



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL
METABOLÓMICO DE LA DIETA DE
MOSQUITOS VECTORES *Anopheles* POR
LA TÉCNICA HPLC-MS
(CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIENCIA ACOPLADO A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS) EN EL
DEPARTAMENTO DE LIMA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA
OPTAR EL GRADO DE MAESTRA EN
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

BALVINA DIANA LEYVA GUADALUPE DE
DIAZ

LIMA – PERÚ

2025

ASESOR

Dr. FELIPE CARLOS YON FELIPE

JURADO DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

MG. ANA CECILIA COLAROSI SALINAS

PRESIDENTE

DR. BILLY JOEL CABANILLAS AMADO

VOCAL

MG. PALMIRA RYQUETT VENTOSILLA LOPEZ

SECRETARIA

DEDICATORIA.

A mis padres por ser ejemplo de perseverancia, valentía y humildad.

A mi esposo, por su constante apoyo y amor.

A Sadith y Juan por ser mis motivos para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, por ser la fuente de toda sabiduría.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

New component FA4 – Entomology

Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humbolt

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	26	MAYO	2025
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	BALVINA DIANA LEYVA GUADALUPE DE DIAZ		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2020		
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO DE LA DIETA DE MOSQUITOS VECTORES <i>Anopheles</i> POR LA TÉCNICA HPLC-MS (CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS) EN EL DEPARTAMENTO DE LIMA		
MODALIDAD (marcar)	Trabajo de Investigación		
Declaración del Autor El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	986681702		
E-mail	balvina.leyva.g@upch.pe		

Firma del Egresado
DNI 41935678

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	23
III.	HIPOTESIS	23
IV.	OBJETIVO	23
V.	METODOLOGÍA	24
VI.	RESULTADOS	31
VII.	DISCUSIONES	45
VIII.	CONCLUSIONES	54
IX.	RECOMENDACIONES	55
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
XI.	ANEXOS	

RESUMEN

Los mosquitos necesitan de los carbohidratos, lípidos, aminoácidos y otros nutrientes para desarrollar actividades fisiológicas como la paridad, longevidad, sobrevivencia y capacidad vectorial. El buche del mosquito es parte del sistema digestivo; donde se almacenan los azúcares derivados de las plantas. En Perú, la investigación de la dieta de anophelinos es limitada y no existe una base de datos sobre el perfil metabolómico detectados por Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-MS); el cuál identifica metabolitos con alta sensibilidad y precisión. El objetivo de este estudio es identificar y crear una base de datos metabolómico de la dieta de especies *Anophelinos*. Las muestras fueron los buches de mosquitos colectados en campo, buches de mosquitos alimentados con plantas colectadas en campo y extractos metanólicos de 5 plantas. Los buches fueron analizados por la técnica de UHPLC-MS. Los resultados muestran una relación entre los metabolitos encontrados en las plantas y los buches de mosquitos. Se identificó 12 azúcares, 10 aminoácidos, 5 pesticidas, 7 lípidos entre otros compuestos naturales de las plantas como los flavonoides. Los resultados obtenidos podrán contribuir a continuar con los estudios de preferencia alimentaria, diseño de trampas más eficientes, estudio de vías metabólicas y resistencia a pesticidas.

PALABRAS CLAVES

An. pseudopunctipennis, perfil metabolómico, dieta nectarívora, UHPLC-MS.

ABSTRACT

The mosquitoes need carbohydrates, lipids, amino acids and other nutrients to develop physiological activities like parity, longevity, survival and vectorial capacity. The mosquito's crop is part of the digestive system, where sugars derived from plants are stored. In Peru, the research about the nectarivores diet is limited and does not exist data about the metabolomic profile of the Anophelines species by Ultra High-Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (UHPLC-MS) which can separate chemical compounds and identify metabolites with high sensitivity and accuracy. The aim of the study was to identify and create a metabolomic database of the mosquitoes Anopheles species' diet. The samples were crops of the mosquitoes collected in the field, crops of the feeding assays, methanolic extracts of five plants and mosquitoes' fed with 10% of sucrose. The crops were analyzed by the UHPLC-MS. The results shown a relationship between the compound of plants and compounds found in the mosquito's crop. It identified 12 sugars, 10 amino acids, 5 pesticides, 7 lipids, and other natural plant compounds. The results will contribute for future research like feeding preference, design of more efficient traps, study of metabolism pathways and resistance to pesticides.

KEYWORDS

An. pseudopunctipennis, metabolomic profile, nectarivore diet, UHPLC-MS.

I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

La diversidad de mosquitos en la Región Lima y la identificación de ciertas especies que pueden ser vectores potenciales de enfermedades como la malaria han estimulado el estudio de la dieta estos mosquitos; ya que esto tiene una gran relación con la sobrevivencia, longevidad, capacidad vectorial, fertilidad entre otras características propias de los vectores (Foster, 1995; Kessler et al., 2013). El conocimiento de su dieta nectarívora es un factor importante de investigación; puesto que nos permite abordar tres mecanismos de protección de los mosquitos en sí; como son, la inducción inmunitaria, la secreción de antimicrobianos y competencia metabólica (Chabanol et al., 2020). Por otro lado, la dieta depende de factores complejos al que es expuesto el mosquito; tales como su localización geográfica, estacionalidad, composición del agua de los criaderos larvarios; así como el hábitat de alimentación de los mosquitos adultos.

Los parásitos de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* causantes de la Malaria, son transmitidos por vectores de diferentes especies de *Anopheles*, la transmisión se da a través de la picadura del mosquito hembra al hospedero humano. El objetivo de la picadura es alimentarse de la sangre de su hospedero; este modo de alimentación permite la transmisión del patógeno al hospedero; puesto que la mayor carga parasitaria se encuentra en las glándulas salivales del mosquito (Wells & Andrew, 2019). El mosquito hembra una vez emergido y apareado con el macho, buscará alimentarse de la sangre del hospedero; ya que requiere una fuente de aminoácidos para la maduración de los huevos antes de la oviposición (Chisulumi et al., 2022; Venter et al., 2022).

El proyecto está enfocado en el análisis del perfil metabolómico de la dieta de diferentes especies vectores como los *Anopheles*, transmisores de enfermedades tales como la Malaria en humanos y la Malaria Zoonótica; por ejemplo, la Malaria aviar (Reciperu202132Galvez, n.d.); con la finalidad de conocer su comportamiento frente a la dieta de su propio hábitat.

La presencia de mosquitos *Anopheles* en la región Lima, representa un riesgo a la salud pública si estos se llegaran a contagiar de alguno de los parásitos que producen la malaria. En los últimos 6 años se ha reportado 7 casos acumulados de Malaria al 2024 por parte del Ministerio de Salud (Ministerio de Salud - Perú, 2024).

En base a nuestras primeras investigaciones (ASTMH-2023; Pandengue, 2023), hemos determinado la presencia de especies de anophelinos en las cuencas ribereñas de la Región Lima; tales como los ríos Mala, Lurín, Cañete. Existe también reportes en el departamento de Ica y las zonas cálidas tropicales del Perú reportado por el Ministerio de Salud; por lo mismo, es necesario evaluar el comportamiento con respecto a la dieta de los principales vectores causantes de enfermedades en el Perú.

Estos estudios nos permitirán tener un enfoque más amplio para poder direccionar los estudios posteriores, a por ejemplo la elaboración de trampas de cebo atractivo y tóxico a base de azúcar (Attractive toxic sugar bait-ATSB) (Sissoko et al., 2019) o al diseño de compuestos químicos sintéticos o el uso de compuestos naturales que inhiben el ciclo de vida de los mosquitos (Shin et al., 2011), con el pleno conocimiento de los metabolitos diana en las diferentes redes moleculares y vías metabólicas.

2. Marco teórico

Malaria en el Perú

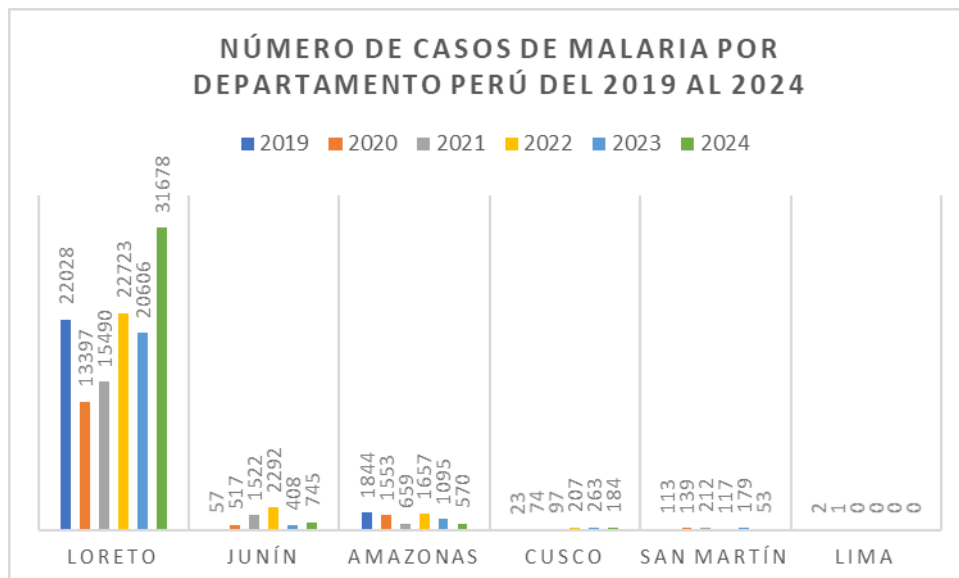


Figura 1: Reporte de casos de malaria por Departamento en el Perú del 2019 al 2024. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - CDC Perú - MINSA

Las enfermedades infecciosas generadas por los mosquitos vectores como los *Anopheles*, causan un problema de salud pública serio en el Perú, en los siguientes reportes epidemiológicos de la figura 1 podemos observar el número de casos reportados en los últimos años de Malaria por departamentos a la semana epidemiológica 52 del 2024 (Ministerio de Salud - Perú, 2024). Sin embargo, ha habido reportes esporádicos de Malaria en zonas urbanas como en el departamento de Lima debido a personas procedentes de zonas endémicas.

Los departamentos más afectados por Malaria en los últimos años han sido Loreto, Junín, Amazonas, Cusco, San Martín y Madre de Dios los cuales constituyen las principales zonas endémicas; el clima tropical, húmedo y la abundante vegetación de estas regiones favorece al desarrollo de mosquitos *Anopheles* principal vector de la Malaria (Ministerio de Salud - Perú, 2024). Otro aspecto importante a tomar en

cuenta es la migración de personas de zonas rurales a zonas urbanas el cual contribuye a la propagación de la enfermedad. El departamento de Lima no es una zona endémica, pero se han reportado casos con malaria por *Plasmodium vivax* en personas provenientes de zonas endémicas (Rosas-Aguirre et al., 2016).

El *Plasmodium vivax* es la especie de Malaria más prevalente en el Perú, afectando mayormente a las zonas tropicales del Perú como la Amazonía, principalmente el departamento de Loreto el cual tiene 31678 casos reportados por Malaria a la semana 52 del 2024 según el Ministerio de Salud.(Ministerio de Salud - Perú, 2024); representando el 95.33% de los casos reportados en el 2024.

Los esfuerzos de control de la Malaria en el Perú han sido diversos, desde el control de larvas y adultos con insecticidas hasta el uso de medicamentos antimaláricos como la quinina y el artemisinínico. Sin embargo, los insecticidas están generando resistencia en los mosquitos vectores, y de igual manera las drogas utilizadas en el tratamiento de la malaria están generando resistencia y perdiendo su eficacia en el tratamiento, debido al desarrollo de resistencia por parte del parásito.(Rosas-Aguirre et al., 2016)

El departamento de Lima es una ciudad megaurbana teniendo como población actual más de 9 millones y medio de habitantes al 2025 según el Instituto Nacional de Estadística e Informática. El departamento de Lima cuenta con cuencas ribereñas principales como el río Lurín, Mala, Cañete, Rímac y Chillón, los cuales favorecen el desarrollo de mosquitos *Anopheles*, ya que esa especie de mosquitos se ubican en las zonas ribereñas, cálidas con presencia de vegetación, así como la presencia de zonas agropecuarias(Motta-Yanac et al., 2025). La presencia o mayor proliferación

de mosquitos *Anopheles* en dichas zonas son las temporadas donde baja el caudal del agua en los ríos, en el rango de meses de marzo a junio.

En el 2007 se detectó una persona con síntomas de Malaria, el cual fue transferido al Hospital Hipólito Unanue donde le diagnosticaron *Plasmodium vivax*, un hombre de 20 años del distrito de la Molina; sin antecedente de viaje a zonas endémicas de Malaria. En base al diagnóstico identificado se realizó una alerta epidemiológica por parte de la Dirección de Salud IV Lima Este. Se realizó una inspección de 300 viviendas en la zona de la Planicie, se detectó larvas y pupas de *Anopheles pseudopunctipennis* en piscinas de una densidad larvaria de 1 larva por cucharón. (Arróspide et al., 2007)

Las zonas donde se ha detectado a lo largo de la historia la infección de Malaria por *Plasmodium vivax*, ha sido Santa Eulalia, Ate, La Molina, Huachipa, Campoy y Pro; así como otras zonas aledañas a las zonas ribereñas del departamento de Lima (Arróspide et al., 2007; Legua L & Pedro, 2013).

La Malaria en el Perú, actualmente sigue siendo una preocupación de salud pública no solo en las zonas endémicas sino, también en las zonas costeras por la presencia de *Anopheles pseudopunctipennis*, por lo que se debe mantener una vigilancia entomológica por el movimiento migratorio de personas de las zonas endémicas.

Taxonomía

El conocimiento de la taxonomía de los vectores es de vital importancia puesto que, permite la identificación de las especies encontradas. Los *Anopheles* se encuentran bajo el orden Díptera (insectos con dos alas), familia *Culicidae*, subfamilia *Anophelino* y género *Anopheles*, los subgéneros *Anopheles* (especie ejemplo *An.*

pseudopunctipennis) y *Nyssorhynchus* (especie ejemplo *An. darlingi*); son holometábolos es decir tienen estadios de huevo, larva, pupa y adulto. Los mosquitos adultos pueden ser identificados por las escamas en las alas, venas, cabeza, piernas, tórax y abdomen, a la vez como por la longitud de la probóscide y los palpos, así como las características de la venación de las alas etc. ver figura 2. El subgénero *Anopheles* con 183 especies es representado con 29 especies en el neotrópico entre otras especies descubiertas por Bourke, un grupo de 23 especies fueron encontrados en América del Sur, (Sallum et al., 2020a) por ejemplo *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles darlingi*, entre otros.

Para una identificación eficiente de las posibles especies de anophelinos a las que nos podemos enfrentar, existe un trabajo de investigación que sirve como guía; es un trabajo realizado sobre anophelinos en América Central (Illustrated key to the female anopheline mosquitoes of Central America and Mexico) (Wilkerson et al., 1990) con *Anopheles* de América Central.

La taxonomía de las larvas varía de acuerdo al tipo de especies de mosquitos; por ejemplo, la forma de ubicación en la superficie del agua; los anophelinos se sitúan en paralelo a la superficie del agua a diferencia de los *Culex sp.* y *Aedes sp.* que tienen una posición de aproximadamente 45 ° con respecto a la superficie del agua. Otra característica importante es el tubo respiratorio o sifón, cuya presencia varía de acuerdo a la especie de mosquito ver figura 4; en la figura 5 se detallan las

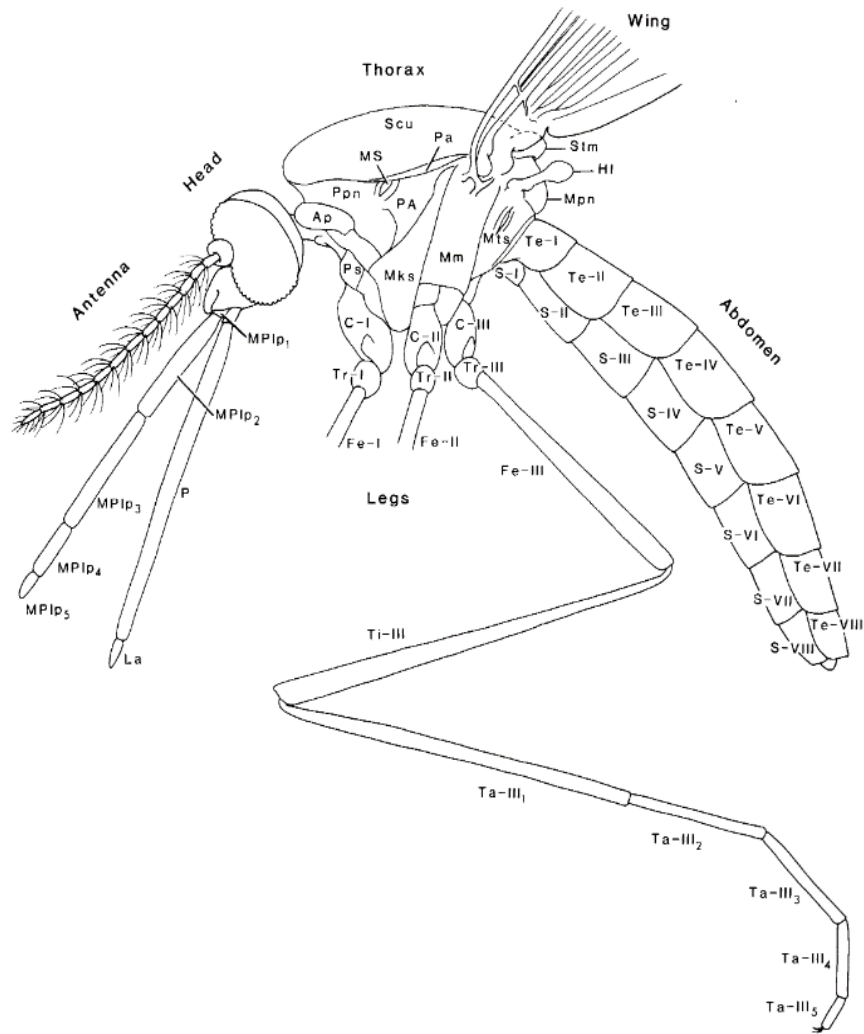


Figura 3: Mosquito *Anopheles* hembra – características físicas generales (Wilkerson et al., 1990)

características taxonómicas morfológicas relevantes en el estadio larvario.



Figura 4: a) Sifón respiratorio ausente en *Anopheles*, b) Sifón respiratorio presente en *Culex* (González et al., 2016)

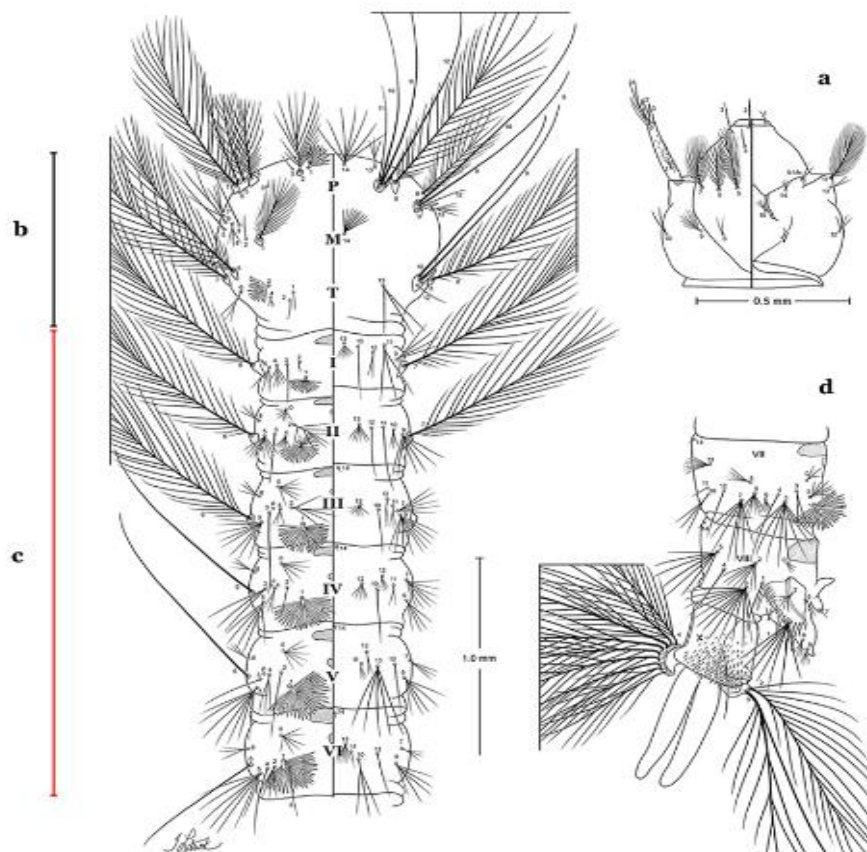


Figura 5: Estadío 4 de una larva de *An. goeldii* a) Cabeza, izquierda aspecto dorsal, derecha, aspecto ventral. b) Torác, izquierda, aspecto dorsal, derecha, aspecto ventral. c) Segmentos del abdomen del I-IV, izquierda aspecto dorsal, derecha, aspecto ventral. d) Aspecto lateral VII- X. (Sallum et al., 2020)

Ciclo de vida de los mosquitos

El mosquito hembra necesita aparearse con el macho para iniciar el ciclo de reproducción; de tal manera que, una vez fecundados los huevos, la hembra tiene un ciclo gonotrópico el cual inicia con la ingesta de sangre y termina con la primera oviposición; después del periodo del ciclo gonotrópico el mosquito hembra oviposita los huevos en una fuente de agua, donde se inicia el periodo de incubación (Clements, 1999). Los huevos después de unos 3-4 días eclosionan pasando al estadio larval, posteriormente a pupa; hasta que finalmente emergen y se convierten en mosquitos adultos, el tiempo de supervivencia es de dos semanas aproximadamente una vez emergidos y esta característica va a depender básicamente del hábitat donde se encuentre y las condiciones geográficas (Clements, 1999; Goindin et al., 2015).

Estudios realizados con *Anopheles coluzzi* y *Anopheles gambiae* con respecto al tiempo de emergencia es decir en convertirse en adultos ha demostrado que la proporción de adultos emergidos depende de la temperatura del hábitat donde se encuentran tanto en hembras como en machos (Zubair et al., 2021).

Paridad, supervivencia, longevidad y capacidad vectorial

Las condiciones óptimas de paridad de mosquitos anophelinos se da a una temperatura ideal de 27° a 28° C, estudios con *Anopheles gambiae* en Baringo County Kenya la temperatura óptima en temporada seca fue de 28.22 +/- 1.1 °C y

temporada húmeda fue de 27.12 +/- 1.2 °C, la proporción de huevos en el primer ciclo gonotrópico fue de 43 % en temporada seca y 64 % a temporada húmeda, la media de duración del ciclo gonotrópico está dentro de 4 a 6 días; en el segundo ciclo gonotrópico disminuye la proporción de huevos (Mala et al., 2014). Otros estudios realizados en la Libertad – Perú donde uno de los objetivos fue hallar el índice de paridad (IP), se midió el índice de paridad en dos temporadas; temporada seca de junio a diciembre y temporada húmeda solo trabajaron el mes de marzo, en ambas temporadas obtuvieron el 60 % de índice de paridad en especímenes de *An. pseudopuctipennis* y *An. Calderoni* (Carmen Cruz G1, 2004).

La sobrevivencia de los mosquitos *Anopheles* depende de las características de su hábitat así como la temperatura, humedad, precipitaciones; así como otros factores específicos a las especies de anophelinos, por ejemplo el tiempo de supervivencia en *Anopheles gambiae* de acuerdo a los estudios realizados en Kenia occidental demostró que la temperatura óptima de sobrevivencia es de 27°C en mosquitos adultos y un tiempo de sobrevivencia de entre 30 a 33 días aproximadamente (Christiansen-Jucht et al., 2014).

“La tasa de sobrevivencia de los mosquitos adultos o la longevidad es un componente muy influyente de los modelos de población de mosquitos y las ecuaciones de capacidad vectorial dada su relación con el tiempo promedio de paridad, tasa de picadura, así como la interacción con el virus en el caso de los *Aedes aegypti* y periodos de incubación extrínsecos (EIP)” (Goindin et al., 2015).

La sobrevivencia, longevidad en los machos, la capacidad vectorial y la paridad en las hembras va a depender también de la dieta que encuentran en su hábitat; ya que

por medio de la dieta los mosquitos ingieren fuentes de carbohidratos, proteínas, ácidos grasos entre otras fuentes de energía para su desarrollo durante su ciclo de vida y su capacidad de realizar trabajo (Stone et al., 2012).

Alimentación de mosquitos adultos y mecanismos de alimentación

La alimentación de los mosquitos vectores del orden de los culícidos tiene un impacto e importancia puesto que, ellos requieren de energía para cumplir sus funciones fisiológicas, tanto los mosquitos adultos machos como las hembras se alimentan de las diversas fuentes de néctares florales, extra florales, gotas de miel y de las gotas de azúcares encontrados en los frutos maduros encontrados dentro de su hábitat (Gary & Foster, 2001). En el caso de las hembras independientemente de la fuente de azúcares que requieren como energía; tienen otro requerimiento de alimentación como son los aminoácidos los cuáles son encontrados en la sangre de su hospedero; la ingesta de sangre es requerido para el desarrollo del ovario y la producción de huevos (Chisulumi et al., 2022); así como la fuente de energía complementando a la ingesta de azúcares (Urbaneja-Bernat et al., 2020). La fuente principal de azúcares encontrados en las plantas es los mono- y disacáridos, además de aminoácidos en baja proporción lo cual no es suficiente para la producción de huevos de los mosquitos hembra (Chisulumi et al., 2022).

Conocer la preferencia alimenticia de las diferentes especies de mosquitos vectores, es de vital importancia en el estudio de la dieta, ya que esto depende del tipo de especie de mosquito, el hábitat y la estacionalidad; los mosquitos pueden discriminar entre plantas con alta o baja calidad de azúcares; así como aquellas plantas que les pueden proveer de lípidos y proteínas, la mayoría de las especies

buscan fuentes de plantas que contribuyan con su sobrevivencia. Ver figura 6 y tabla 1.

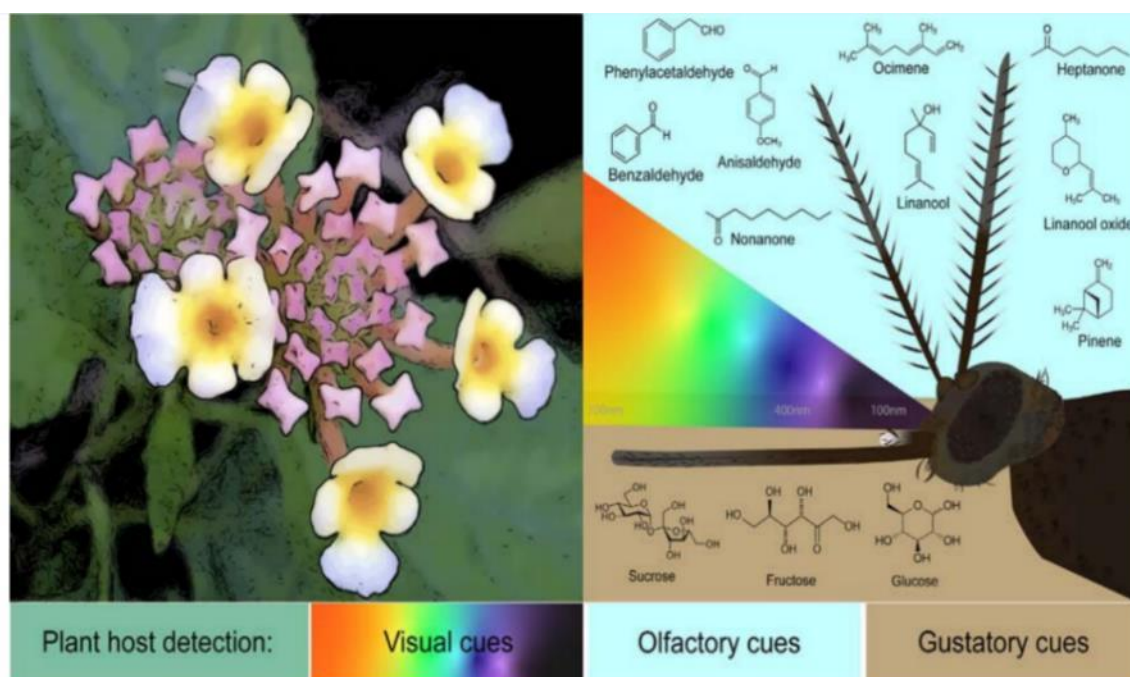


Figura 6: Atracción multimodal de mosquitos a fuentes de néctares. (Barredo & DeGennaro, 2020)

Tabla 1: Plantas que atraen diferentes especies de mosquitos en el laboratorio y trampas de campo (Barredo & DeGennaro, 2020).

Especie de mosquito	Fuente de néctar	Ensayo	Ratio de atracción
<i>Aedes aegypti</i>	Extracto de la planta <i>Asclepias syriaca</i> (algodoncillo)	Cámara de sondeo de dos opciones. Mosquito hembra	30–50% de hembras adultas de 6–7-días analizadas con el extracto.

	Plantas vivas de <i>Impatiens walleriana</i>	Ensayo de competencia de plantas. Plantas en macetas con néctar teñido.	Entre el 80% y 90% de los mosquitos de ambos sexos consumen néctar de esta planta.
<i>Anopheles gambiae</i>	Plantas vivas de <i>Mangifera indica</i> , <i>Delonix regia</i>	Olfatómetro en forma de Y, machos de 2 a 3 días de emergidos.	El 80% de los mosquitos eligieron cualquiera de estas plantas en lugar de otras analizadas.
	Plantas vivas de <i>Parthenium hysterophorus</i>	Olfatómetro de doble puerto con mosquitos hembra de 2 a 3 días de emergidos.	~30% eligió estas plantas, o que es estadísticamente significativo al competir con el grass control.
	<i>Acacia macrostachya</i> , <i>Acacia albida</i>	Trampas de campo en Mali, África.	Índice de atracción N10 medido por la proporción de mosquitos capturados en las trampas de prueba en comparación con las trampas control.
<i>Culex pipiens</i>	Flor viva, extracto y mezcla sintética de <i>A.syriaca</i> (algodoncillo)	Olfatómetro de vuelo de dos puertos. Grabado por vídeo infrarrojo.	67% respuesta de atracción para la flor viva, 52% para la flor, y 48% para la mezcla sintética.
	<i>I. walleriana</i>	Inhibición de néctar de plantas.	80–95% de los mosquitos consumieron

		Plantas en macetas con néctar teñido.	néctar de esta planta en comparación con otras opciones.
<i>Culex pipiens pallens</i>	<i>Ligustrum quihoui</i> (ligustro de hoja cerosa), <i>Broussonetia papyrifera</i> (morera de papel)	Trampas adhesivas de laboratorio.	~31–45% tasa de captura machos y hembras.
	<i>L. quihoui</i> , <i>Abelia chinensis</i> , <i>Nerium indicum</i>	Olfatómetro en forma de Y de doble opción.	Las tres plantas atrajeron >55% de los mosquitos cuando se probaron contra Blank . <i>L. quihoui</i> fue significativamente preferido.



Figura 7: Como la presencia de fuentes de néctares puede afectar la salud del humano. (Barredo & DeGennaro, 2020).

La relación entre el mosquito vector, el hospedero humano o las plantas va a depender mucho del tipo de especie, por ejemplo, al *An. sergentii* hembra se le ha encontrado en mayor cantidad en lugares con néctares ricos en azúcar; en otras especies como los *Ae. aegypti* o *An. gambiae* cuando se les ha privado de azúcar incrementan su alimentación con fuente de sangre (Barredo & DeGennaro, 2020). Se podría presumir que la densidad de mosquitos incrementa en un hábitat que dependerá de la estación, temperatura, humedad; además de tipo de especie, las diferentes fuentes de plantas ricas o pobres en azúcares a las que tienen fácil acceso, así como la necesidad de dieta que tiene el mosquito y la presencia de población humana, ver figura 7 (Barredo & DeGennaro, 2020).

La identificación de la preferencia alimenticia de los mosquitos vectores es una alternativa en la elaboración de trampas; en el caso de los machos se reduciría su potencial de apareamiento y en las hembras en parte se desviará la preferencia hacia el hospedero humano hacia una fuente con azúcares, proteínas vegetales, lípidos entre otros compuestos identificados (Chen et al., 2014; Fiorenzano et al., 2017).

Resistencia a pesticidas

El uso continuo de diversos pesticidas para el control de plagas en la agricultura y control vectorial de diversas especies de mosquitos vectores causantes de diversas enfermedades como la Malaria, Dengue, Chikunguya, Zika, Fiebre amarilla y Virus del Nilo Occidental, está ocasionando resistencia a pesticidas en sitios diana encargados de la detoxificación; como las enzimas glutatión S-transferasas (GSTs), el citocromo p450s, acetilcolinesterasa-1 (Acl1); así como a nivel del sistema

nervioso conocido como kdr (knockdown resistance) y el canal de sodio (Gan et al., 2021; Meier et al., 2022; Oliver & Brooke, 2016; Pinto et al., 2019).

Los principales compuestos químicos utilizados como insecticidas son los Organofostatos, Carbamatos, Organocloruros, Piretroides, estos insecticidas están desarrollando diferentes mecanismos de resistencia a nivel de las enzimas de detoxificación, el sistema nervioso y canal de sodio en los mosquitos de diferentes especies como los *Anopheles sp.* y *Aedes sp.* (Enayati et al., 2020; Gan et al., 2021).

En nuestros estudios sobre la dieta nectarívora de los *Culex pipiens* en la ciudad de Amberes Bélgica, se identificó herbicidas, fungicidas y bactericidas en mosquitos colectados en campo así como en los mosquitos alimentados con flores de uso común en las viviendas; concluyendo que los compuestos químicos encontrados en las flores podrían estar desarrollando en los mosquitos cierto grado de resistencia a pesticidas; ocasionando así un problema de control vectorial de diversas especies de mosquitos (Leyva et al., 2023).

Metabolomas

Metabolomas en la biología es el estudio del repertorio entero de metabolitos del sistema biológico. Este repertorio consiste en muchas clases diferentes de moléculas pequeñas incluyendo azúcares, aminoácidos, ácidos grasos. Estas moléculas pequeñas realizan funciones críticas como el almacenamiento de energía, señal de traducción, mantenimiento de la estructura celular, y la regulación de la expresión de genes; por lo que podemos denominarlos agentes funcionales del metabolismo (Lakshmanan et al., 2011). En base a diversos estudios realizados; el metaboloma ha sido definido como un grupo de compuestos químicos con una masa

menor a ($<1,500$ Da), este sistema de identificación de metabolomas permite realizar un perfil de aquellas muestras que son objeto de estudio; el estudio de los perfiles metabolómicos es una herramienta el cual permite la asociación con estudios de las otras ómicas (genoma, transcriptoma, proteoma). El metaboloma también es definido como el conjunto de compuestos químicos derivados de la actividad biológica intracelular; como por ejemplo los compuestos formados en las vías metabólicas propias de cada organismo. El perfil metabolómico es susceptible a cambios que pueden ser generados por el hábitat, factores genéticos, factores ambientales, patologías al que es sometido el organismo en estudio; la disminución o incremento de fuentes de alimentación de los vectores podría determinar el aumento o disminución de la población de vectores; por lo mismo afectar la salud del hospedero, es por ello la importancia del estudio metabolómico e identificación del vector y las fuentes de alimentación de su hábitat (Chabanol et al., 2020a; Yu et al., 2021).

Entometabolómica, se denomina al estudio dirigido de diversas especies de insectos, este campo fue iniciado en 1990 con el estudio del perfil metabolómico en larvas, el uso de la Entometabolómica dentro del campo entomológico ha permitido revelar información bioquímica el cual ayuda al entendimiento de la fisiología y comportamiento del vector (Snart et al., 2015). El uso de nuevas tecnologías de alta eficiencia permite el reconocimiento y el análisis de perfiles metabolómicos completos, así como la variación de estos al ser sometidos a cambios fisiológicos productos de muchos factores mencionados líneas arriba (Snart et al., 2015). Entometabolómica ha contribuido con el estudio de muchos tópicos en diferentes especies de mosquitos vectores, como estudios de la composición de la dieta del

vector, el efecto del metabolismo, mecanismos de resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, tratamiento antibiótico frente a la microbiota en *Anopheles coluzzi*, el análisis del metaboloma de *Anopheles gambiae* después de la exposición a *Mycobacterium ulcerans* (Chabanol et al., 2020a; Hoxmeier et al., 2015a; Pareja-Loaiza et al., 2020; Snart et al., 2015); en base a estos estudios se ha ido construyendo una base de datos de metabolomas e indirectamente se ha ido construyendo datos del comportamiento de interacción insecto – plantas (Snart et al., 2015); así como el entendimiento de vías metabólicas de los mosquitos (Tevatiya et al., 2020).

Sin embargo, aún existe vacíos de conocimiento respecto a la variación del perfil metabolómico en *Anopheles pseudopunctipennis*, lo que justifica la necesidad de aplicar este enfoque en el presente estudio.

Análisis de datos

El MZ mine es un software que permite el análisis diferencial de los espectros obtenido por el LC/MS; es decir el análisis la visualización de datos, así como la intensidad del espectro, detección del pico, alineamiento y normalización; el software es libre y disponible para el público en general ver figura 8 (Katajamaa & Orešič, 2005).

La herramienta comúnmente usada para el análisis de datos es el análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante de componentes principales (PCDA), mínimos cuadrados parciales (PLS) o análisis discriminante de mínimos

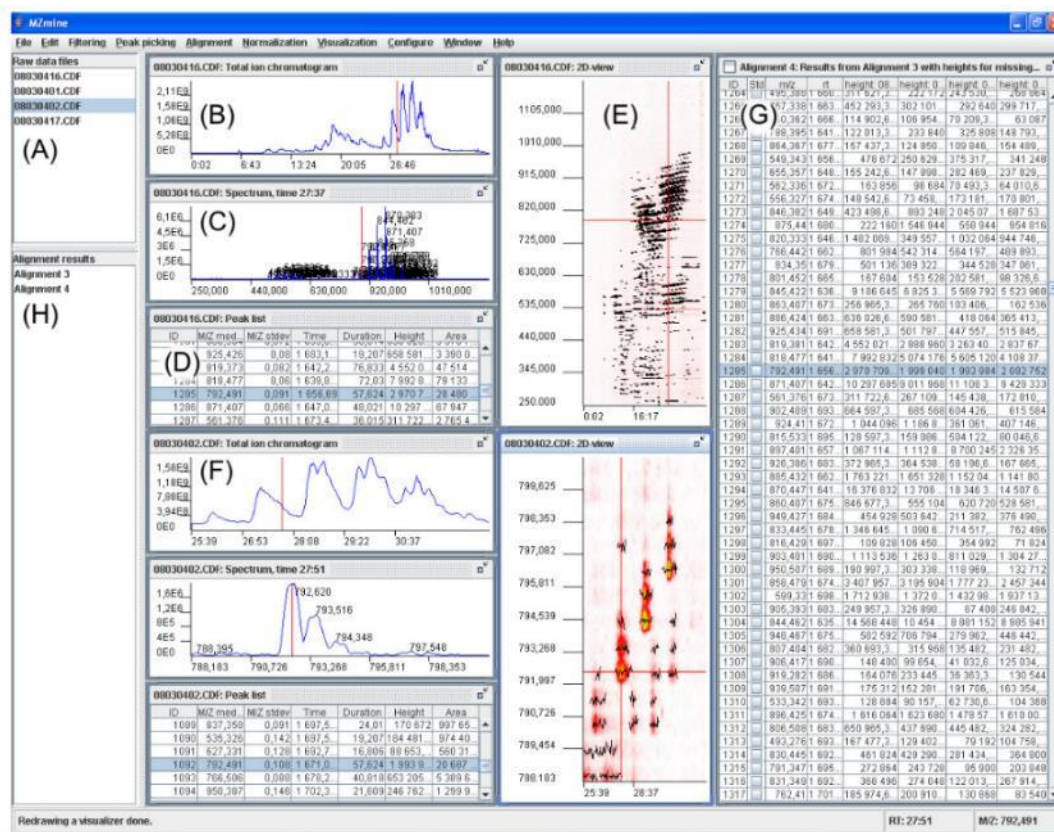
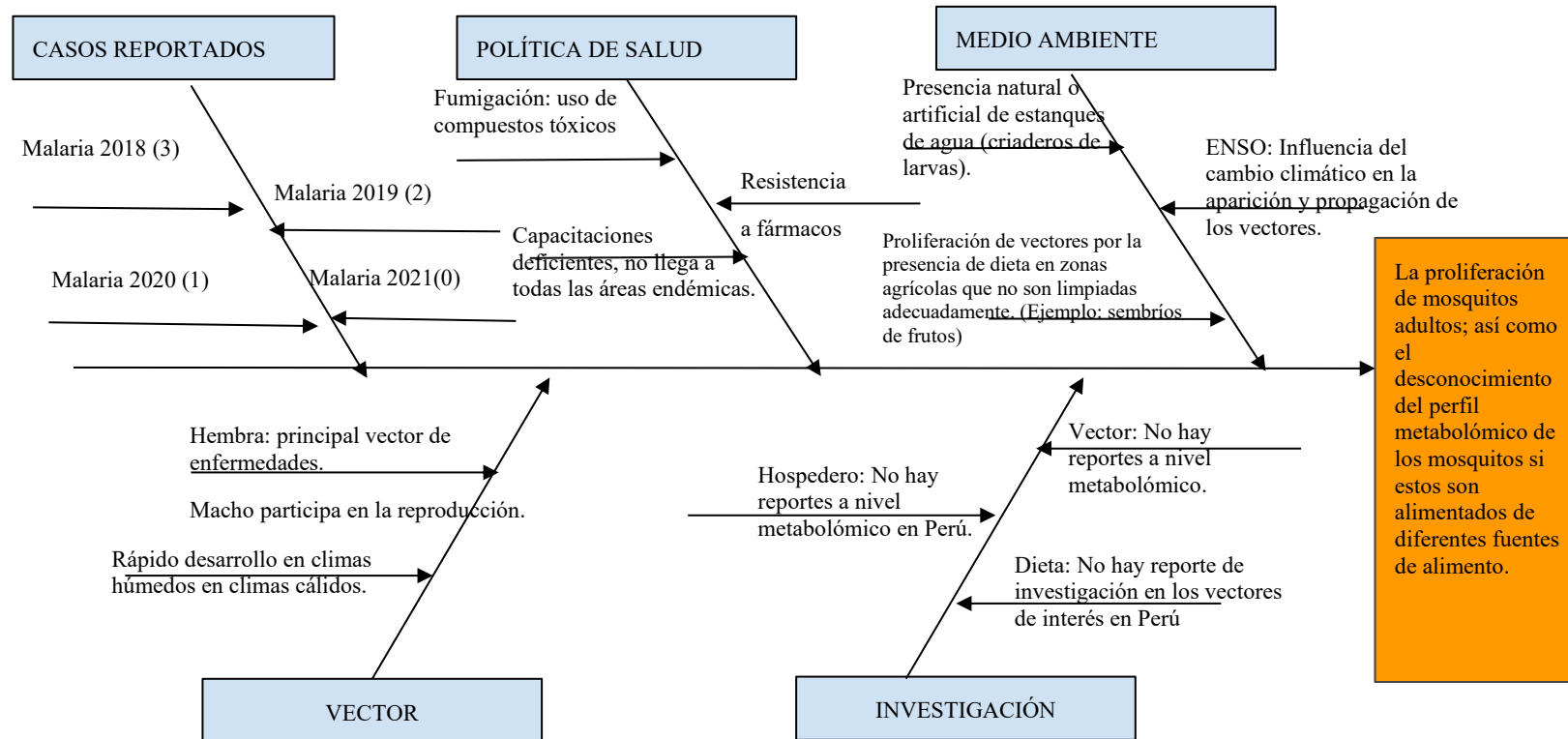


Figura 8: Interfaz gráfica del usuario Mz mine (Katajamaa & Orešič, 2005) .

cuadrados parciales. El PCA permite trazar, visualizar y agrupar múltiples conjuntos de datos metabólicos basados en combinaciones lineales de características correlacionadas entre sí. El PCA analiza la clasificación y discriminación de un grupo de datos muy grandes con una cantidad muestras muy pequeñas; y el PLSDA “clasifica los datos en dos bloques, un que representa la variación entre clases y el otro que representa la variación dentro de la clase” (Lakshmanan et al., 2011). Otros software o plataforma libre de análisis es el XCMS, permite el procesamiento de datos, es una plataforma que integra análisis de datos estadísticos y cuantitativos que facilita el uso traslacional cooperativo de la espectroscopia de masas; por otro lado, permite la integración de datos proteómicos y metabólicos; es decir analiza las rutas directamente a partir de sus

datos metabolómicos. El R o Rstudio es un software de análisis estadístico que soporta paquetes bioinformáticos como el XCMS el cual se corre en R, para usar el poder de análisis estadístico de este software (Gowda et al., 2014, Parker et al., 2023). El GNPS (Global Natural Product Social) Molecular Networking es una plataforma online, utilizada para el análisis de datos de espectroscopía de masas. Esta plataforma permite la identificación, comparación y construcción de redes moleculares de compuestos químicos naturales. Utiliza una red social lo cual son datos compartidos de la comunidad científica. Es una plataforma libre donde los investigadores pueden compartir sus datos. Esta plataforma está vinculada con el Cytoscape el cual permite una visualización dinámica y análisis de las redes moleculares.

3. Planteamiento del problema



4. Justificación del estudio

En base al principal problema identificado el cual es la proliferación de zancudos *Anopheles* y el desconocimiento de la variación del perfil metabolómico de los anophelinos alimentados con plantas ubicadas cerca de su sitio de oviposición en comparación con los mosquitos alimentados libremente en campo; conjuntamente con las diferentes causas y efectos como una deficiente política de salud por el uso de insumos químicos tóxicos utilizados como larvicidas y adulticidas en las actividades de fumigación(Palomino, 2018), la falta de investigación del hábitat y el metabolismo de los mosquitos, es que se ha visto conveniente el estudio del perfil metabolómico del buche de los mosquitos de la especie *Anopheles* causantes de la malaria. Identificar estos cambios del perfil metabolómico, permitiría conocer la ecología química, el comportamiento y estudios posteriores de sus redes moleculares.

El metabolismo del vector influye en la supervivencia, mayor capacidad vectorial y una eficiente capacidad de desarrollo embrionario y reproducción de los mosquitos *Anopheles* los cuales son estudiados e investigados hasta la actualidad. El metabolismo del vector y su evolución a través del tiempo tienen como posible consecuencia un incremento de la resistencia a los diferentes pesticidas que se emplean actualmente para el control de plagas particularmente cuando las condiciones ambientales, como la temperatura, disponibilidad de una dieta rica en nutrientes les proveen suficientes recursos para su reproducción (Pareja-Loaiza et al., 2020), de esta manera la capacidad de los vectores para sobrevivir y reproducirse mejoraría el fitness (Ginnobili, 2013).

La caracterización del perfil metabolómico del buche de los mosquitos de campo y mosquitos evaluados a nivel laboratorio con los néctares florales de las plantas; nos permitirá identificar los diferentes metabolitos con la finalidad de construir una librería de datos metabolómicos de los mosquitos *Anopheles* identificados en campo.

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿En mosquitos, *An. pseudopunctipennis* la alimentación con plantas colectadas cerca de su sitio de oviposición genera diferencias en el perfil metabolómico de aquellos comparados con mosquitos *An. pseudopunctipennis* alimentados por elección libre en campo?

III. HIPÓTESIS

El perfil metabolómico de la dieta de los *An. pseudopunctipennis* alimentados con plantas colectadas cerca de su sitio de oviposición se diferencia de aquellos alimentados por elección libre en campo.

IV. OBJETIVOS

General

Identificar la composición metabólica de la dieta nectarívora de los mosquitos *An. pseudopunctipennis*.

Específicos

- Identificar taxonómicamente especies de *Anopheles* spp. encontrados en el departamento de Lima, específicamente en las zonas peri-urbanas/rurales

costeras a la rivera de los ríos Lurín (Cieneguilla y Pachacamac), río Mala (Calango y Mala) y río Cañete (Lunahuaná y Cañete).

- Realizar bioensayos con las plantas propias de su hábitat.
- Realizar el análisis químico instrumental de los metabolitos encontrados en el buche de los mosquitos colectados en campo y alimentados con plantas colectadas en campo.
- Analizar las bases de datos obtenidas de los perfiles y evaluar los metabolitos targets para estudios posteriores.

V. METODOLOGÍA

Colecta de larvas y mosquitos en campo

Se estableció las zonas de colecta en cada lugar seleccionado de acuerdo a la tabla 1 de anexos, realizando un sondeo y verificación de cada punto donde se haya encontrado criaderos de larvas (ver figura 10 A), se procedió a la colecta en cada punto identificado como sitio de oviposición utilizando el método del cucharón siendo transferidos a los tubos eppendorf de 50 ml, para su posterior traslado al

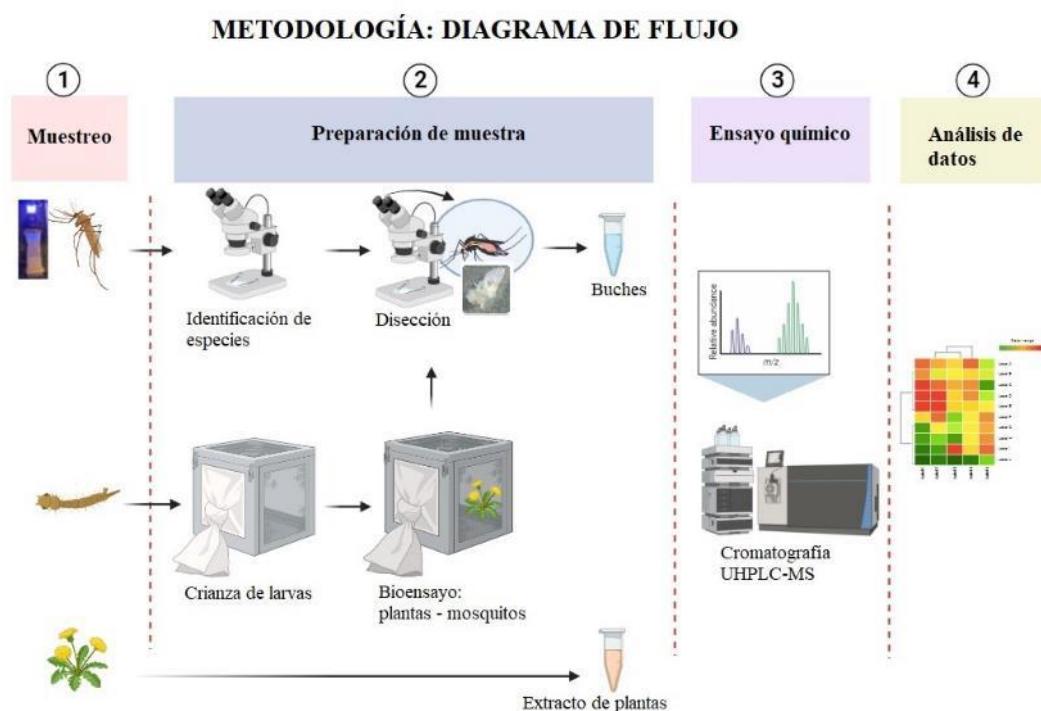


Figura 9: Diagrama de flujo del análisis metabolómico: 1) colecta de campo de mosquitos adultos, larvas y flores. 2) preparación de muestra: identificación de especies, disección de las muestras colectadas en campo y bioensayo; así como extracción metanólica del contenido estomacal y flores. 3) Ensayo químico instrumental por UHPLC-MS de las muestras extraídas. 4) Análisis estadístico de datos.

insectario de Santa María – de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – UPOCH para establecer la colonia para los bioensayos con plantas.

La colecta de mosquitos adultos se realizó con las trampas CDC con luz UV conectada a un colector de plástico con un ventilador para generar presión y evitar la pérdida de los mosquitos colectados (ver figura 10 B), las trampas fueron ubicadas cerca de los sitios de oviposición; iniciando la colecta 6:00 pm y siendo verificada la trampa cada hora hasta las 6:00 am. Los mosquitos de interés fueron

guardados en un contenedor con tapa y conservados en frío, los demás especímenes fueron regresados a su hábitat natural.

Identificación de especies y disección de mosquitos adultos

Los mosquitos adultos colectados fueron identificados morfológica y taxonómicamente siguiendo guías y artículos científicos de morfología (Sallum et

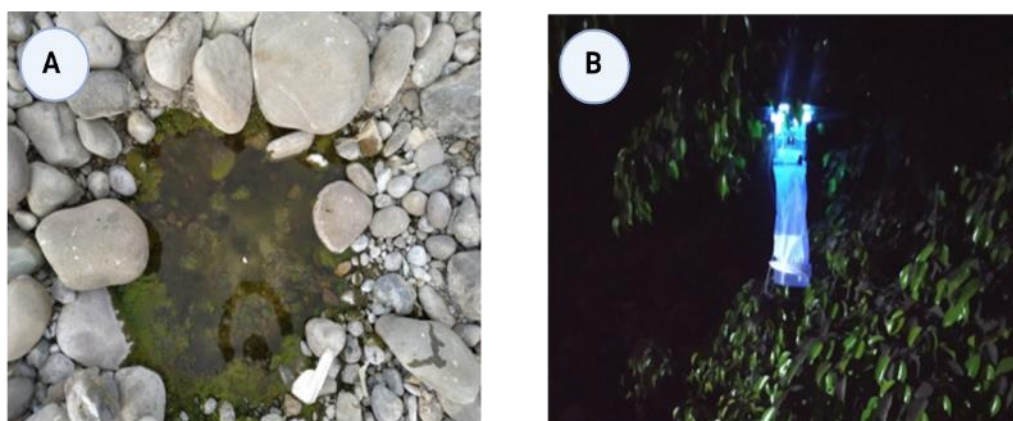


Figura 10: A) Sitios de oviposición; B) Colecta de adultos con trampas CDC con luz UV.

al., 2020a, 2020b; Wilkerson et al., n.d., 1990). Después de identificar las especies se procedió a la disección del buche *in situ* (Coleman et al., 2007), se extrajo el contenido estomacal bajo el estereoscopio (Amscope, USA) con una aguja hipodérmica, pinzas y una pipeta de 10 ul; el contenido estomacal fue transferido a 200 ul de metanol grado LC para su conservación a -20°C hasta su respectivo análisis por UHPLC-MS.

Establecimiento de la colonia y crianza a nivel laboratorio

- Las larvas colectadas en campo fueron colocadas en recipientes con agua mineral alimentadas con alimento para peces.
- Las condiciones de crianza de larvas y mosquitos adultos son las siguientes: (Emidi et al., 2017) (Mereta et al., 2013)
 - Temperatura: 25 +/- 2°C

- Humedad de 80%
 - Fotociclo: 12 H oscuridad: 12 H luz
 - pH del agua: 7 -8
 - Conductividad: 100 - 160 uS
 - TDS (mg/L) 70.5 - 112
 - Turbidez: agua clara 5 NTU
 - Tipo de agua: desionizada o mineral
- Las pupas fueron separadas en recipientes con las mismas características del agua de las larvas y colocadas en jaulas de 30 x 30 x 30cm (Birnberg et al., 2020)
 - Cuando llegaron a su estadio adulto se realizó la identificación de especies. (Sallum et al., 2020b; Wilkerson et al., 1990)
 - Los especímenes de interés encontrados fueron seleccionados y alimentados con sacarosa al 10%. (*Infection of Laboratory-Colonized Anopheles Darlingi Mosquitoes by Plasmodium Vivax*, 2014)
 - Se realizó los bioensayos con las cinco plantas colectadas en campo, las cuáles fueron seleccionadas como candidatas (ver tabla 2) se colocaron las 5 plantas en 5 jaulas diferentes con las siguientes dimensiones (30 x 30 x 30); posteriormente se introdujo a los mosquitos adultos machos y hembras los

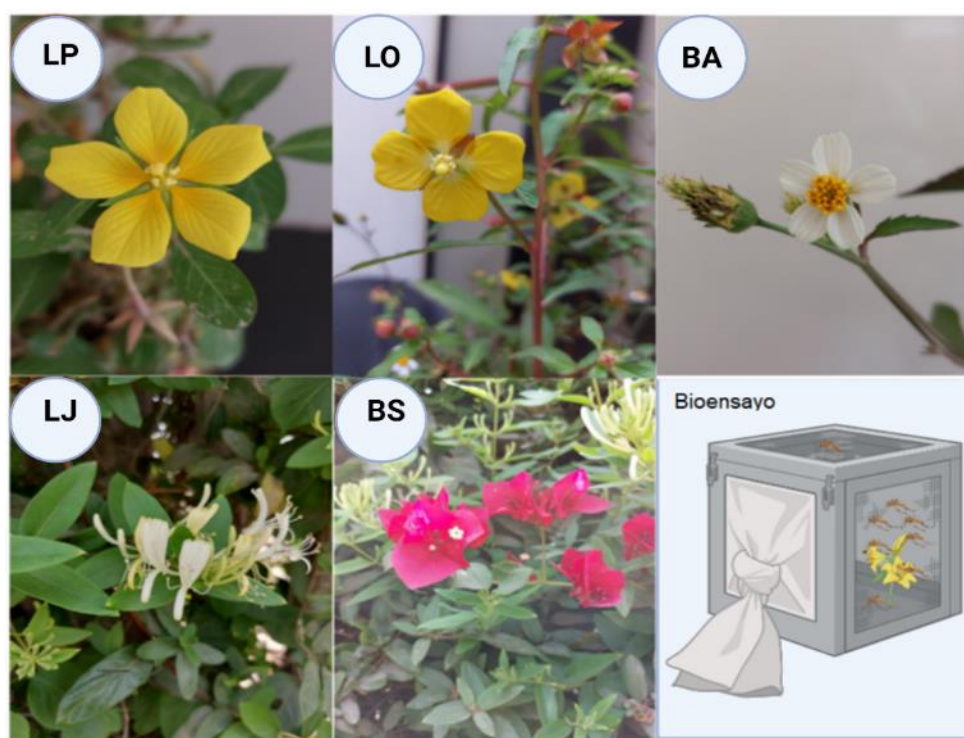


Figura 11: Bioensayo con plantas colectadas en campo. Los mosquitos adultos criados en el insectario son alimentados con las plantas colectadas en campo (LP *Ludwigia peploides*, LO *Ludwigia octovalvis*, BA *Bidens alba*, LJ *Lonicera japonica* y BS *Bougainvillea spectabilis*).

cuáles se dejó sin alimento de sacarosa al 10% por 24 horas, para luego se alimenten de las plantas por un periodo de 24 horas. (ver figura 11) (Sissoko et al., 2019).

Los mosquitos fueron anestesiados sobre hielo seco (ver figura 12 A) y se procedió a diseccionar el buche para obtener el contenido estomacal (ver figura 12B y 12C) para su posterior análisis por la técnica del UHPLC-MS (Schäfer et al., 2016)

Tabla 2: Plantas colectadas en campo para los bioensayos con mosquitos.

			Número de mosquitos por jaula	
Código	Especie de la planta	Número de Jaula	Hembras	Machos
LP	<i>Ludwigia peploides</i>	1	25	25
LO	<i>Ludwigia octovalvis</i>	2	25	25
BA	<i>Bidens alba</i>	3	25	25
LJ	<i>Lonicera japónica</i>	4	25	25
BE	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	5	25	25

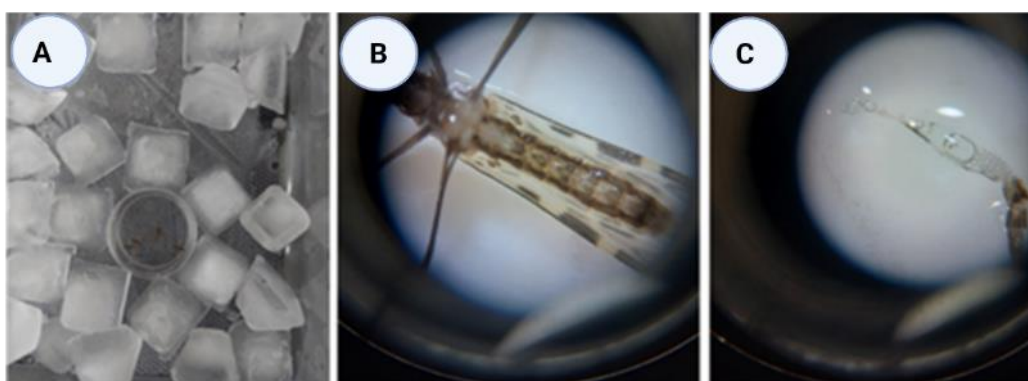


Figura 12: A) anestesiado de mosquitos adultos, B) posicionamiento sobre el estereoscopio C) extracción del buche

Preparación de muestras para análisis por UHPLC-MS

Los contenidos estomacales de las muestras de bioensayo y muestras colectadas en campo fueron conservados previamente en metanol y congelados a -20°C ; descongelados y diluidos con acetonitrilo (2:1); posteriormente se procedió a homogeneizar las muestras, centrifugar a 14 000 rpm a 4°C por 15 min, finalmente se filtró el sobrenadante de cada muestra con filtros PVDF (polifluoruro de vinilideno) de 0,22 μm y se transfirió a los insertos de 200ul los cuáles fueron colocados en los viales con tapa septa para proceder con el análisis en el UHPLC-

MS. De la misma forma se procedió para los controles (Chabanol et al., 2020b). Las flores, polen y néctares de las plantas fueron extraídas y transferidas a un tubo eppendorf de 500 ul la cantidad de 100 mg aproximadamente, posteriormente se añadió metanol grado LC, agua ultrapura y ácido fórmico grado LC en la proporción de 15:4:1 (v/v/v), se dejó por 24 horas y se procedió a realizar una dilución de (100x) para luego ser analizados por UHPLC-MS (Schäfer et al., 2016). El control de calidad QCmix mezcla de tres azúcares, glucosa, fructosa y sacarosa se diluyó en agua ultrapura en una concentración de 100 ppb de glucosa, 100 ppb de fructosa y 50 ppb de sacarosa.

Adquisición de datos

El análisis de muestras se realizó con el equipo UHPLC-MS Dionex Ultimate 3000 /Q Exactive Plus Thermo Scientific, la metodología del grupo de analitos que deseamos encontrar fue establecidos según Schafer (Schäfer et al., 2016), dentro de los parámetros generales (CE10, Spray neg (V) 4000, Cone gas 35/350°C, Probe gas 60/500°C, Nebulizer gas 60. (19). Modo isocrático, columna NH₂ amino, temperatura de columna 35 °C, flujo 1 ml/min, volumen de inyección 20 ul, solvente acetonitrilo/agua CH₃CN/H₂O y ácido fórmico (HCOOH) (Parker et al., 2023; Schäfer et al., 2016).

Análisis de datos metabolómicos

La composición de azúcares y metabolitos secundarios resultantes del análisis químico vía UHPLC-MS, fueron analizados empleando el software Xcalibur v.4 (Thermo Fisher Scientific, 2013); XCMS versión 3.7.1 para la identificación de picos, tiempo de retención, alineamiento, matching de picos, intensidad de picos. La identificación de metabolitos se realizó con la base de datos Metlin incluido en

el XCMS (Gowda et al., 2014; Katajamaa & Orešič, 2005; Parker et al., 2023). El análisis de redes moleculares se realizó con GPNS (Global natural Products Social Molecular networking); el cual es un web basado en un sistema de espectrometría de masas abierto a la comunidad científica el cual permite procesar datos crudos de espectros y construir redes moleculares; así como también la identificación de metabolitos haciendo un match con la base de datos de su sistema. Cytoscape v3.10.1 el cual también nos permite visualizar redes moleculares y las anotaciones (data informativa de cada metabolito), así como el análisis de la integración de metabolitos y sus interacciones químicas de las redes moleculares.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con diferentes plataformas y/o software como el programa Graphpad prism v10 para el análisis de two way – ANOVA y Tukey para evaluar las medias de los grupos experimentales y comparar entre grupos experimentales para ver si existe o no diferencias significativas entre los mismos tomando como referencia el valor de p. También se usó el software R studio (versión 4.2.0; R core packages) con ggplot2 versión 3.3.6, para evaluar los componentes principales de los diferentes grupos experimentales con respecto a los diferentes metabolitos identificados; finalmente se utilizó Metabo Analyst (versión 5.0) para los análisis de cluster y heatmap de la data de pesticidas identificados.

VI. RESULTADOS

1. Identificación taxonómica de mosquitos adultos

La colecta de los mosquitos adultos se realizó en la rivera de los ríos Mala, Lurín y Cañete en las fechas enero – mayo del 2022 el total de mosquitos adultos colectados

en campo fueron 40; de los cuales se identificaron 29 *An. Pseudopunctipennis* (ver figura 13 A) y 6 *An. albimanus*; una de las

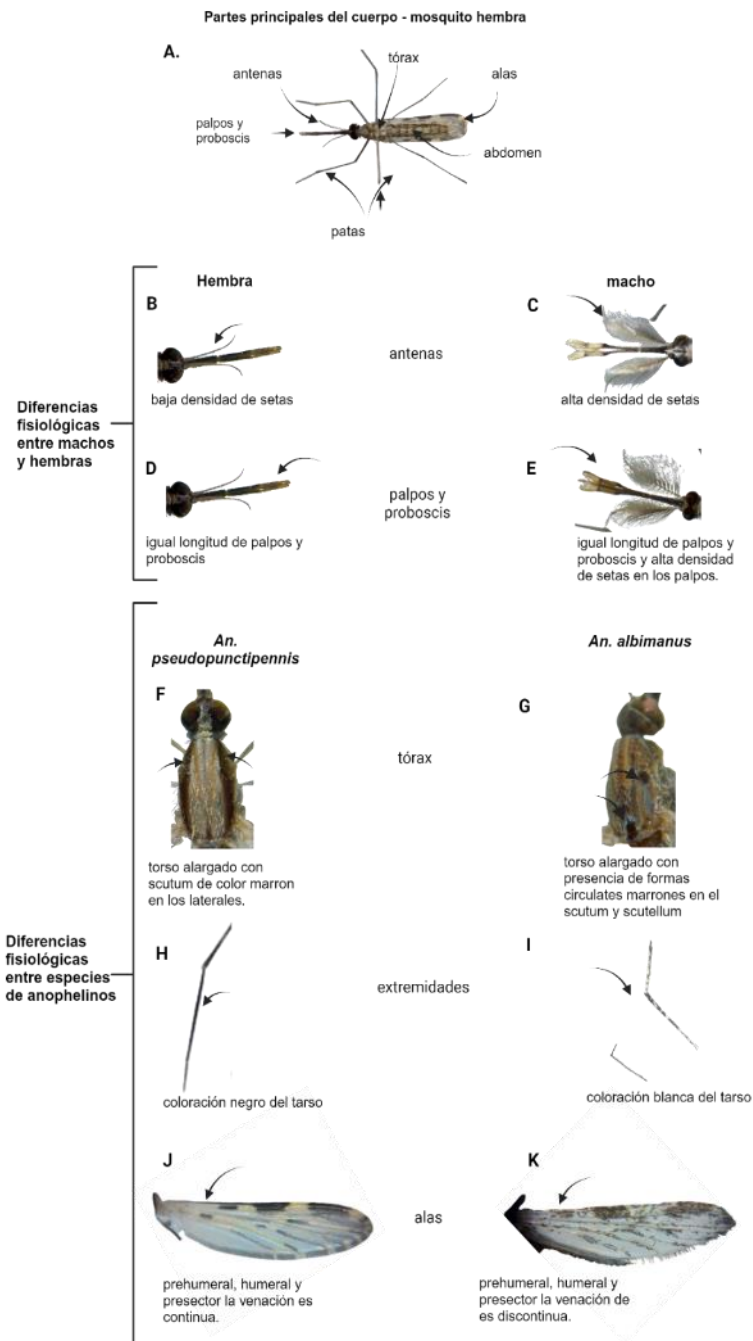


Figura 13: Identificación taxonómica de mosquitos *Anophelinos Anopheles pseudopunctipennis* hembra A, *An. pseudopunctipennis* (F, H y J) y *An. albimanus* (G, I y K).

características para identificar el sexo de los mosquitos es la forma de las antenas, las hembras tienen antenas y palpos con baja densidad de setas y los machos tienen antenas y palpos con alta densidad de setas (ver figura 13 B y 13 C, 13 D y 13 E).

Una característica distintiva que diferencia a los anophelinos de otras especies de mosquitos es la longitud uniforme de la probóscide y los palpos, que se observa en ambas especies (ver Figuras 13 D y 13 E). Además, se destacan notables diferencias en la distribución morfológica, color y escamas tanto en el torso como en el scutum del tórax entre *Anopheles pseudopunctipennis* y *Anopheles albimanus* (ver Figuras 13 F y 13 G). Las extremidades también presentan diferencias morfológicas; por ejemplo, los tarsos distales son de coloración oscura y continua en *Anopheles pseudopunctipennis*, mientras que en *Anopheles albimanus* son de color blanco (ver Figuras 13 H y 13 I). Finalmente, la distribución y coloración de las venas son características que ayudan a determinar taxonómicamente las especies de anophelinos encontradas en nuestra investigación (ver Figuras 13 J y 13 K). Las larvas de mosquitos identificadas en las pozas fueron *Anopheles pseudopunctipennis*, lo que llevó a la decisión de realizar los bioensayos con esta especie.

2. Presencia de azúcares (Sacarosa, fructosa y glucosa) en cada grupo experimental.

Las larvas identificadas en los trabajos de campo fueron los *An. pseudopunctipennis* con los cuáles se realizó los bioensayos cuando llegaron a su estadio de adulto, los mosquitos se alimentaron con plantas colectadas en campo (LP *Ludwigia peploides*, LO *Ludwigia octovalvis*, BA *Bidens alba*, LJ *Lonicera japónica*, BE *Bougainville*

spectabilis). Se realizó la comparación de azúcares encontrados en los buches de mosquitos *An. pseudopunctipennis* adultos colectados en campo y los buches de mosquitos de los bioensayos. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante una prueba ANOVA de dos vías y Tukey con un nivel de significancia del 95%, se observa una diferencia significativa entre las medias de los niveles de azúcares en cada grupo experimental (5 plantas) tanto en sacarosa, fructosa y glucosa (ver figura 14); lo cual se comprueba con el valor de p en sacarosa $< 0,0001$, valor de p en fructosa < 0.0001 y valor de p en la glucosa < 0.0001 , encontrando mayor presencia de glucosa y menor presencia de fructosa en todos los mosquitos alimentados con las 5 diferentes plantas con un valor de p < 0.0001 (ver tabla 3) y (figura 14).

Tabla 3: Resumen de los parámetros ANOVA de dos vías de la presencia de azúcares en los buches de mosquitos.

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor de p
Interacción	403983457250	12	33665288104	F (12, 105) = 26.40	P<0.0001
Factor de fila (azúcares)	310616421932 6	2	15530821096 63	F (2, 105) = 1218	P<0.0001
Factor de columna (plantas)	78568838393	6	13094806399	F (6, 105) = 10.27	P<0.0001
Residuales	133892460921	105	1275166294		

Observamos que existe una diferencia significativa en los niveles de glucosa entre las muestras de MC con respecto a los otros grupos (LP, LO, BA, LJ, BS y QC) los cuáles presentan mayores niveles de glucosa con un valor de p $< 0,0001$. Con respecto a la sacarosa observamos una diferencia en los niveles de sacarosa entre las muestras MC vs LO con un valor de p $< 0,0006$ y MC vs BA con valor de p < 0.0315 , donde MC presenta mayor nivel de sacarosa. En el análisis de fructosa no existe diferencia entre los grupos experimentales sin embargo se observa una

tendencia de mayor cantidad de fructosa en MC. Ver los suplementarios 1 para obtener los datos de Tukey y los valores de p entre todos los grupos.

3. Ensayo de la presencia de fructosa, glucosa y sacarosa por especies de plantas.

Los extractos metanólicos de las plantas (LP, LO, BA, LJ, BS) usados en los bioensayos como alimento de los *An. pseudopunctipennis* fueron analizados por UHPLC-MS y en la figura 15 A podemos observar el nivel de intensidad de los azúcares presentes en cada planta con un análisis de ANOVA de una vía, análisis de comparación post hoc con Tukey y fold change para evaluar el nivel de proporción entre los tres azúcares.

Los resultados obtenidos demuestran una diferencia significativa de los niveles de glucosa, sacarosa y fructosa entre todos los grupos experimentales con un valor de $p < 0.0001$; a la vez indica que no existe diferencia significativa de cada tipo de azúcar para cada planta, ver tabla 4. El análisis de fold change nos muestra la proporción de glucosa y fructosa con respecto a la sacarosa; observando mayores niveles de glucosa que va de 5 a 9 veces más con respecto a la sacarosa ver figura 15 B.

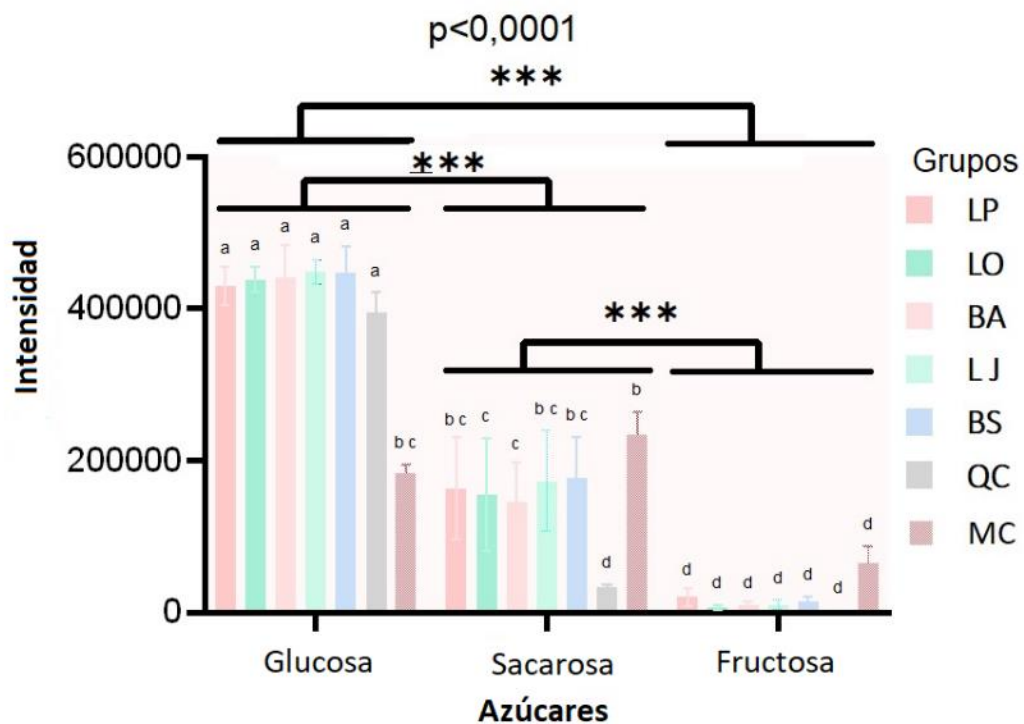


Figura 14: Comparación entre los niveles de azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa) en los buches de mosquitos: Buches de mosquitos alimentados con las plantas colectadas en campo (LP *Ludwigia peploides*, LO *Ludwigia octovalvis*, BA *Bidens alba*, LJ *Lonicera japónica*, BS *Bougainville spectabilis*), MC buches de mosquitos colectadas en campo, QC control de calidad.

Tabla 4: Análisis ANOVA de los niveles de azúcares en los extractos de plantas.

	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor de p
Tratamiento (entre columnas) - Plantas	963499318 6	4	2408748296	F (1.043, 2.086) = 2.454	P=0.2549
Individual (entre filas) Azúcares	5.2086E+1 1	2	2.6043E+11	F (2, 8) = 265.3	P<0.0001
Residuales (aleatorio)	785269927 9	8	981587410		
Total	5.3835E+1 1	14			

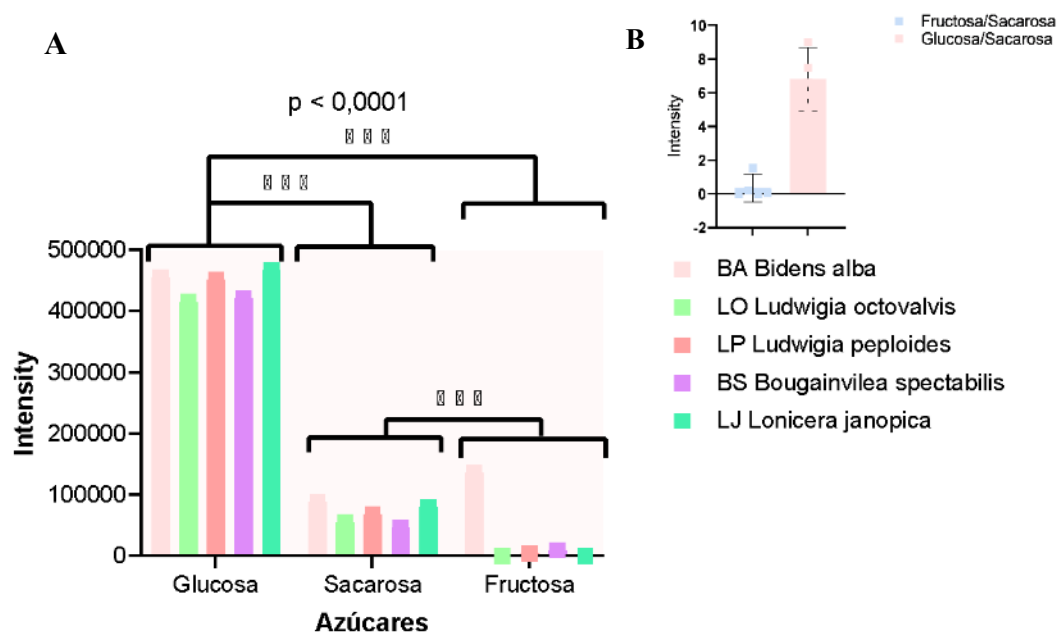


Figura 15: Análisis de la presencia de azúcares fructosa, glucosa y sacarosa por ANOVA de plantas colectadas en campo. A Comparación entre grupos de azúcares entre los grupos experimentales, B Fold change entre azúcares.

Tabla 5: Fold change – extracto de azúcares.

	Código	Glucosa/Sacarosa	Fructosa/Sacarosa
<i>Bidens alba</i>	BA	5.12	1.53
<i>Ludwigia octovalvis</i>	LO	7.48	0.00
<i>Lufwigia peploides</i>	LP	6.60	0.06
<i>Bougainvillea spectabilis</i>	BS	9.01	0.20
<i>Lonicera japonica</i>	LJ	5.88	0.00

4. Perfil metabolómico entre grupos experimentales

En la figura 16, se han analizado los buches de los *mosquitos An. pseudopunctipennis* colectados en campo MC, buches de mosquitos alimentados con las plantas colectadas en campo (LP *Ludwigia peploides*, LO *Ludwigia octovalvis*, BA *Bidens alba*, LJ *Lonicera japónica*, BE *Bougainville spectabilis*), extractos metanólicos de las plantas EXT colectadas en campo y el control de

calidad el cual es una mezcla de glucosa, fructosa y sacarosa. El análisis de componentes principales explica para el PC1 el 32.7 % de datos y para PC2 el 23.5% haciendo un total de 56.2 % de la variación de los datos analizados. En todos los grupos se observa una distribución homogénea y bien diferenciada para cada grupo experimental; así como las flechas indican la contribución (dirección y magnitud de las cargas) de metabolitos para ambos componentes.

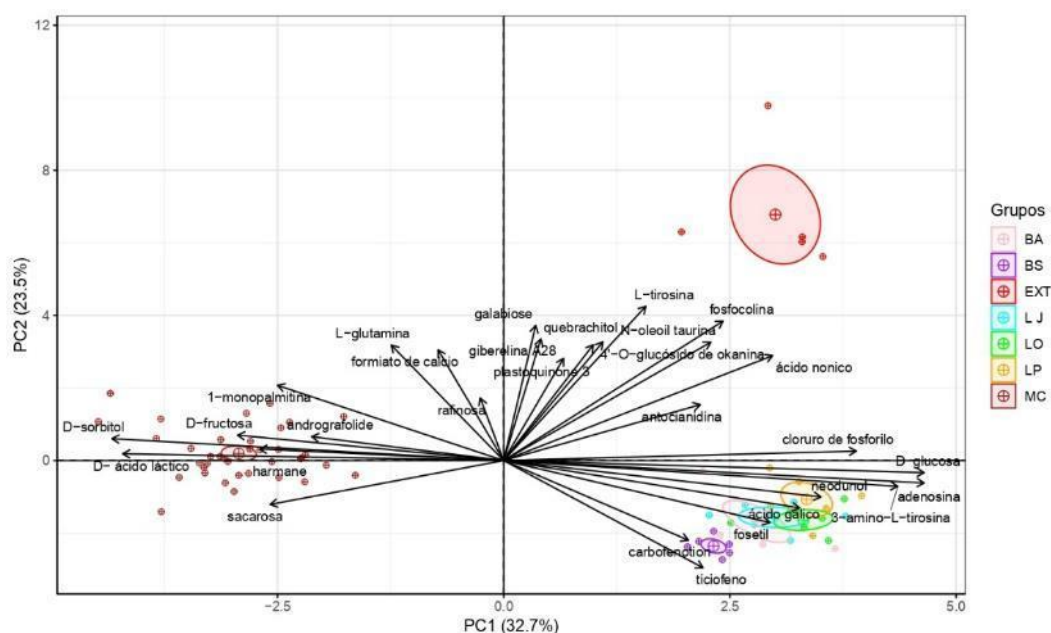


Figura 16: Análisis de componentes principales PCA de los metabolitos encontrados en los diferentes grupos experimentales. EXT – Extractos metanólicos de las plantas (LP - *Ludwigia peploides*, LO - *Ludwigia octovalvis*, BA- *Bidens alba*, LJ - *Lonicera japónica*, BS - *Bougainvillea spectabilis*), MC (buches de mosquitos colectados en campo) y buches de mosquitos alimentados con plantas colectadas en campo (LP - *Ludwigia peploides*, LO - *Ludwigia octovalvis*, BA - *Bidens alba*, LJ - *Lonicera japónica*, BS - *Bougainvillea spectabilis*). Las elipses representan la dispersión de datos de acuerdo con la desviación estándar en cada grupo experimental.

Cada grupo experimental se diferencia por representar metabolitos específicos ver figura 16 y tabla 2 de anexos. Los buches de mosquitos colectados en campo MC están relacionados entre sí y distribuidos negativo y positivo para ambos lados del eje para PC2 y negativa para PC1, lo que indica que tiene una relación positiva

entre metabolitos; por lo tanto una similitud de metabolitos para todo el grupo, siendo los metabolitos más influyentes L-glutamina, sacarosa formiato de calcio, rafinosa, andrografolide, 1- monopalmitina, y una contribución menor de D-sorbitol, y D-fructosa, D-ácido láctico.

En los buches de mosquitos alimentados con las plantas colectadas en campo, se observa una relación entre los grupos LP, LO, LJ y BA con una contribución positiva de los metabolitos D-glucosa, adenosina, 3 – amino L-tirosina, neodunol, ácido gálico, cloruro de fosforilo y también una contribución positiva de los metabolitos carbofenotion y ticiofeno para BS y fosetil para los grupos BA y LJ.

Otro grupo también bien diferenciado son los extractos de plantas (EXT), los cuales tienen una contribución positiva de los metabolitos tales como, el 4'- O - glucósido de okanina, giberelina A28, galabiosa, plastoquinona 3, quebrachitol, L-tirosina, N – oleoil-aurina, fosfocolina y ácido nonico.

Análisis de interacción entre metabolitos y redes moleculares de los diferentes grupos experimentales

El análisis de metabolitos y la interacción y/o relación entre ellos en base a las redes moleculares fue evaluado con el GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) y Cytoscape. GNPS proporciona todas las redes moleculares identificadas en su base de datos, de acuerdo con la interacción de metabolitos. Cytoscape fue utilizado para el filtrado y construcción de redes moleculares específicas, los nodos representan a cada metabolito, las anotaciones representan las características de cada compuesto; y las aristas (edges) conectan los metabolitos entre sí, los cuales indican el tipo de interacción y transformación química.

Para visualizar las redes moleculares de los datos obtenidos en las figuras 17, 18, 19 y suplementario 3, se utilizó el layout circular de Cytoscape, puesto que nos permite una visualización clara y estructurada de los nodos de cada metabolito y sus interacciones. La elección de gráficos de pastel o gráficos de sectores nos permite realizar una comparación directa entre grupos experimentales para cada metabolito.

Se realizó la búsqueda de las redes moleculares de las vías metabólicas en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), de las especies de *Anopheles* y encontramos las redes y vías metabólicas del *Anopheles gambiae*; dichas redes metabólicas nos sirven de referencia para realizar una comparación de metabolitos encontrados en nuestros análisis y en qué vía metabólica participan.

En base a las características evaluadas y descritas líneas arriba en la figura 17 identificamos un grupo de carbohidratos los cuáles son Alfa-D-glucosa, Trehalosa, Cerebrosa y Desoxyrhaponticin. El principal nodo o metabolito es la Alfa-D-glucosa ya que se observa interacciones de las aristas de transformación de los otros metabolitos hacia la Alfa-D-glucosa. De acuerdo con las gráficas de sectores de cada nodo se observa los niveles en intensidades de los 4 metabolitos para cada

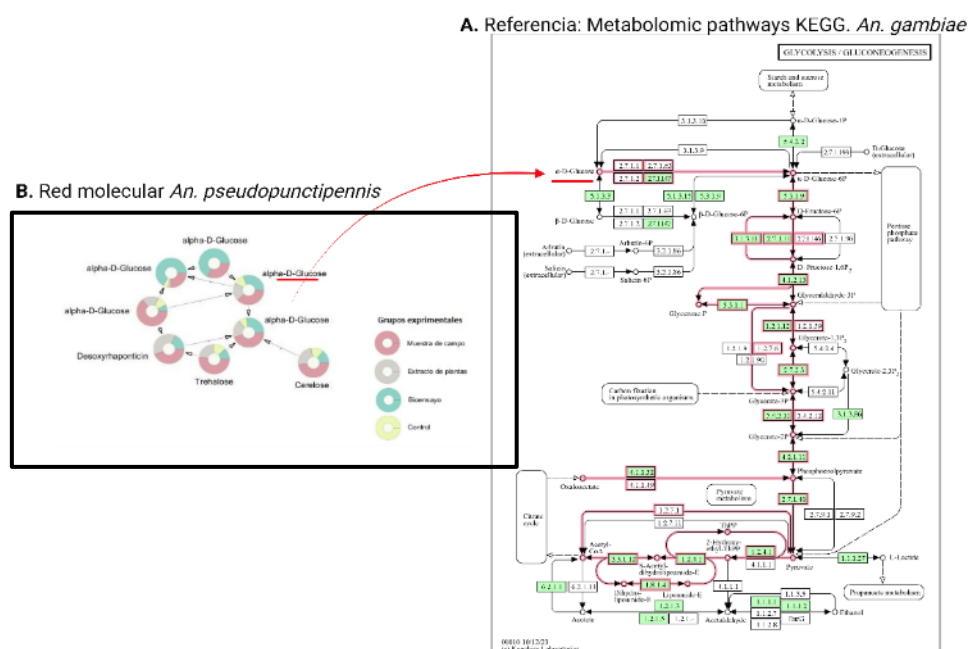


Figura 17: A. Vía metabólica de referencia de *An. gambiae*, B. Identificación de metabolitos pertenecientes a la red molecular de la vía metabólica de la glucólisis en *An. pseudopunctipennis*.

grupo experimental, teniendo mayores niveles en los buches de mosquitos colectadas en campo y los extractos metanólicos de plantas colectadas en campo. De acuerdo con la identificación de metabolitos y la relación que guardan entre ellos formando una red molecular, se hizo una comparación con la vía de la glucólisis del *Anopheles gambiae*, teniendo como principal metabolito a la Alfa-D-glucosa, puesto que es el metabolito final del catabolismo de otros azúcares complejos y el cual puede reingresar a la vía de la glucólisis.

En la figura 18 encontramos otro grupo de carbohidratos los cuáles son melibiosa, Alfa -D- glucosa, rafinosa y sacarosa formando los componentes de una red molecular; dichos metabolitos participan en la vía de la galactosa teniendo como referencia la vía de la galactosa del *An. gambiae*. Se observa una relación directa desde la sacarosa a la melibiosa de acuerdo a la dirección de la arista que los conecta (figura 18B). La gráfica de sectores nos muestra la distribución de los niveles en

cada grupo experimental observando mayores niveles de Rafinosa, Sacarosa y

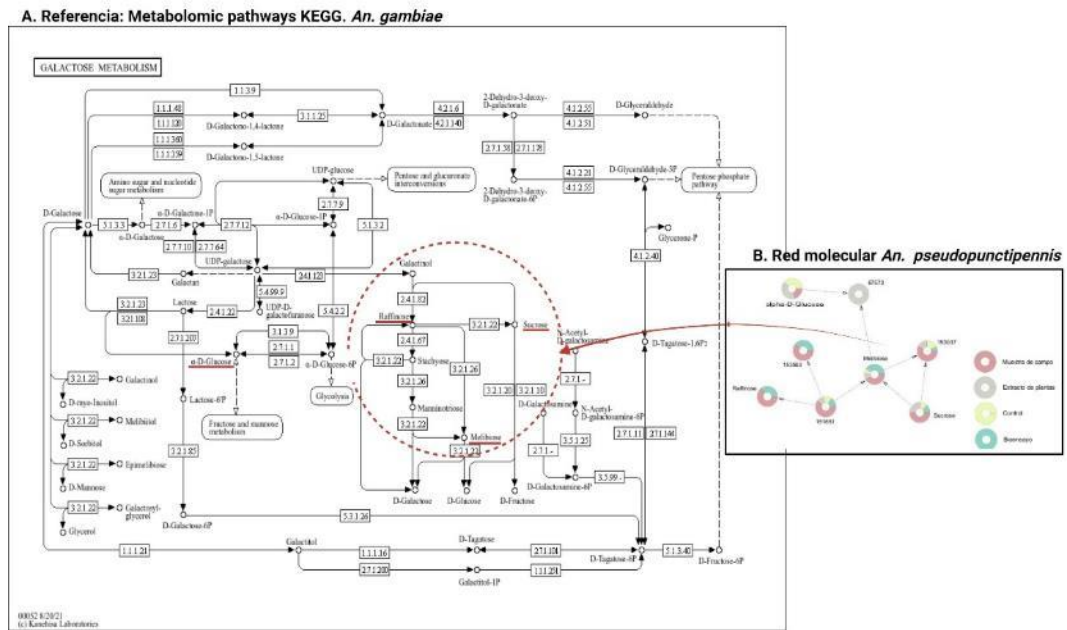


Figura 18: A. Vía metabólica de referencia de *An. gambiae*, B. Identificación de metabolitos pertenecientes a la red molecular de la vía metabólica de la galactosa en *An. pseudopunctipennis*.

melibiosa en las muestras de campo, y menores niveles en las muestras de bioensayo (LP, LO, BA, LJ y BS), así como en los extractos de plantas. Dichos metabolitos fueron asociados con la ruta metabólica referencial de *Anopheles gambiae* encontrándose una relación de metabolitos similares para la ruta metabólica de la galactosa.

En la figura 19 hemos identificado metabolitos involucrados en la vía metabólica de los fosfolípidos, estos metabolitos conforman una red molecular e interactúan entre sí, los cuales son fosfoetanolamina, fosfodimetilatanolamina dimetiletanolamina, fosfatidiletanolamina, y 1 estearil-2linoleoil-sn glicero-3-fosfoetanolamina. En cuanto a los nodos representados por gráfica de sectores, observamos mayores niveles de los fosfolípidos en los buches de mosquitos alimentados con las plantas colectadas en campo, los cuales son las muestras de

bioensayo (LP, LO, BA, LJ y BS) en comparación con los buches de mosquitos colectados en campo MC.

La figura 20, muestra una red molecular de tres metabolitos los cuales son kaempferol-7-O-hexósido, okanina-4'-O-glucósido y 7-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxy-6-(hidroximetil) oxan-2-il]oxi-2,3-dihydro

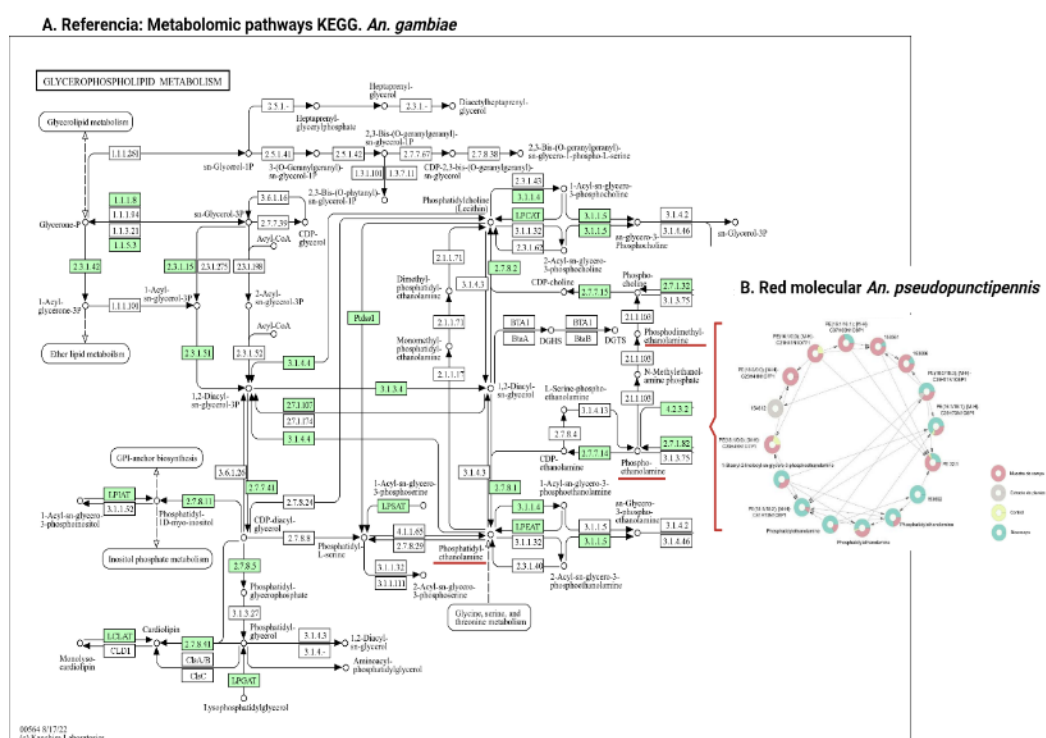


Figura 19: A. Vía metabólica de referencia de *An. gambiae*, B. Identificación de metabolitos pertenecientes a la red molecular de la vía metabólica del metabolismo de los fosfolípidos en *An. pseudopunctipennis*.

cromen-4-ona. De acuerdo con la gráfica de sectores identificamos que esta red se encuentra presente al 100% en los extractos metanólicos de las plantas (EXT).

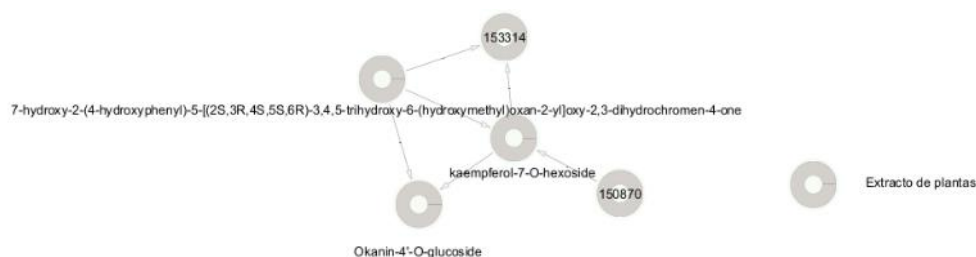


Figura 20: Identificación de metabolitos pertenecientes a la red molecular de los extractos metanólicos de las plantas.

5. Identificación de pesticidas.

En la figura 21 y tabla 2 de anexos, analizamos las distancias (distancia Euclidiana) y el agrupamiento (método de Ward) de pesticidas identificados por medio del diagrama de mapas de calor, cluster y el test de ANOVA de una vía. Observamos una relación grupal del carbofenotion y ticiofeno y estos a su vez con el fosetil y Cloruro de fosforilo. Los valores según las distancias euclidiana van desde -2 identificados con el color azul el cual significa una distancia de 0 a 2 representado con el color rojo una creciente distancia de los metabolitos. Con respecto a los cluster según Ward. D., existe una agrupación directa entre LO y LP. Otro grupo de cluster entre LJ, BA y BS, finalmente entre EXT y MC.

EXT y MC muestran perfiles muy similares con respecto a carbofenotion, ticiofeno y fosetil.

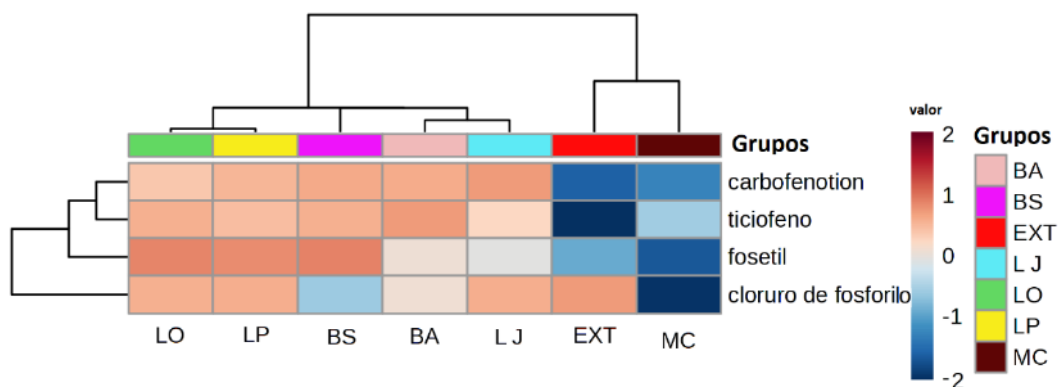


Figura 21: Mapa de calor de los pesticidas encontrados en los diferentes grupos experimentales.

VII. DISCUSIONES

Uno de los primeros objetivos de nuestra investigación fue la identificación taxonómica de mosquitos anophelinos adultos, los cuales son vectores importantes en diferentes regiones tropicales a nivel mundial. *An. pseudopunctipennis* y *An. albimanus*, fueron encontrados en las zonas ribereñas de la región Lima, dichas especies son vectores potenciales de Malaria por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. Existe una alta vegetación cerca de las zonas ribereñas, así como zonas agrícolas de alta producción como por ejemplo de manzana en Mala. Estudios realizados entre los años 1997 y 1999 en el departamento de la Libertad identificaron tres especies *An. pseudopunctipennis*, *An. albimanus* y *An. calderoni*; posteriormente se identificó las mismas especies excepto *An. albimanus* entre el 2001 y 2002 en la provincia de Virú (Cruz et al., 2004). Este dato histórico sugiere la continuidad en la distribución geográfica a través de los años de las dos especies de anophelinos en la costa peruana (Ayala-Sulca et al., 2022).

Los mosquitos en general tienen como fuente principal a los azúcares, los cuales se encuentran almacenados en el buche, existe muchos estudios donde determinan la

concentración de azúcares con técnicas analíticas y cuantitativas (Dutra Nunes et al., n.d.; Olson et al., 2020) , los cuales no son precisas; así como técnicas utilizadas para detectar cantidades pequeñas de los niveles de metabolitos como es el GC-MS (Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas)(Burkett et al., 1999).

La cantidad de azúcares en el buche del mosquito son menores a los 20ul, por lo que se seleccionó la técnica UHPLC-MS, este tipo de análisis químico instrumental fue evaluada y seleccionada de acuerdo con el objetivo del trabajo de investigación; los cuales fueron el tamaño de muestra, la simplicidad en la preparación de la muestra, la sensibilidad del equipo y costos con respecto a otras técnicas como GC-MS en donde las muestras requieren de un proceso de derivatización para mejorar la volatilidad del analito y la estabilidad a altas temperaturas a la que es expuesta la muestra durante el análisis instrumental (Fiehn, 2016).

Otra técnica comparable es la resonancia magnética nuclear (RMN) la cuál es menos sensible y está limitada a detectar metabolitos con una concentración menor a $\leq 1\mu\text{M}$ micromolar, en comparación con UHPLC-MS el cual puede detectar hasta femtomolar o atomolar con una alta sensibilidad de aproximadamente $10^3 - 10^4$. Finalmente, el costo del equipo y/o análisis es más costoso que los realizados con el UHPLC-MS o GC-MS (Marshall & Powers, 2017).

Cold Anthrone Test es una técnica cualitativa y cuantitativa el cual permite la detección de polisacáridos y monosacáridos, debido a ello es una técnica de baja sensibilidad recomendada para una respuesta rápida de presencia o ausencia de azúcares de muestras analizadas en campo con un límite de detección por encima

de los mg/L (Van Handel, 1985) a diferencia de la técnica de UHPLC-MS que se puede analizar hasta parte por trillón (ppt = ng/L) de una muestra (Marshall & Powers, 2017).

La principal fuente de energía de los mosquitos en nuestro estudio de los *Anopheles pseudopunctipennis* son los azúcares, tales como la glucosa, fructosa y sacarosa. En todos los grupos experimentales encontramos mayores niveles de glucosa y menor concentración de fructosa, así como mayor nivel de sacarosa en los mosquitos colectados en campo MC de los cuales su fuente de alimentación es diversa. Este resultado nos da información de la importancia de la fuente de alimentación, puesto que los buches de mosquitos con mayor concentración de glucosa fueron mosquitos de los bioensayos en el laboratorio. Estos fueron alimentados con las plantas seleccionadas cuyas características fueron la presencia de flores, néctar y polen. Por el contrario, la disponibilidad de azúcares como la glucosa, sacarosa o fructosa en las muestras de campo MC, va a depender de la disponibilidad de las posibles fuentes de azúcares que encuentren dentro de su rango de movimiento.

De acuerdo a los resultados encontramos mayor presencia de sacarosa en las muestras de campo, lo cual puede determinar que los mosquitos van directamente a alimentarse de los néctares ricos en sacarosa disponibles en las plantas de campo, este comportamiento fue comprobado en un estudio de respuesta sensorial de *An. gambiae* frente a diferentes compuestos químicos como la sacarosa, fructosa, glucosa, cafeína, berberina y quinina (Kessler et al., 2013), teniendo mayor respuesta sensorial frente a la sacarosa. La sacarosa al ser un disacárido, tiene una estructura química más estable que los otros dos monosacáridos (glucosa y fructosa) que podría tener mayor tiempo de almacenamiento en el buche (al ser una mayor

reserva energética), el cual es beneficioso para las actividades fisiológicas del mosquito.

En el caso de la fructosa puede estar ocurriendo una digestión metabólica rápida por lo que se detectan bajas concentraciones en todos los grupos experimentales. O alternativamente puede no estar en mayor concentración en las flores escogidas por los mosquitos. Esto se ve respaldado por el análisis de los niveles de azúcares en los extractos de plantas que nos confirma la alta concentración de glucosa y sacarosa en cada una de las plantas colectadas en campo mas no de fructosa (figura 15). Para entender y dilucidar esta diferencia en los niveles de azúcares, se podría realizar estudios de las enzimas digestivas en los mosquitos a futuro.

El análisis del perfil metabolómico por PCA nos muestra una agrupación separada para cada grupo experimental. Las muestras de buches colectadas en campo muestran una relación entre ellos; ya que los mosquitos tienen para una elección múltiple de diversas plantas, los cuales tienen una contribución significativa de D-ácido láctico, L-glutamina, ergotioneina, harmane, 1- monopalmitina y una contribución menor de sacarosa, rafinosa, y D-fructosa, D-sorbitol, formiato de calcio. La elección múltiple tiene un efecto positivo, puesto que los mosquitos perciben y discriminan (Foster & Takken, 2004) entre las plantas los compuestos químicos que son o no beneficiosos para su nutrición; así como la posible toxicidad de compuestos de las plantas (Kessler et al., 2013).

En la alimentación general del mosquito, el ácido láctico tiene una alta contribución en este grupo; puesto que es un compuesto químico principal de la sudoración del humano y animales en general (Frei et al., 2017; Gary & Foster, 2001), pero no está

presente en las muestras de bioensayo puesto que los mosquitos no tuvieron contacto con personas y/o animales.

El ácido láctico encontrado podría significar un metabolito clave en el estudio de comportamiento (repelencia-atracción) de los *An. pseudopunctipennis*. Los aminoácidos encontrados son la L-glutamina y la ergotioneina, los cuales actúan como antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo.(Fu & Shen, 2022).

La L-glutamina es un aminoácido no esencial pero también se encuentra en diversas fuentes de la dieta como las plantas y frutos. La ergotioneina es un aminoácido de fuentes naturales principalmente de los hongos comestibles, el cual tiene estudios de efectos antioxidantes (Fu & Shen, 2022; Meister et al., 2005). Ambos metabolitos encontrados en la dieta de los anophelinos podrían jugar un rol importante en su respuesta inmune y estrés oxidativo permitiendo así una resistencia a pesticidas (Oliver & Brooke, 2016). Estudios recientes en los países de Burkina Faso y Indonesia han demostrado que compuestos naturales como harmane y andrografolide poseen propiedades antimaláricas (Huang et al., n.d.; Sari et al., 2018), inhibiendo el desarrollo de los parásitos causantes de la malaria, como *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium bergie*, en especies de mosquitos vectores como *Anopheles stephensi* y *Anopheles gambiae*. En nuestra investigación hemos identificado estos dos compuestos en los mosquitos colectados en campo.

La identificación de estos dos compuestos sugiere un posible mecanismo de inhibición natural del desarrollo de los parásitos maláricos dentro del vector mediada por su dieta. Estos hallazgos abren nuevas oportunidades para estudiar la dinámica de infección (González-Cerón et al., 2019; Moreira et al., 2015) por

Plasmodium en *Anopheles pseudopunctipennis*, así como la identificación de las plantas en su dieta que pueden ser fuentes de estos compuestos antimaláricos.

Los extractos metanólicos también fueron diferenciados en el análisis de PCA figura 16, con metabolitos que contribuyen positivamente como quebrachitol, okanina-4'-O-glucósido, antocianidinas (antioxidantes) (Ramaroson et al., 2022; Xuan & Khanh, 2016), ácido nónico (metabolismo de los lípidos), L-tirosina (aminoácido esencial involucrado en la síntesis de proteínas y neurotransmisores) y fosfatidilcolina (involucrado en la formación y mantenimiento de la membrana celular) (Hoxmeier et al., 2015b). La identificación de estos metabolitos en las plantas puede contribuir a entender de manera positiva en las diversas actividades fisiológicas del mosquito y mejorar el fitness y la capacidad vectorial ver figura 15 y 16.

El hallazgo de bajos niveles de pesticidas como el Fosetil, Carbofenotion, Ticiofeno y Cloruro de fosforilo en las muestras colectadas en campo MC, podría sugerir tres mecanismos: 1) detoxificación por la dieta, pueden estar metabolizando y desintoxicando estos pesticidas a través de componentes presentes en su dieta como evidencian los compuestos químicos antioxidantes y detoxificantes identificados en la dieta; 2) la repelencia a ciertas plantas que contengan pesticidas; y 3) desarrollo de resistencia a los pesticidas por exposición generacional prolongada. Los mosquitos alimentados con las plantas colectadas en campo LO, LP, BA, LJ y BS contienen un nivel similar de los cuatro pesticidas; sin embargo, los mosquitos han sobrevivido a la alimentación por dichas plantas por lo tanto observaremos un nivel de resistencia a pesticidas comunes usados en la agricultura.

Conocer el rol fundamental de los metabolitos como los azúcares y el rol que cumplen en las diversas vías metabólicas como la glucólisis y de la galactosa en el mosquito es de vital importancia. En nuestra investigación identificamos la rafinosa, sacarosa, trealosa, melibiosa y glucosa en los buches de mosquitos colectados en campo MC, los buches de mosquitos alimentados con plantas (LO, LP, BA, LJ y BS y extractos de plantas EXT). En estudios en Johns Hopkins Malaria Institute (JHMRI), realizaron pruebas en *An. stephensi* con los tres azúcares, glucosa, trealosa y sacarosa; se evidenció que la glucosa y la trealosa contribuyen con la proliferación de *P. falciparum* y *P. berghei* mediado por una bacteria comensal *Asaia bogorensis* una bacteria gran negativa, el cual coloniza el intestino medio, las glándulas salivales y los ovarios de los *An. stephensi* (Grogan *et al.*, 2021) ; a la vez permite el incremento de pH que causa una alcalinización propicia para la capacidad vectorial del mosquito. Para comprobar dicha hipótesis realizaron pruebas con antibióticos para comprobar si *A. bogorensis* participa de manera activa en la interrupción de la homeostasis de la glucosa en *An. stephensi* y a la vez en el incremento de la gametogénesis de los parásitos. Por otro lado, se comprobó que la sacarosa juega el rol contrario al disminuir el pH por la activación de la bomba de protones de V-ATPasa el cual tiene como consecuencia la disminución de la gametogénesis de los parásitos (Ernest *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021).

Con el análisis de las redes moleculares con Cytoscape se identificó una red molecular de genes pertenecientes *Saccharomyces cerevisiae* como por ejemplo GAL1, GAL4, y GAL80 expresados en la red molecular de la galactosa de *Saccharomyces cerevisiae* (ver Suplementario 2), la evidencia molecular de la

posible presencia de *Saccharomyces cerevisiae* en el buche del mosquito se debería a que la levadura es parte de la composición de la dieta presente en las flores, néctares y en las cascarras o pieles de las frutas especialmente ricos en azúcares(Alsammar & Delneri, 2020).

En levaduras, los genes GAL1 participa en el metabolismo de la galactosa convirtiéndola en glucosa-1-fosfato, GAL4 es un activador transcripcional que promueve la expresión de genes necesarios para la síntesis de glucosa, y GAL80 actúa como un inhibidor transcripcional de GAL4 en ausencia de galactosa (Harrison et al., 2022).

El gen GAL 4 ha sido utilizado en estudios de regulación de la expresión genética junto con UAS (Upstream Activating Sequence) y genes reporteros como Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), con mosquitos *An. stephensi* (O'Brochta et al., 2012), *An. gambiae* (Lynd & Lycett, 2012) y *Ae. aegypti* (Zhao et al., 2014); este tipo de sistemas genéticos permite la expresión de diferentes genes, como el mismo Gal4 en las glándulas salivales y el intestino medio del mosquito con la finalidad de permitir la expresión de genes involucrados en la infección de los mosquitos por los parásitos de la malaria *Plasmodium sp.* (O'Brochta et al., 2012); y así poder ser regulados. El sistema Gal4/UAS también podría ayudar a realizar estudios para la regulación génica del citocromo CPY450 involucrado en la resistencia a pesticidas (Epelboin et al., 2021). Estudios realizados con el sistema binario Gal4/UAS podría contribuir significativamente al desarrollo de nuevas estrategias para el control vectorial, identificando los metabolitos diana y cambios genéticos involucrados en la resistencia a pesticidas usados comúnmente para el control de plagas de anophelinos.

Otra red molecular importante es la red molecular de los fosfolípidos ver figura 20B, en los cuales se identificó la interacción de metabolitos importantes dentro de la síntesis de fosfolípidos los cuales son esenciales para la construcción y mantenimiento de la membrana celular; el cual juega un rol importante en la resistencia a pesticidas formando una barrera en la cutícula externa del mosquito; permitiendo el paso lento de los pesticidas y así favorecer la activación de las enzimas CYP (citocromo P450) (Gan et al., 2021)(Gan et al., 2021)(Gan et al., 2021)(Gan et al., 2021) . Estudios con otras especies de *Anopheles spp* y *Aedes spp*, determinaron que se producen cambios metabólicos a nivel de los ácidos grasos y fosfolípidos ante la exposición de pesticidas y *Mycobacterium* (Hoxmeier et al., 2015b).

En la figura 21A de redes moleculares, se identificaron compuestos naturales ((kaempferol-7-O-hexósido, Okanina-4'-O-glucósido, 7-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6 (hidroximetil)oxan-2-il]oxi-2,3-dihidrocromen-4-ona, los cuales participan en la síntesis de los flavonoides en plantas. Los metabolitos producto de la síntesis de los flavonoides son ingeridos como parte de la dieta de los mosquitos, los cuales pueden jugar un rol importante en su fitness y capacidad vectorial; sin embargo, también existe ciertos tipos de flavonoides los cuales están siendo estudiados como compuestos tóxicos en pruebas de repelencia o pesticidas (Keerti Gautam et al., 2013).

En Perú no se ha desarrollado trampas ecológicas que actúen como pesticidas frente a las larvas o mosquitos adultos; en nuestra investigación hemos identificado un compuesto químico perteneciente a los flavonoides; el cual es, el kaempferol-7-O-hexósido; en estudios previos se identificó este compuesto en la planta *Vitex*

negundo el cual ha sido investigado como larvicida y adulticida en mosquitos *Anopheles stephensi* y *Aedes aegypti* (Keerti Gautam et al., 2013), dicho compuesto podría servir para estudios posteriores como larvicida o adulticida.

Dentro del grupo de plantas colectadas para nuestros ensayos colectamos también las plantas *Desmodium paniculatum*, y *Erigeron bonariensis* y observamos que los 50 mosquitos que fueron introducidos a cada jaula murieron en su totalidad ver anexos tabla 2 (estas dos plantas no fueron usadas para los bioensayos; por la mortalidad observada). Un estudio anterior sobre las plantas de la familia de *Desmodium paniculatum*; como *Desmodium gangeticum*, ha sido utilizada en el tratamiento de la malaria por su efecto antiparasitario y antioxidante (Das et al., 2025); esto sugiere continuar con los estudios de *Desmodium paniculatum* por su posible efecto inhibitorio del desarrollo de los parásitos de *Plasmodium sp.*

VIII. CONCLUSIONES

- _ Se identificó dos tipos de especies de anophelinos: *An. pseudopunctipennis* en las riberas del río Lurín, Mala y Cañete y *An. albimanus* en las riberas del río Mala.
- _ Se realizó los bioensayos con plantas propias de su hábitat, obteniendo mayor concentración de glucosa y sacarosa; a la vez se ve una clara diferencia del perfil metabolómico de las muestras de bioensayo con respecto a las muestras colectadas en campo.
- _ Se identificó metabolitos importantes como la sacarosa, en los mosquitos colectados en campo, lo cual sugiere sea usado en pruebas de preferencia alimentaria, y el desarrollo de trampas ATSB. Otros metabolitos como los fosfolípidos, aminoácidos y flavonoides fueron importantes para realizar los

estudios de redes moleculares y así poder identificar metabolitos target los cuales participan en la regulación metabólica, mantenimiento y estructura celular, importantes para el estudio conjunto con las otras Ómicas.

- La identificación de otros compuestos químicos como los pesticidas, nos da una evidencia circunstancial de que los mosquitos pueden estar desarrollando resistencia a los pesticidas usados en la agricultura para el control de plagas.

Nuestros estudios subrayan la importancia crítica de mantener la vigilancia y control de los vectores anophelinos competentes, incluso en áreas donde actualmente no se registra la presencia de malaria. Las condiciones favorables de su fuente de alimentación, dada la presencia de azúcares y otros compuestos químicos antioxidantes como los flavonoides, los aminoácidos y ácidos grasos son importantes para la reintroducción y propagación del parásito *Plasmodium vivax*. Esto resalta la necesidad de estrategias preventivas robustas; como el uso de la información de sus fuentes de alimentación y características del hábitat local. La información obtenida a través de nuestra investigación puede ser utilizada para desarrollar e implementar medidas de vigilancia y control epidemiológico efectivas, salvaguardando así la salud pública y previniendo posibles brotes de malaria en la región de Lima. Estas acciones son fundamentales para proteger a las comunidades locales y para mantener la ausencia de malaria en el área.

IX. RECOMENDACIONES

- Continuar estudios de la eficacia de Harmane y Andrographolide en la inhibición del desarrollo de *Plasmodium* en *Anopheles pseudopunctipennis*.

- Realizar estudios de capacidad vectorial con la ingesta de estas plantas como parte de su dieta.
- Continuar estudios de resistencia a pesticidas, puesto que la exposición continua puede estar generando la adaptabilidad a ambientes con pesticidas, o se puede presentar el comportamiento de evitación o selección natural de su propia dieta.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barredo, E., & DeGennaro, M. (2020). Not Just from Blood: Mosquito Nutrient Acquisition from Nectar Sources. In *Trends in Parasitology* (Vol. 36, Issue 5, pp. 473–484). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.02.003>
- Birnberg, L., Aranda, C., Talavera, S., Núñez, A. I., Escosa, R., & Busquets, N. (2020). Laboratory colonization and maintenance of *Anopheles atroparvus* from the Ebro Delta, Spain. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04268-y>
- Burkett, D. A., Kline, D. L., & Carlson, D. A. (1999). Sugar meal composition of five north central Florida mosquito species (Diptera: Culicidae) as determined by gas chromatography. *Journal of Medical Entomology*, 36(4), 462–467. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.4.462>
- Chabanol, E., Behrends, V., Prévot, G., Christophides, G. K., & Gendrin, M. (2020a). Antibiotic treatment in *anopheles coluzzii* affects carbon and nitrogen metabolism. *Pathogens*, 9(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090679>
- Chabanol, E., Behrends, V., Prévot, G., Christophides, G. K., & Gendrin, M. (2020b). Antibiotic treatment in *anopheles coluzzii* affects carbon and nitrogen metabolism. *Pathogens*, 9(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090679>
- Chen, Z., Mentor, M., & Kearney, C. M. (2014). *Levels of attraction of aedes aegypti and culex pipiens to nectar of plants amenable to transgenic transformation: potential for the development of mosquitocidal plants.* <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Chisulumi, P. S., Nampelah, B., Yohana, R., Philbert, A., & Kweka, E. J. (2022). Diet and Oviposition Deprivation Effects on Survivorship, Gonotrophic Dissociation, and Mortality of *Anopheles gambiae* s.s. *Journal of Parasitology Research*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6313773>

- Christiansen-Jucht, C., Parham, P. E., Saddler, A., Koella, J. C., & Basáñez, M. G. (2014). Temperature during larval development and adult maintenance influences the survival of *Anopheles gambiae* s.s. *Parasites and Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0489-3>
- Clements, 1999, vol2,403-431. (1999). *The Biology of Mosquitoes vol 2*.
- Coleman, J., Juhn, J., & James, A. A. A. (2007). Dissection of midgut and salivary glands from *Ae. aegypti* mosquitoes. *Journal of Visualized Experiments*, 5. <https://doi.org/10.3791/228>
- Cruz, C., Valle Jorge, & Ruiz Alex. (2004). Determinación de los hábitos de *An. pseudopunctipennis* y *An. calderoni* en dos localidades del Valle de Chao. La Libertad, Perú. *Rev. Perú Med Exp Salud Pública*.
- Dutra Nunes, R., Lourenço De Oliveira, R., Regina, G., & Braz, C. (n.d.). A novel method for measuring fructose ingestion by mosquitoes. In *Journal of Vector Ecology* (Vol. 33, Issue 2).
- Emidi, B., Kisinza, W. N., Mmbando, B. P., Malima, R., & Mosha, F. W. (2017). Effect of physicochemical parameters on *Anopheles* and *Culex* mosquito larvae abundance in different breeding sites in a rural setting of Muheza, Tanzania. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2238-x>
- Ernest, M., Alves e Silva, T. L., & Vega-Rodríguez, J. (2021). The best sugar in town for malaria transmission. In *Trends in Parasitology* (Vol. 37, Issue 9, pp. 775–776). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.07.001>
- Fiehn, O. (2016). Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2016. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
- Fiorenzano, J. M., Koehler, P. G., & Xue, R.-D. (2017). Attractive Toxic Sugar Bait (ATSB) For Control of Mosquitoes and Its Impact on Non-Target Organisms: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/IJERPH14040398>
- Foster, W. A. (1995). Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. *Annual Review of Entomology*, 40(1), 443–474. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.002303>
- Fu, T. T., & Shen, L. (2022). Ergothioneine as a Natural Antioxidant Against Oxidative Stress-Related Diseases. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.850813>
- Ginnobili, S. (2013). Fitness ecológico. *Contrastes*, February, 83–97. <https://doi.org/10.24310/contrastescontrastes.v0i0.1160>
- Goindin, D., Delannay, C., Ramdini, C., Gustave, J., & Fouque, F. (2015). Parity and longevity of *aedes aegypti* according to temperatures in controlled conditions

and consequences on dengue transmission risks. *PLoS ONE*, 10(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135489>

Gowda, H., Ivanisevic, J., Johnson, C. H., Kurczy, M. E., Benton, H. P., Rinehart, D., Nguyen, T., Ray, J., Kuehl, J., Arevalo, B., Westenskow, P. D., Wang, J., Arkin, A. P., Deutschbauer, A. M., Patti, G. J., & Siuzdak, G. (2014). Interactive XCMS online: Simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Analytical Chemistry*, 86(14), 6931–6939. <https://doi.org/10.1021/ac500734c>

Harrison, M. C., LaBella, A. L., Hittinger, C. T., & Rokas, A. (2022). The evolution of the GALactose utilization pathway in budding yeasts. In *Trends in Genetics* (Vol. 38, Issue 1, pp. 97–106). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.08.013>

Hoxmeier, J. C., Thompson, B. D., Broeckling, C. D., Small, P., Foy, B. D., Prenni, J., & Dobos, K. M. (2015a). Analysis of the metabolome of *Anopheles gambiae* mosquito after exposure to *Mycobacterium ulcerans*. *Scientific Reports*, 5(1), 9242. <https://doi.org/10.1038/srep09242>

Hoxmeier, J. C., Thompson, B. D., Broeckling, C. D., Small, P., Foy, B. D., Prenni, J., & Dobos, K. M. (2015b). Analysis of the metabolome of *Anopheles gambiae* mosquito after exposure to *Mycobacterium ulcerans*. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep09242>

Huang, W., Rodrigues, J., Bilgo, E., Tormo, J. R., Challenger, J. D., De Cozar-Gallardo, C., Pérez-Victoria, I., Reyes, F., Castañeda-Casado, P., Jacques Gnambani, E., François de Sales Hien, D., Konkobo, M., Urones, B., Coppens, I., Mendoza-Losana, A., Ballell, L., Diabate, A., Churcher, T. S., & Jacobs-Lorena, M. (n.d.). *Delftia tsuruhatensis* TCI symbiont suppresses malaria transmission by anopheline mosquitoes. <https://www.science.org>

Infection of Laboratory-Colonized Anopheles darlingi Mosquitoes by Plasmodium vivax. (2014). The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <https://doi.org/doi:10.4269/ajtmh.13-0708>

Katajamaa, M., & Orešič, M. (2005). Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC Bioinformatics*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-179>

Keerti Gautam, Padma Kumar, & Sawitri Poonia. (2013). Larvicidal activity and GC-MS analysis of flavonoids of *Vitex negundo* and *Andrographis paniculata* against two vector mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *J Vector Borne Dis* 50, 171–178.

Kessler, S., Vlimant, M., & Guerin, P. M. (2013). The sugar meal of the african malaria mosquito *anopheles gambiae* and how deterrent compounds interfere with it: A behavioural and neurophysiological study. *Journal of Experimental Biology*, 216(7), 1292–1306. <https://doi.org/10.1242/jeb.076588>

Lakshmanan, V., Rhee, K. Y., & Daily, J. P. (2011). Metabolomics and malaria biology. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 175(2), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.09.008>

Mala, A. O., Irungu, L. W., Mitaki, E. K., Shililu, J. I., Mbogo, C. M., Njagi, J. K., & Githure, J. I. (2014). Gonotrophic cycle duration, fecundity and parity of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes during an extended period of dry weather in a semi arid area in Baringo County, Kenya. ~ 28 ~ *International Journal of Mosquito Research*, 1(2), 28–34.

Manda, H., Gouagna, L. C., Foster, W. A., Jackson, R. R., Beier, J. C., Githure, J. I., & Hassanali, A. (2007). Effect of discriminative plant-sugar feeding on the survival and fecundity of *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 6. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-113>

Marshall, D. D., & Powers, R. (2017). Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for metabolomics. In *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (Vol. 100, pp. 1–16). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.01.001>

Meister, S., Kanzok, S. M., Zheng, X., Luna, C., Li, T.-R., Hoa, N. T., Randall Clayton, J., White, K. P., Kafatos, F. C., Christophides, G. K., & Zheng, L. (2005). *Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito Anopheles gambiae*. www.tigr.org/software

Mereta, S. T., Yewhalaw, D., Boets, P., Ahmed, A., Duchateau, L., Speybroeck, N., Vanwambeke, S. O., Legesse, W., De Meester, L., & Goethals, P. L. (2013). Physico-Chemical and biological characterization of anopheline mosquito larval habitats Diptera: Culicidae: Implications for malaria control. *Parasites and Vectors*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-320>

Ministerio de Salud - Perú. (2023). *Fuente : Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades-MINSA. (*) Hasta la SE 15-2023.*

Olson, M. F., Garcia-Luna, S., Juarez, J. G., Martin, E., Harrington, L. C., Eubanks, M. D., Badillo-Vargas, I. E., & Hamer, G. L. (2020). Sugar feeding patterns for *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes in South Texas. *Journal of Medical Entomology*, 57(4), 1111–1119. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa005>

Pareja-Loaiza, P. X., Varon, L. S., Vega, G. R., Gómez-Camargo, D., Maestre-Serrano, R., & Lenhart, A. (2020). Mechanisms associated with pyrethroid resistance in populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Caribbean coast of Colombia Kdr mutations and enzymes associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Colombia. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.01.23.916577>

Parker, E. J., Billane, K. C., Austen, N., Cotton, A., George, R. M., Hopkins, D., Lake, J. A., Pitman, J. K., Prout, J. N., Walker, H. J., Williams, A., & Cameron, D.

D. (2023). Untangling the Complexities of Processing and Analysis for Untargeted LC-MS Data Using Open-Source Tools. *Metabolites*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/metabo13040463>

Ramaroson, M. L., Koutouan, C., Helesbeux, J. J., Le Clerc, V., Hamama, L., Geoffriau, E., & Briard, M. (2022). Role of Phenylpropanoids and Flavonoids in Plant Resistance to Pests and Diseases. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27238371>

Sallum, M. A. M., Obando, R. G., Carrejo, N., & Wilkerson, R. C. (2020a). Identification keys to the Anopheles mosquitoes of South America (Diptera: Culicidae). II. Fourth-instar larvae. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04299-5>

Sallum, M. A. M., Obando, R. G., Carrejo, N., & Wilkerson, R. C. (2020b). Identification keys to the Anopheles mosquitoes of South America (Diptera: Culicidae). IV. Adult females. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04301-0>

Sari, R., Widyawaruyanti, A., Anindita, F. B. T., Astuti, S. K., & Setyawan, D. (2018). Development of andrographolide-carboxymethyl chitosan nanoparticles: Characterization, in vitro release and in vivo antimalarial activity study. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(2), 136–141. <https://doi.org/10.4274/tjps.53825>

Schäfer, M., Brütting, C., Baldwin, I. T., & Kallenbach, M. (2016). High-throughput quantification of more than 100 primary- and secondary-metabolites, and phytohormones by a single solid-phase extraction based sample preparation with analysis by UHPLC–HESI–MS/MS. *Plant Methods*, 12, 30. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0130-x>

Shin, E., Park, C., Ahn, Y.-J., Lee, D.-K., & Chang, K.-S. (2011). Insecticidal and repellent activities of insecticide-sucrose solutions to *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae) under laboratory and field conditions. *Pest Management Science*, 67(6), 665–671. <https://doi.org/10.1002/ps.2106>

Sissoko, F., Junnila, A., Traore, M. M., Traore, S. F., Doumbia, S., Dembele, S. M., Schlein, Y., Traore, A. S., Gergely, P., Xue, R. De, Arheart, K. L., Revay, E. E., Kravchenko, V. D., Beier, J. C., & Müller, G. C. (2019). Frequent sugar feeding behavior by *Aedes aegypti* in Bamako, Mali makes them ideal candidates for control with attractive toxic sugar baits (ATSB). *PLoS ONE*, 14(6), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214170>

Sissoko, F., Junnila, A., Traore, M., Traore, S., Doumbia, S., Dembele, S. M., Schlein, Y., Gergely, P., Xue, R.-D., Arheart, K., Revay, E., Kravchenko, V., Beier, J., & Müller, G. (2019). Frequent sugar feeding behavior by *Aedes aegypti* in Bamako, Mali makes them ideal candidates for control with attractive toxic sugar baits (ATSB). *Frequent Sugar Feeding Behavior by Aedes Aegypti in Bamako, Mali*

Makes Them Ideal Candidates for Control with Attractive Toxic Sugar Baits (ATSB), 574095. <https://doi.org/10.1101/574095>

Snart, C. J. P., Hardy, I. C. W., & Barrett, D. A. (2015). Entometabolomics: applications of modern analytical techniques to insect studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 155(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/eea.12281>

Stone, C. M., Jackson, B. T., & Foster, W. A. (2012). Effects of plant-community composition on the vectorial capacity and fitness of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 727–736. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0123>

Tevatiya, S., Kumari, S., Sharma, P., Rani, J., Chauhan, C., Das De, T., Pandey, K. C., Pande, V., & Dixit, R. (2020). Molecular and Functional Characterization of Trehalase in the Mosquito *Anopheles stephensi*. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.575718>

Thermo Fisher Scientific. (2013). Xcalibur 4.0 Data Acquisition and Processing. *Manual*, 52(9), 10334.

Urbaneja-Bernat, P., Tena, A., González-Cabrera, J., & Rodríguez-Saona, C. (2020). Plant guttation provides nutrient-rich food for insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1935), 20201080. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1080>

Van Handel, E. (1985). Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1(3), 299–301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2906671>

Venter, F., Matthews, K. R., & Silvester, E. (2022). Parasite co-infection: an ecological, molecular and experimental perspective. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1967). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2021.2155>

Wang, M., An, Y., Gao, L., Dong, S., Zhou, X., Feng, Y., Wang, P., Dimopoulos, G., Tang, H., & Wang, J. (2021). Glucose-mediated proliferation of a gut commensal bacterium promotes *Plasmodium* infection by increasing mosquito midgut pH. *Cell Reports*, 35(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108992>

Wells, M. B., & Andrew, D. J. (2019). *Anopheles Salivary Gland Architecture Shapes Plasmodium Sporozoite Availability for Transmission*. <https://doi.org/10.1128/mBio>

Wilkerson, R. C., Strickman, D., Fernandez-Salas, I., Ibañez-Bernal, S., & Litwak, T. R. (n.d.). *Clave ilustrada para la identificación de las hembras de mosquitos anofelinos de México y Centromérica*.

Wilkerson, R. C., Strickman, D., & Litwak, T. R. (1990). Illustrated key to the female anopheline mosquitoes of Central America and Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 6(1), 7–34.

Xuan, T. D., & Khanh, T. D. (2016). Chemistry and pharmacology of *Bidens pilosa*: an overview. In *Journal of Pharmaceutical Investigation* (Vol. 46, Issue 2, pp. 91–132). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0231-6>

Yu, X., Feng, G., Zhang, Q., & Cao, J. (2021). From Metabolite to Metabolome: Metabolomics Applications in Plasmodium Research. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.626183>

Zubair, Q., Matthews, H., Sougoufara, S., Mujeeb, F., Ashall, S., Aboagye-Antwi, F., & Tripet, F. (2021). Bulk-up synchronization of successive larval cohorts of *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* through temperature reduction at early larval stages: effect on emergence rate, body size and mating success. *Malaria Journal*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03602-8>

XI. ANEXOS

Tabla 1: Selección de zonas de muestreo y número de especímenes para análisis. (Zonas con presencia de sitios de oviposición, presencia de flores con néctares florales, extra florales e inflorescencia). En cada lugar de muestreo se encontró las mismas especies de plantas, por lo que se eligió 5 plantas comunes para realizar los bioensayos.

LUGAR	ESPECIES DE PLANTAS*	# RÉPLICAS DE CADA NÉCTAR FLORAL	TOTAL, DE MUESTRAS A ANALIZAR POR UHPLC-MS
LURIN MALA CAÑETE	LP	6	6
	LO	6	6
	BA	6	6
	LJ	6	6
	BE	6	6
	DP	6	6
	EB	6	6
		TOTAL	42

* LP *Ludwigia peploides*, LO *Ludwigia octovalvis*, BA *Bidens alba*, LJ *Lonicera japónica* y BS *Bougainville spectabilis*, DP *Desmodium paniculatum*, EB *Erigeron bonariensis*.

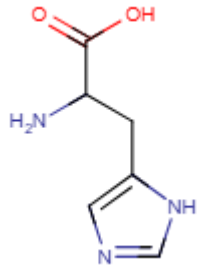
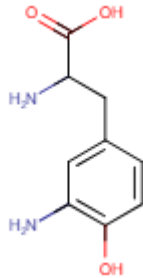
Tabla 2: Lista de plantas colectadas en campo, para realizar las pruebas de bioensayo en el insectario.

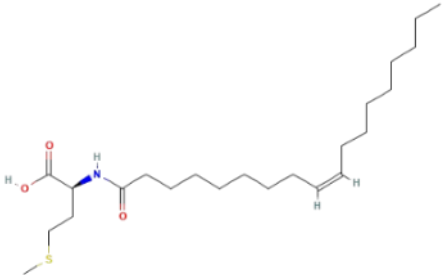
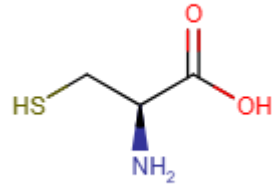
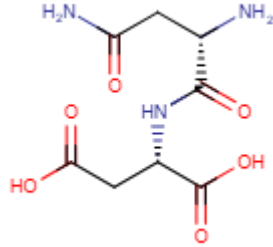
Código	Especie de la planta	Número de Jaula	Número de mosquitos por jaula		Número de mosquitos vivos
			Hembras	Machos	
LP	<i>Ludwigia peploides</i>	1	25	25	50

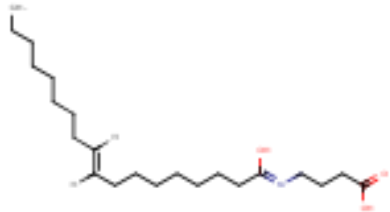
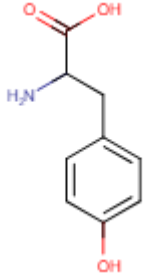
LO	<i>Ludwigia octovalvis</i>	2	25	25	50
BA	<i>Bidens alba</i>	3	25	25	50
LJ	<i>Lonicera japónica</i>	4	25	25	50
BE	<i>Bougainville spectabilis</i>	5	25	25	50
DP*	<i>Desmodium paniculatum</i>	6	25	25	0
EB*	<i>Erigeron bonariensis</i>	7	25	25	0

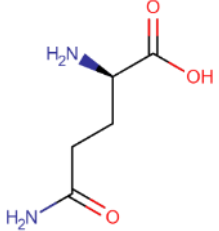
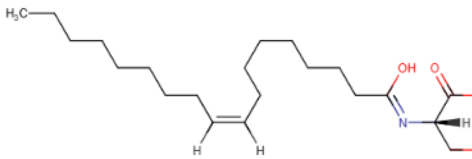
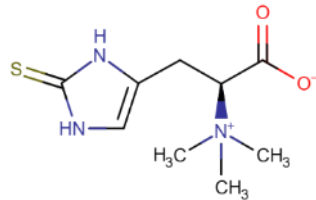
*No fueron usados para los bioensayos.

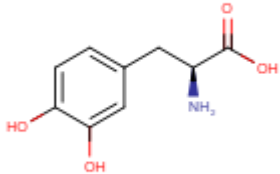
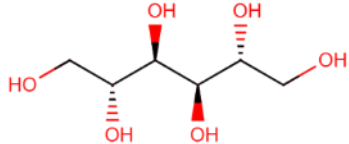
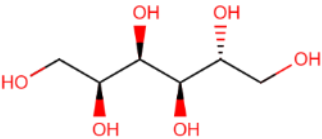
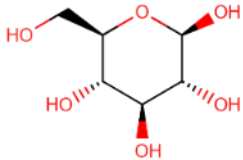
Tabla 3: Base de datos de compuestos químicos putativamente anotados en los buches de mosquitos *An. pseudopunctipennis*.

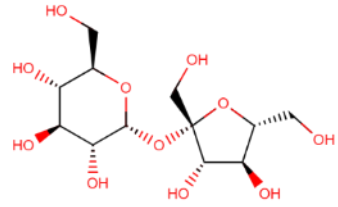
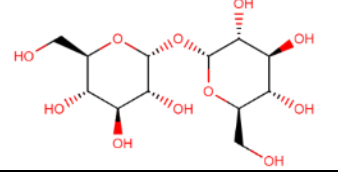
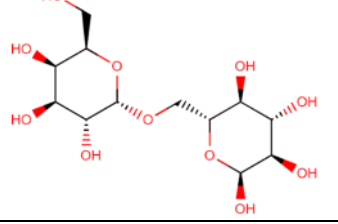
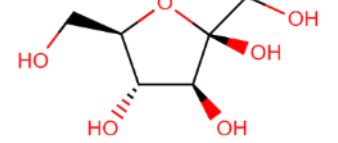
Nombre y estructura química	Clasificación por Biomoléculas	Clase	Subclase	Otras características	HMDB	Pubchem	Metlin	GNPS
L-histidina 	Aminoácido	Ácido carboxílico	Aminoácido		0250763		21	
3-amino-L-tirosina 	Aminoácido	Ácido carboxílico	Aminoácido		0245811		44711	

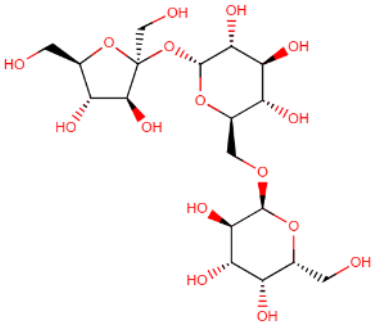
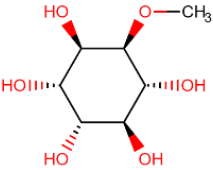
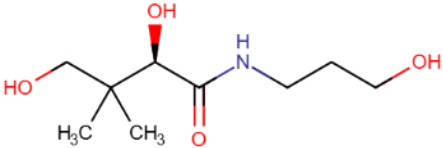
 N-oleoil-metionina	Aminoácido	Acilaminoácido	N-acilaminoácido		0241964	6437024	75492	
 Cisteína	Aminoácido	Ácido carboxílico	Áminoácido		0000574		85691	
 Asparaginil-aspartato	Aminoácido	Ácido carboxílico	Áminoácido		0028727		85642	

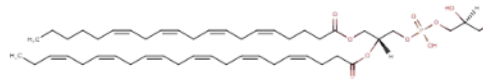
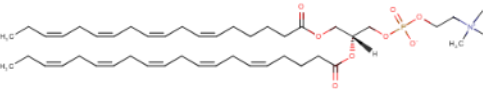
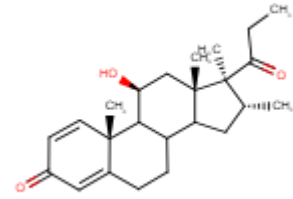
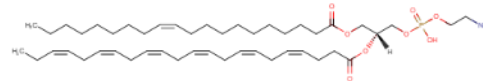
 N-Oleoil GABA	Aminoácido	Ácido carboxílico	Áminoácido		0062335		75486	
 L-tirosina	Aminoácido	Ácido carboxílico	Áminoácido		0250803		34	

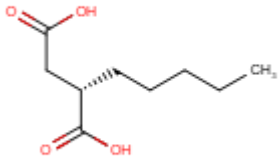
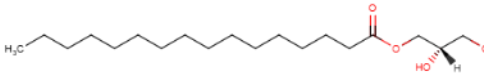
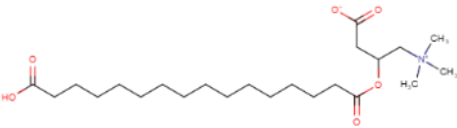
L-glutamina  The structure shows L-glutamine, an amino acid with a side chain containing an amide group. The amino group is highlighted in blue, and the carboxylic acid group is highlighted in red.	Aminoácido	Ácido carboxílico	Áminoácido		0003423		18	
N-oleoil-L-serina  The structure shows N-oleoil-L-serine, a phospholipid derivative. It features a long hydrocarbon chain (oleoil) attached to a serine head group. The serine head group is highlighted in blue, and the carboxylic acid group is highlighted in red.	Aminoácido	Ácido carboxílico	Áminoácido		0242185	44190514	45444	
Ergotioneína  The structure shows Ergothioneine, a sulfur-containing amino acid. It features a thiazolidine ring system. The amino group is highlighted in blue, and the carboxylic acid group is highlighted in red.	Aminoácido	Ácido carboxílico	Áminoácido		0003045		53	

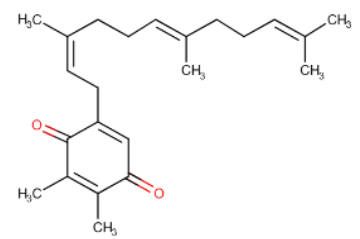
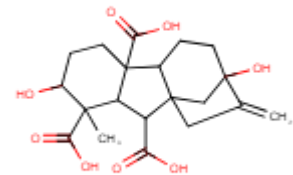
L-Dopa 	Aminoácido	Ácido carboxílico	Áminoácido		0000181		42	
D-Manitol 	Carbohidrato	Compuesto organooxigenado	Carbohidrato		0000765		142	X
D-Sorbitol 	Carbohidrato	Compuesto organooxigenado	Carbohidrato		0000247		143	X
D-Glucosa 	Carbohidrato	Compuesto organooxigenado	Carbohidrato		0000122		133	

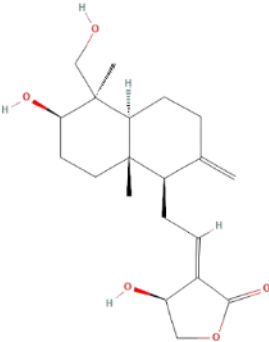
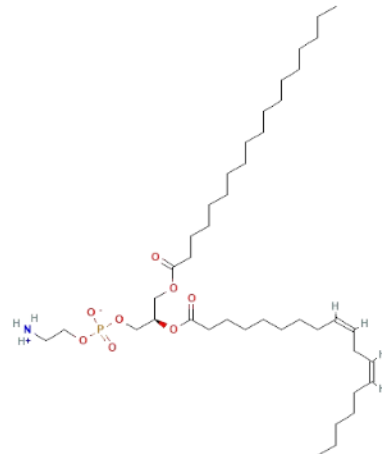
Sacarosa 	Carbohidrato	Compuesto organooxigenado	Carbohidrato		0000258		137	
Trealosa 	Carbohidrato	Compuesto organooxigenado	Carbohidrato		0000975		3479	X
Melibiosa 	Carbohidrato	Compuesto organooxigenado	Carbohidrato		0000048		3478	X
D-Fructosa 	Carbohidrato	Compuesto organooxigenado	Carbohidrato		0000660		135	

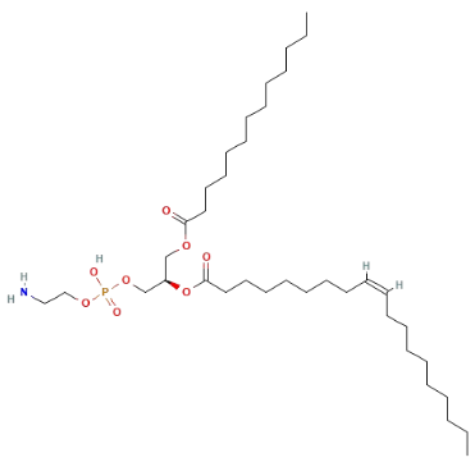
Rafinosa	Carbohidrato	Compuesto organooxigenado	Carbohidrato		0003213		138	X
								
Quebrachitol		Compuesto organooxigenado	Alcohol		0034221		44659	
								
Dexapantenol		Compuesto organooxigenado	Alcohol		0004231		3978	
								
PG (20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16	Lípido	Glicerofosfolípidos	Glicerofosfoglicérol		116613		78869	

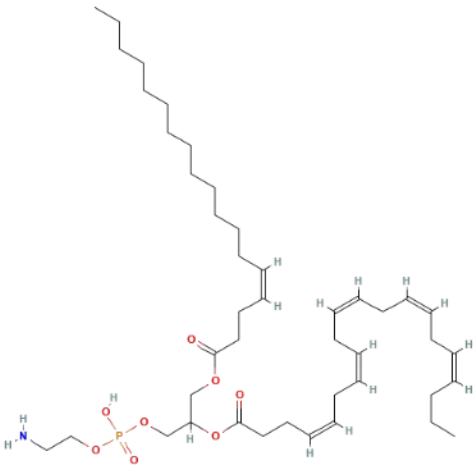
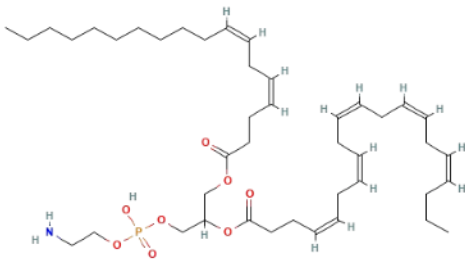
Z,19Z)) 								
 PC (18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	Lípido	Glicerofosfo lípido	Glicerofosfocolin a		0008248		59694	
 Rimexolona	Lípido	Esteroides	Oxoesteroides		0015033		43326	
PE (20:1(11Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) 	Lípido	Glicerofosfo lípido	Glicerofosfoetano lamina		0009276	254199	60672	

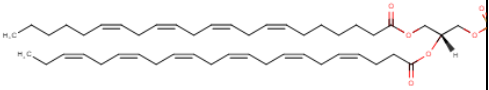
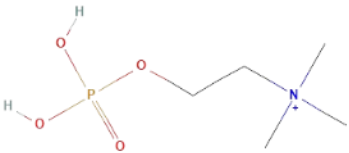
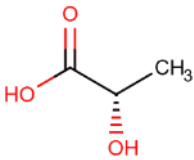
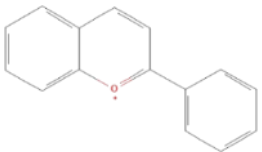
Ácido nóico 	Lípido	Acilo graso	Ácido graso		0011717		44183	
1-Monopalmitato 	Lípido	Glicerolípido	Monoacilglicerol		011564		24076	
Ácido hexadecanedioico mono-L-carnitina éster 	Lípido	Acilos grasos	Ésteres de ácido graso		0000712		75447	

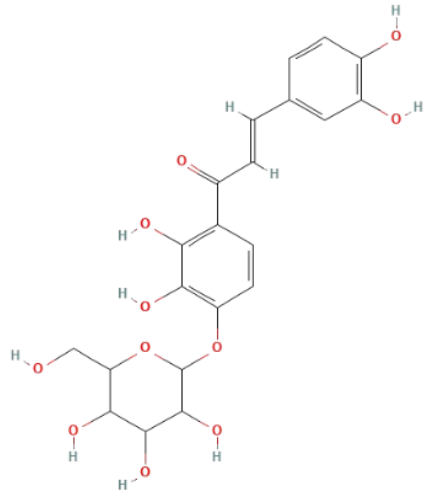
 Plastoquinona 3	Lípido	Lípido prenil	Diterpenoide		0033786		89533	
 Gibberellina A28	Lípido	Lípido prenil	Diterpenoide		0303573		53648	

Andrografólido 	Lípido	Terpenoide	Diterpeno			5318517	44009	X
1-Estearoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina 	Lípido	Glicerofosfolípido	Glicerofosfoetanolamina			46891778		X

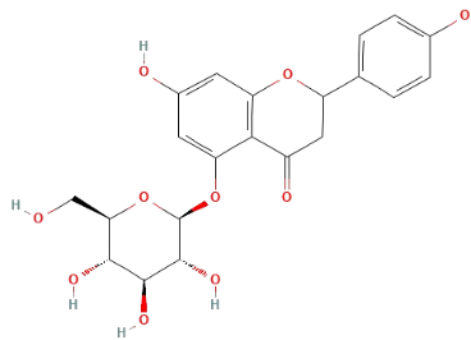
PE 32:1 	Lípido	Glicerofosfo lípido	Glicerofosfoetano lamina			52924101		X
--	--------	------------------------	-----------------------------	--	--	----------	--	---

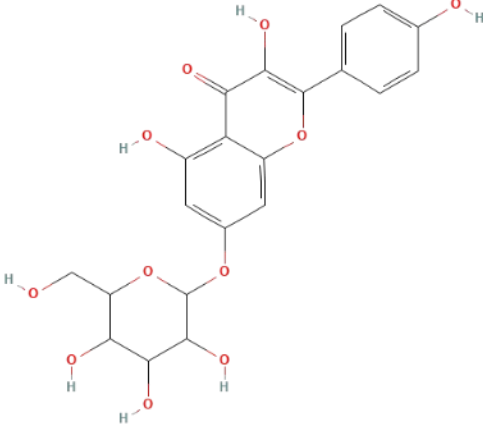
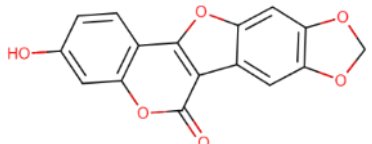
Fosfatidiletanolamina 18:1-20:5 	Lípido	Glicerofosfolípido	Glicerofosfoetanolamina			134750450		X
Fosfatidiletanolamina 18:2-20:5 	Lípido	Glicerofosfolípido	Glicerofosfoetanolamina			134754227		X

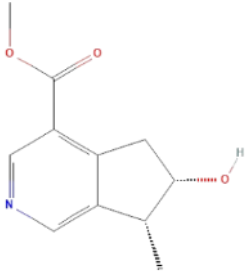
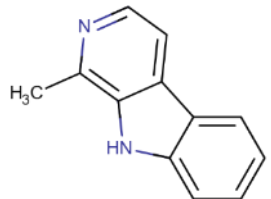
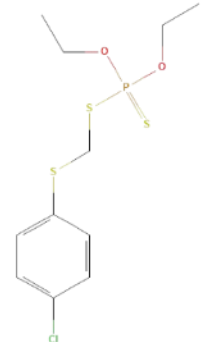
PE (22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) 	Lípido	Glicerofosfolípido	Glicerofosfoetanolamina		0009605		60994	
Fosforilcolina 		Compuesto organonitrogenado	Sales de amonio Fosfocolina		0001565		3318	X
Ácido láctico 		Hidroxácido y derivados	Alfahidroxácido		0000190		116	
Antocianidina 		Compuesto fenólico	Fenoles			145858	87696	

 Okaina-4'-O-glucósido		Compuesto fenólico	Fenoles			15560106		X
7-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-5- [(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il]oxi-2,3-dihidro		Compuesto fenólico	Flavonoide			5321085		X

cromen-4-ona



 Kaempferol-7-O-hexósido		Compuesto fenólico	Flavonoide			5480982		X
 Medicagol		Isoflavonoid es	Coumestanos		0033831			X

 Cantleyina		Compuesto nitrogenado	Alcaloide			442515	68022	
 Harmane		Alcaloides	Alcaloides		35196		989874	X
 Carbofenotion		Organofosforado	Tiocarbamato	Herbicida		13081	72727	

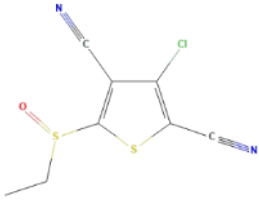
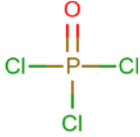
 Ticofeno		Organoclorado	Organoclorado	Fungicida		14880662	72705	
 Fosetil		Fosfonato	Fosfonato	Fungicida		6328134	72209	
 Cloruro de Fosforilo		Organohalógeno	Óxidos de halógeno	Nutriente	0034789		90211	

Tabla 4: Características espectroscópicas de compuestos químicos putativamente anotados en los buches de mosquitos *An. pseudopunctipennis*.

Nombre del compuesto químico	Peso Molecular g/mol	Masa exacta	Error de masa +/- (Da)	Principales fragmentos	LP	LO	BA	LJ	BS	EXT	MC
L-histidina	155.1546	155.1546	- 5.28000 0152652 065E-7	66.0356, 81.0462, 93.046	x	x	x	x	x	x	x
3-amino-L-tirosina	196.206	196.08479 2244	0.0000	72.0091, 122.0611, 195.0775	x	x	x	x	x	x	x
N-oleoil-metionina	413.70	413.29636 4937	0.0033	458.2946, 412.2891, 205.6409	x	x	x	x		x	x
Cisteinil-histidina		258.07866 1024	0.00136	303.0769, 295.0273, 128.0321, 85.0189						x	
Asparaginil- aspartato	247.207	247.08043 5163	0.0021	246.0732, 292.0786, 122.5329		x	x	x			
N-Oleoil GABA	367.574	367.30864 4183	0.000	412.3068, 182.6470, 121.4289	x	x	x	x			x
L-tirosina	181.1885	181.07389 3223	0.00036	162.0555, 180.0666, 226.0721	x	x	x	x	x	x	x
L-glutamina	146.1445	146.06914 2196	0.00058	127.0508, 145.0619 , 191.0673						x	

N-oleoil-L-serina	369.546	369.28790 8741	0.0000	350.2695, 368.2806, 414.2861	x	x	x	x		x	x
Ergotioneina	229.299	229.08849 7429	0.00069	228.0812, 274.0867, 113.5370						x	x
L-Dopa	197.1879	197.06880 7845	0.0000	178.0504, 196.0615, 242.0670, 97.5271	x	x	x	x	x	x	x
D-Manitol	182.1718	182.07903 818	0.00036	227.0772, 181.0718, 59.6857	x	x	x	x	x	x	
D-Sorbitol	182.1718	182.07903 818	0.00018	163.0606, 227.0772, 90.0322	x	x	x	x	x	x	
D-Glucosa	180.1559	180.06338 8116	0.00018	225.0616, 89.0244, 59.0139	x	x	x	x	x	x	
Sacarosa	342.297	342.11621 1546	0.00000	341.1089, 387.1144, 170.0508	x	x	x	x	x	x	x
Trealosa	342.297	342.11621 1546	0.00000	341.1089, 387.1144, 401.1301						x	x
Melibiosa	342.297	342.11621 1546	0.00000	341.1089, 387.1144, 113.0315						x	x
D-Fructosa	180.1559	180.06338 8116	0.00018	179.0561, 225.0616 , 89.0244						x	x
Rafinosa	504.4371	504.16903 4976	0.0000	503.1618, 549.1672, 251.0772			x				x

Quebrachitol	194.1825	194.07903 8168	0.0000	193.0712, 175.0606, 239.0772						x	
Dexapantenol	205.25	205.13140 8101	0.0000	204.1241, 250.1296, 101.5584							x
PG (20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16 Z,19Z))	843.092	842.50978 5132	0.0059	841.5025, 887.5080, 420.2476						x	
PC (18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17 Z))	800.0544	799.51520 4861	0.0016	798.5079, 844.5134, 398.7503						x	
Rimexolona	370.525	370.25079 4954	0.00037 025	313.2173, 311.2016, 369.2435	x	x	x	x	x		x
PE (20:1(11Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	818.1138	817.56215 5053	0.00163 512	816.5549, 862.5604, 407.7738, 798.546						x	
Ácido nónico	188.2209	188.10485 8992	0.00037 621	187.0976, 233.1031, 93.0452	x	x	x	x	x	x	
l-Monopalmitato	330.5026	375.2752	0.00037 528	311.2586, 329.2697, 375.2752	x	x	x	x		x	x
Ácido hexadecanedioico mono-L-carnitina éster	429.5906	429.30903 8113	0.00042 931	428.302,	x	x	x	x	x	x	x
Plastoquinona 3	340.499	340.24023 0268	0.00034 024	339.2330, 375.2099, 385.2384, 169.1128	x	x	x	x	x	x	x
Gibberellina A28	394.4156	394.16276 7808	0.00039 416	413.1612, 439.1610, 196.0741	x	x		x	x		

Andrografólido	350.40	350.20932 406	0.00035 021	349.2020, 395.2075, 174.0974				x	x		x
1-Estearoil-2-linoleoil-sn-glicero-3- fosfoetanolamina	742.54	743.547	0.00000	139.99, 284.50, 257.98	x	x		x			x
PE 32:1	688.49	689.4938	0.0000	255.23, 281.25, 450.27	x	x	x	x			x
Fosfatidiletanolamina 18:1-20:5	762.51	763.515	0.00153	257.23, 304.19, 478.29, 715.42	x	x	x	x	x		x
Fosfatidiletanolamina 18:2-20:5	760.49	760.49	0.00228	279.23, 303.12, 476.12	x						x
PE (22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,1 6Z,19Z))	840.1193	839.54650 4989	0.00252	820.5281, 838.5392, 884.5447						x	
Foforilcolina	184.1507	183.06604 4453	0.00018 3	182.0588, 228.0642, 90.5257	x	x	x	x	x	x	
Ácido láctico	90.0779	90.031694 058	0.00072 025	89.0244, 135.0299, 44.0086							x
Antocianidina	207.25	207.08098 9974	0.00144 957	252.0792, 188.0626, 102.5332, 242.067						x	
Okaina-4'-O-glucósido	449.11	449.109	0.0000	289.06, 269.04, 151.0						x	
7-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-5- [(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il]oxi-2,3-dihidro cromen-4-ona	433.11	433.114	0.0000	119.04, 151.0, 269.03, 313.05						x	

Kaempferol-7-O-hexósido	447.09	447.089	0.004918	109.75, 234.16, 285.18						x	
Medicagol	296.2311	296.032087988	0.000592	277.0137, 341.0303, 147.0088						x	
Cantleyina	207.23	207.089543287	0.0000	206.0823, 252.0877, 102.5375	x	x	x	x	x		
Harmanc	182.2212	181.077	0.00145	69.00, 86.99, 113.99	x	x	x	x	x	x	x
Carbofenotion	342.90	341.973856045	0.00376	322.9555, 386.9721, 169.9797	x	x	x	x	x		x
Ticiofeno	244.70	243.953181879	0.0000	224.9348, 288.9514, 80.3105	x	x	x	x	x		
Fosetil	109.04	110.013280602	0.00132	146.9605, 109.0060, 155.0115	x	x	x	x	x		x
Cloruro de Fosforilo	153.332	151.87523425	0.0001518	170.8736, 196.8734, 74.9303	x	x	x	x	x		

LP - *Ludwigia peploides*, LO - *Ludwigia octovalvis*, BA- *Bidens alba*, LJ - *Lonicera japónica*, BS - *Bougainvillea spectabilis* (buches de mosquitos alimentados con plantas cerca de su sitio de oviposición), EXT – (Extractos metanólicos de las plantas) y MC (buches de mosquitos colectados en campo).

x – indicador de presencia de cada metabolito según el tipo de muestra.