (2007). Comunicaciones Cortas Evaluación de la actividad larvicida del metopreno (Altosid) ® sobre mosquitos vectores , en un área de alta transmisión. *Anales de la Facultad de Medicina*, 68(3), 279-283.
- Coria, C., Almiron, W., Valladares, G., Carpinella, C., Ludueña, F., Defago, M., & Palacios, S. (2008). Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology*, 99(8), 3066-3070. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.012>
- De la Cruz-Gallardo, C. M., Rodríguez-Pérez, C., & Ocaña-Zurita, F. J. (2014). Susceptibilidad y

- resistencia a insecticida en mosquito transmisor del dengue. *Salud En Tabasco*, 20(2), 54-59.
- De Lima, G. P. G., De Souza, T. M., De Paula Freire, G., Farias, D. F., Cunha, A. P., Ricardo, N. M. P. S., ... Carvalho, A. F. U. (2013). Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3351-1>
- De Loof, A., Vandersmissen, T., Marchal, E., & Schoofs, L. (2015). Initiation of metamorphosis and control of ecdysteroid biosynthesis in insects: The interplay of absence of Juvenile hormone, PTTH, and Ca(2+)-homeostasis. *Peptides*, 68, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.07.025>
- Demirci, B., Tsikolia, M., Bernier, U. R., Agramonte, N. M., Alqasoumi, S. I., Al-Yahya, M. A., ... Tabanca, N. (2013). Phoenix dactylifera L. spathe essential oil: Chemical composition and repellent activity against the yellow fever mosquito. *Acta Tropica*, 128(3), 557-560. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.003>
- Destrez, B., Pinel, G., Monteau, F., Lafont, R., & Le Bizec, B. (2009). Detection and identification of 20-hydroxyecdysone metabolites in calf urine by liquid chromatography-high resolution or tandem mass spectrometry measurements and establishment of their kinetics of elimination after 20-hydroxyecdysone administration. *Analytica Chimica Acta*, 637(1-2), 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.015>
- Dhadialla, T. S., Carlson, G. R., & Le, D. P. (1998). New Insecticides With Ecdysteroidal and Juvenile Hormone Activity. *Annual Review of Entomology*, 43(1), 545-569. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.545>
- Dow AgroScience. (n.d.). Una herramienta control de carpocapsa. Dow AgroSciences, 1-23.
- Flores-Herrera O Martínez-Montes F, Guerra-Sánchez G, Sierra-Campos E, Pardo-Vázquez JP.,

- R.-G. J. L. (2008). Las Herramientas De Modelado Molecular. *Mensaje Bioquimico*, XXXII(February 2016), 95-134. Recuperado a partir de <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>
- Fonseca, I., & Quiñones, M. L. (2005). Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. *Revista Colombiana de Entomología*. Recuperado a partir de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v31n2/v31n2a01.pdf>
- Font Maté C. (2017). MODELADO MOLECULAR COMO HERRAMIENTA PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS QUE INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS.
- Galvis, & Soto, A. Niveles de resistencia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al insecticida Temephos en el departamento de Caldas. *Agronomía*. 2010. 18(1):69-76
- Gago, F. (1994). Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía I. Diseño de Medicamentos.*, 253-327. Recuperado a partir de <http://www.ranf.com/>
- Gilbert, L. I., & Warren, J. T. (2005). A Molecular Genetic Approach to the Biosynthesis of the Insect Steroid Molting Hormone. *Vitamins and Hormones*, 73(05), 31-57. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)73002-8](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)73002-8)
- Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Tavares, A. C., Cavaleiro, C., Lopes, M. C., Canhoto, J., & Salgueiro, L. (2012). Composition and biological activity of the essential oil from *Thapsia minor*, a new source of geranyl acetate. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.030>
- Gonzales, G. (2013). *Resistencia a insecticidas en el mosquito vector del dengue Aedes aegypti (L) en dos épocas de transmisión de la enfermedad en Merida, Yucatan*. Universidad

Autònoma de Nuevo Leon.

- Grisales, N., Poupardin, R., Gomez, S., Fonseca-Gonzalez, I., Ranson, H., & Lenhart, A. (2013). Temephos Resistance in *Aedes aegypti* in Colombia Compromises Dengue Vector Control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002438>
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., ... Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), S7-S16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
- Harburger, L. (2011). *Efectos letales y subletales de una pastilla fumígena conteniendo permetrina y pyriproxyfen sobre Aedes aegypti (Diptera : Culicidae)*.
- Harris, A. F., Rajatileka, S., & Ranson, H. (2010). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), 277-284. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0623>
- Hoffmann, K., & Lorenz, M. (1998). Recent advances in hormones in insect pest control. *Phytoparasitica*, 26(4), 323-330. <https://doi.org/10.1007/BF02981447>
- Ichikawa, A., Ono, H., Furuta, K., Shiotsuki, T., & Shinoda, T. (2007). Enantioselective separation of racemic juvenile hormone III by normal-phase high-performance liquid chromatography and preparation of [2H3]juvenile hormone III as an internal standard for liquid chromatography-mass spectrometry quantification. *Journal of Chromatography A*, 1161(1-2), 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.003>
- Isman, M. B. (2006). Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annu. Rev. Entomol*, 51, 45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Kamita, S. G., Hinton, A. C., Wheelock, C. E., Wogulis, M. D., Wilson, D. K., Wolf, N. M., ...

- Hammock, B. D. (2003). Juvenile hormone (JH) esterase: Why are you so JH specific? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12), 1261-1273.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.08.004>
- Khanuja, S. P. S., Shasany, A. K., Pawar, A., Lal, R. K., Darokar, M. P., Naqvi, A. A., ... Kumar, S. (2005). Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon Spreng.* (Poaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(2), 171-186.
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.06.011>
- Kim, S.-I., Yoon, J.-S., Baeck, S.-J., Lee, S.-H., Ahn, Y.-J., & Kwon, H. W. (2012). Toxicity and Synergic Repellency of Plant Essential Oil Mixtures with Vanillin Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 49(4), 876-885.
<https://doi.org/10.1603/ME11127>
- Kishore, N., Mishra, B. B., Tiwari, V. K., & Tripathi, V. (2011). *A review on natural products with mosquitosidal potentials. Research Signpost* (Vol. 37/661).
- Klowden Marc J. (2007). *Physiological Systems in Insects.* (ELSEVIER, Ed.) (Second edi).
Moscow , Idaho: ELSEVIER.
- Koul, O., & Walia, S. (2008). Essential Oils as Green Pesticides : Potential and Constraints, 2008, 63-84.
- Kumar, A., Malik, F., Bhushan, S., Sethi, V. K., Shahi, A. K., kaur, J., ... Singh, J. (2008). An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 171(3), 332-347.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.10.003>
- Leyva, M., Marquetti, M. del C., French, L., Montada, D., Tiomno, O., & Tacoronte, J. E. (2013).

- Efecto de un aceite de trementina obtenido de *Pinus tropicalis* Morelet sobre la biología de una cepa de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 resistente a insecticidas. *Anales de Biología*, 35(1), 75-84.
- Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., da Silva, E. V. G., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., ... de Melo Santos, M. A. V. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & vectors*, 4, 5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-5>
- Liu, S., Li, K., Gao, Y., Liu, X., Chen, W., Ge, W., ... Li, S. (2017). Antagonistic actions of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone within the ring gland determine developmental transitions in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(1), 201716897. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716897115>
- Liu, S., Yang, B., Gu, J., Yao, X., Zhang, Y., Song, F., & Liu, Z. (2008). Molecular cloning and characterization of a juvenile hormone esterase gene from brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Insect Physiology*, 54(12), 1495-1502. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.010>
- Lucia, A., Gonzalez Audino, P., Seccacini, E., Licastro, S., Zerba, E., & Masuh, H. (2007). Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(3), 299-303. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2007\)23\[299:LEOEGE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2007)23[299:LEOEGE]2.0.CO;2)
- Lucia, A., Zerba, E., & Masuh, H. (2013). Knockdown and larvicidal activity of six monoterpenes against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their structure-activity relationships. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3618-6>
- Luthra, R., Srivastava, A. K., & Ganjewala, D. (2007). Histochemical localization of citral accumulating cite in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Ness Ex. Steud) wats cultivar OD-

19. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6(2), 419-422.
<https://doi.org/10.3923/ajps.2007.419.422>

Manimaran, A., Jee, M. M., Cruz, J., Muthu, C., Vincent, S., & Ignacimuthu, S. (2012). Larvicidal and knockdown effects of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say, *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles stephensi* (Liston). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(November), 855-862. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/abb.2012.37106>

Martínez, A. (2001). Aceites esenciales, 1-34.

McGraw, E. a., & O'Neill, S. L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature reviews. Microbiology*, 11(3), 181-193. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2968>

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. (MPS). (2010). Dirección general de Salud Pública. Grupo Salud Ambiental. Programa de Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores. Colombia, Documento oficial interno

Miyakawa, H., Sato, T., Song, Y., Tollefsen, K. E., & Iguchi, T. (2017). Ecdysteroid and juvenile hormone biosynthesis, receptors and their signaling in the freshwater microcrustacean *Daphnia*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (September), 0-1. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.12.006>

Miyashita, M., Matsushita, K., Nakamura, S., Akahane, S., Nakagawa, Y., & Miyagawa, H. (2011). LC/MS/MS identification of 20-hydroxyecdysone in a scorpion (*Liocheles australasiae*) and its binding affinity to in vitro-translated molting hormone receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(12), 932-937. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.09.002>

Mulder, R., & Gijswijt, M. J. (1973). Which Interfere with Cuticle Deposition, 737-745.

Mullai, K., Jebanesan, A., & Pushpanathan, T. (2008). Effect of bioactive fractions of *Citrullus*

- vulgaris Schrad. leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*, 102(5), 951-955. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0859-2>
- Muñoz, J. A., Staschenko, E., & Ocampo D., C. B. (2014). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2), 198-202.
- Nath, S. C., Sarma, K. K., Vajezikova, I., & Leclercq, P. A. (2002). Comparison of volatile inflorescence oils and taxonomy of certain *Cymbopogon* taxa described as *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) Wats. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(2), 151-162. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00066-7](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00066-7)
- Neubueser, D., Warren, J. T., Gilbert, L. I., & Cohen, S. M. (2005). Molting Defective Is Required for Ecdysone Biosynthesis. *Developmental Biology*, 280(2), 362–372. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.023>
- Olivares Cruz, M. A., & Lopez Malo, A. (2013). Potencial antimicrobiano de mezclas que incluyen aceites esenciales o sus componentes en fase vapor. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 1(7), 78–86.
- OMS. (1992). Resistencia De Los Vectores De Enfermedades a Los Plaguicidas.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Lab. Confirm. Rate, 2016, 2.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73(2), 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.11.019>
- PALA, J. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “*Eryngium*” L, en la península Ibérica Madrid, Tesis doctoral, 2002, Universidad Complutense de Madrid, pp.21, 33-34

- Pinto, E., Gonçalves, M. J., Hrimpeng, K., Pinto, J., Vaz, S., Vale-Silva, L. A., ... Salgueiro, L. (2013). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Industrial Crops and Products*, *51*, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.033>
- Prajapati, V., Tripathi, A. K., Aggarwal, K. K., & Khanuja, S. P. S. (2005). Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology*, *96*(16), 1749-1757. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.007>
- Qu, Z., Bende, W. G., Tobe, S. S., & Hui, J. H. L. (2018). Juvenile hormone and sesquiterpenoids in arthropods: Biosynthesis, signaling, and role of MicroRNA. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (October 2017), 0-1. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.01.013>
- Quintans-Júnior, L., Moreira, J. C. F., Pasquali, M. a B., Rabie, S. M. S., Pires, A. S., Schröder, R., ... Gelain, D. P. (2013). Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models. *ISRN toxicology*, *2013*, 459530. <https://doi.org/10.1155/2013/459530>
- Ramar, M., Paulraj, M. G., & Ignacimuthu, S. (2013). Screening of pupicidal activity of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say. *Journal of Medicinal Plant Research*, *1*(2), 9-12.
- Ramirez, C. E., Nouzova, M., Benigni, P., Quirke, J. M. E., Noriega, F. G., & Fernandez-Lima, F. (2016). Fast, ultra-trace detection of juvenile hormone III from mosquitoes using mass spectrometry. *Talanta*, *159*, 371-378. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.041>
- Riddiford, L. M. (2012). How does juvenile hormone control insect metamorphosis and

- reproduction? *General and comparative endocrinology*, 179(3), 477-484.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.06.001>
- Ritchie, S., Asnicar, M., & Kay, B. (1997). ACUTE AND SUBLETHAL EFFECTS OF (S) - METHOPRENE ON SOME AUSTRALIAN MOSQUITOES, 13(2), 153-155.
- Rivera-Perez, C., Nouzova, M., Lamboglia, I., & Noriega, F. G. (2014). Metabolic analysis reveals changes in the mevalonate and juvenile hormone synthesis pathways linked to the mosquito reproductive physiology. *Insect biochemistry and molecular biology*, 51, 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.001>
- Rodríguez Quintanilla, R., Ruiz Nova, C., Arias Moyano, G., Castro Salazar, H., Martínez, J., & Stashenko, E. (2012). Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*.
- Saito, J., Kimura, R., Kaieda, Y., Nishida, R., & Ono, H. (2016). Characterization of candidate intermediates in the Black Box of the ecdysone biosynthetic pathway in *Drosophila melanogaster*: Evaluation of molting activities on ecdysteroid-defective larvae. *Journal of Insect Physiology*, 93-94, 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.09.012>
- Salvatella, R. (1996). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay, (2).
- Santacoloma Varón, L., Chaves Córdoba, Bernardo, & Brochero, H. (2010). Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 27(1), 66-73. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892010000100010>
- Serrano, S. (2015). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REGULADORA DEL CRECIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL CYMBOPOGON FLEXUOSUS (POACEAE) SOBRE EL*

DESARROLLO DE STEGOMYIA AEGYPTI (DIPTERA: CULICIDAE). Universidad Industrial de Santander.

Shaalán, E. A. S., Canyon, D., Younes, M. W. F., Abdel-Wahab, H., & Mansour, A. H. (2005). A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment International*, 31(8), 1149-1166. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.03.003>

Sharma, P. R., Mondhe, D. M., Muthiah, S., Pal, H. C., Shahi, A. K., Saxena, A. K., & Qazi, G. N. (2009). Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chemico-Biological Interactions*, 179(2-3), 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.12.004>

Silva, W. J., Dória, G. A. A., Maia, R. T., Nunes, R. S., Carvalho, G. A., Blank, A. F., ... Cavalcanti, S. C. H. (2008). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*, 99(8), 3251-3255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.064>

Singh, S., Ram, M., Ram, D., Singh, V. P., Sharma, S., & Tajuddin. (2000). Response of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) under different levels of irrigation on deep sandy soils. *Irrigation Science*, 20(1), 15-21. <https://doi.org/10.1007/s002710000026>

Simpson, P., & Marcellini, S. (2006). The origin and evolution of stereotyped patterns of macrochaetes on the nota of cyclorhaphous Diptera. *Heredity*, 97(3), 148-56. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800874>

Solomon, E., Martin D., Berg L. & Villee C. a. 1996. *Biología de Villee*. Tercera Edición. McGraw-Hill. Interamericana. Mexico, 1193.

Stashenko Elena E. (2009). *Aceites Esenciales*. Primera edición, Universidad Industrial de Santander. Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales-CENIVAM

- Soonwera, M., & Phasomkusolsil, S. (2017). Adulticidal, larvicidal, pupicidal and oviposition deterrent activities of essential oil from *Zanthoxylum limonella* Alston (Rutaceae) against *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(11), 967-978. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.09.019>
- Tennyson, S., Samraj, D. A., Jeyasundar, D., Chalieu, K., College, M. C., & Nadu, T. (2013). Larvicidal Efficacy of Plant Oils Against the Dengue Vector *Aedes aegypti* (L .) (Diptera : Culicidae). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 13(1), 64-68. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.13.1.64107>
- Torres, G., & Solano, L. (2014). *Dengue En Personas De 20-30 Años De Edad Que Acuden Al Sub Centro De Salud Venezuela Del Cantón Machala Del Mes De Enero a Julio Del Año 2012*. Universidad Técnica de Machala.
- Vera, S., Fernando Zambrano, D., Méndez-Sánchez, Rodríguez-Sanabria, S., Stashenko, E. E., & Duque Luna, J. E. (2014). Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).
- Villarreal, L. (2012). *Determinación de las concentraciones diagnósticas de los reguladores de crecimiento de insectos piriproxifen y diflubenzurón para Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) cepa Rockefeller y el estado de la resistencia de seis poblaciones de campo en Colombia*.
- Viñuela, E., Budia, F., & Estal, P. Del. (1991). Los insecticidas reguladores del crecimiento y la cutícula. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*, 17, 391-400.
- WHO. (2004). Report of the Seventh Whopes Working Group Meeting. *Review Literature And Arts Of The Americas*, (December 2003).
- Zhao, B., Hou, Y., Wang, J., Kokoza, V. A., Saha, T. T., Wang, X., ... Raikhel, A. S. (2016). Determination of juvenile hormone titers by means of LC-MS / MS / MS and a juvenile

hormone-responsive Gal4 / UAS system in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 77, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.08.003>

Zhou, J., Qi, Y., Hou, Y., Zhao, J., Li, Y., Xue, X., & Wu, L. (2011). Quantitative determination of juvenile hormone III and 20-hydroxyecdysone in queen larvae and drone pupae of *Apis mellifera* by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry, 879, 2533-2541. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.006>

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