

Evaluación de la actividad insecticida e inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) de 24 análogos sintéticos del alcaloide girsensohnina en huevos y ninfas de I (NI) y V (NV) estadio de *Rhodnius prolixus* stål 1859 (Hemiptera: Reduviidae: triatominae).

Juan Pablo Pabón González

Trabajo de Grado para optar al título de Biólogo

Director:

Jonny Edward Duque Luna

Doctor en Ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2017

Agradecimientos

A Dios por brindarme la oportunidad de conocer su obra a través de la ciencia.

Al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander. Al Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio) de la Universidad Industrial de Santander por el aporte de las moléculas para la realización de la pasantía de investigación.

A los doctores Jonny Edward Duque Luna y Aurora Lisette Carreño Otero por su apoyo y orientaciones para llevar a cabo esta investigación. A mis y amigos compañeros del CINTROP por su colaboración en la realización de la pasantía.

A mi Padre Jorge Pabón (Q.P.D), Mi Madre, mis hermanos, a Sofía B. y toda mi familia por su apoyo incondicional en mi crecimiento personal y profesional.

Contenido

	Pág.
Introducción	19
1. Justificación.....	22
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo General	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. Competencias Desarrolladas	24
4. Materiales y métodos	25
4.1. Materiales	25
4.1.1. Material Biológico.....	25
4.1.2. Material Químico	27
4.2. Metodología.	30
4.2.1. Evaluación De La Actividad Insecticida Screening.....	30
4.2.2. Aplicación tópica.....	30
4.2.3. Bioensayos dosis letales (DL).....	33
4.2.4. Exposición a superficies tratadas	33
4.2.4.1. Impregnación de superficies porosas y no porosas	33
4.2.5. Actividad locomotora	35
4.2.6. Inhibición In Vitro de la enzima AChE	37

4.2.7. Determinar la actividad ovicida in vivo de <i>Rhodnius prolixus</i>	38
4.2.8. Análisis estadístico	41
5. Resultados	42
5.1. Evaluación de la actividad insecticida	42
5.2. Mortalidad en Ninfas NI	43
5.3. Bioensayos dosis letales	46
5.4. Exposición a superficies tratadas	48
5.4.1. Impregnación de superficies porosas y no porosas	48
5.4.2. Mortalidad En Superficies De Ninfas NV.....	50
5.4.3. Signos De Intoxicación	52
Comportamientos Por Intoxicación.....	52
5.5. Actividad locomotora	55
5.6. Inhibición In Vitro de la enzima AChE	56
5.7. Determinación de la actividad ovicida in vivo de <i>Rhodnius prolixus</i>	57
5.8.1 Control negativo Acetona.....	59
Huevos viables en el control negativo con Acetona.	59
5.7.2. Respuesta en impregnación por molécula AL114.....	60
5.7.3. Respuesta en impregnación por molécula AL117.....	61
5.7.4. Respuesta en impregnación por molécula AL119.....	61
5.7.5. Respuesta en impregnación por molécula AL184.....	62
5.7.6. Respuesta en impregnación por molécula AL185.....	62
5.7.7. Control Positivo Deltametrina.....	63
6. Discusión.....	64

6.1. Susceptibilidad de ninfas NI y NV de <i>R. prolixus</i> a 24 análogos sintéticos del alcaloide girgensohnina mediante topicación en terguitos, esternitos y superficies porosas y no porosas. .	64
6.2 Inhibición In Vitro De La Enzima AChE.....	66
6.3 Evaluación del efecto de las mejores moléculas con capacidad insecticida sobre la actividad locomotora de ninfas NI de <i>Rhodnius prolixus</i>	67
6.4 Determinación de la actividad ovicida in vivo, en huevos de <i>R. prolixus</i>	68
7. Conclusiones	69
Referencias Bibliográficas	71

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Grupo A: Análogos obtenidos a partir de la 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina.	28
Tabla 2. Grupo B: Análogos obtenidos a partir de la 1-(2-hidroxiethyl) piperacina.	28
Tabla 3. Grupo C: Análogos obtenidos a partir de la 3-piperidinol.	29
Tabla 4. Grupo D: Análogos obtenidos a partir del 4-dimetilaminobenzaldehido.	29
Tabla 5. Grupo E: Análogos obtenidos a partir del p-metoxibenzaldehido.	30
Tabla 6. En esternitos las mejores DL_{50} y DL_{95} las presento la molécula AL184 con $182,9 \text{ mg.L}^{-1}$ y $6228,9 \text{ mg.L}^{-1}$ debido a que son las concentraciones más bajas, es decir que se	

<i>requiere una dosis más baja de compuesto para eliminar entre el 50 y 95 % de las ninfas evaluadas</i>	47
Tabla 7. <i>En tergitos las mejores DL₅₀ y DL₉₅ las presento la molécula AL184 con 526,4mg.L⁻¹ y 4898 mg.L⁻¹ debido a que son las concentraciones más bajas, es decir que se requiere una dosis más baja de compuesto para eliminar entre el 50 y 95 % de las ninfas evaluadas</i>	47
Tabla 8. <i>Muestra la actividad locomotora de las ninfas expuestas por topicación a las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184, AL185. a 195 mg.L⁻¹ y 695 mg.L⁻¹</i>	55
Tabla 9. <i>Muestra las IC₅₀ Concentración Inhibitoria 50 % de La Enzima AChE por las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184, AL185 y los inhibidores de referencia Galanthamine y Diazinon (Carreño Otero et al., 2014). Siendo la AL185 la molécula que presenta la menor IC₅₀, lo que indica que se requiere solo 8,78 µg/mL de AL185 para inhibir el 50% de AchE</i>	56

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1. A) Distribución Global de casos de Chagas WHO 2010 B) Distribución de los principales triatominos asociados al hábitat humano según zonas biogeográficas en Colombia (Guhl F. et al., 2013)</i>	21

<i>Figura 2. A)</i> Ciclo de vida de <i>Rhodnius prolixus</i> , se señalan los huevos y estadios ninfales NI y NV con los cuales se desarrolló este trabajo (Galvao et al 2014).....	26
<i>Figura 3. A) Y-B)</i> Colonia de Triatominos <i>Rhodnius prolixus</i> en condiciones de laboratorio <i>C)</i> Huevos <i>D)</i> Proceso de alimentación de la colonia con aves de la especie <i>Gallus gallus</i>	26
<i>Figura 4. A)</i> <i>Girgensohnia oppositiflora</i> (Amaranthaceae) planta de la que se obtiene la Girgensohnina este arbusto crece en Rusia y desiertos de Irán <i>B)</i> estructura de Girgensohnina y α -Aminonitrilos (Carreño Otero et al. 2014).	27
<i>Figura 5.</i> Esquema metodológico de bioensayo por topicación, número de ninfas por repeticiones, concentraciones a evaluar en dosis exploratorias (DE).	31
<i>Figura 6.</i> Esquema metodológico de bioensayo por topicación terguitos y esternitos, protocolo CINTROP-UIS.....	32
<i>Figura 7.</i> Esquema de distribución de ninfas en las superficies porosas y no porosas impregnadas con 414 μ L de las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184, AL185 y controles.	34
<i>Figura 8.</i> Esquema Del Analizador De Imagen Video- Mex. (Moretti, A. N., 2015).....	37
<i>Figura 9.</i> Esquema de reacción método (Ellman en 1961) utilizado para la determinación de la actividad de la Acetilcolinesterasa AChE.	37
<i>Figura 10.</i> Etapas de patrón prospectivo en la embriogénesis temprana de triatomino <i>Rhodnius prolixus</i> (Berni et al., 2014).	40
<i>Figura 11.</i> Principales características de las etapas de patrón prospectivo en la embriogénesis temprana de <i>Rhodnius prolixus</i> (Berni et al., 2014) patrón de referencia para medir la viabilidad de los huevo evaluados en el trabajo.	41

Figura 12. Muestra la actividad insecticida de los 24 análogos sintéticos de girsensohnina a las 72 horas y 500 mg.L⁻¹ en ninfas de I estadio de *Rhodnius prolixus* en la topicación de **esternitos**, se aplicó el Test de Kruskal-Wallis: $H(25, N= 78) = 59,04579$ $p = 0,0001$ los asteriscos representan las moléculas con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona), Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad esternitos NI (Spreadsheet2) Independent (grouping) variable Chi-Square = 45,91562 df = 25 $p = 0,0066$ 43

Figura 13. Muestra la actividad insecticida de los 24 análogos sintéticos a las 72 horas y 500 mg.L⁻¹ en ninfas de I estadio de *Rhodnius prolixus* en la topicación de **terguitos**, se aplicó el test de Kruskal-Wallis: $H(25, N= 78) = 62,34683$ $p = 0,0000$ Median Test, Overall Median = 0,00000 los asteriscos representan las moléculas con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad Terguitos NI (Spreadsheet5) Independent (grouping) variable:MOLECULAS Chi-Square = 50,68687 df = 25 $p = 0,0018$. Las moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida fueron: AL184, L185, AL117, AL114 y AL119 con $67 \pm 0,07\%$, $63 \pm 0,06\%$, $29 \pm 0,1\%$, $38 \pm 0\%$, $21 \pm 0,04\%$, por ciento de mortalidad siendo la AL184 la mejor molécula con $67 \pm 0,07\%$ de mortalidad presentado en este bioensayo..... 44

Figura 14. Actividad insecticida de los 24 análogos sintéticos a las 72 horas y 1500 mg.L⁻¹ en ninfas de V estadio de *Rhodnius prolixus* en la topicación de **Esternitos**, se aplicó el Test de Kruskal-Wallis: $H(25, N= 78) = 49,14073$ $p = 0,0027$ en este caso las moléculas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad esternitos NV (Spreadsheet2) Independent (grouping) variable: MOLECULA Chi-Square = 46,53103 df = 25 $p = 0,0056$. La moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida fueron: AL184, AL119 y AL114 con $8 \pm 0,1\%$, $7 \pm 0,04\%$ y $6 \pm 0,07\%$ por

ciento de mortalidad siendo la AL184 la mejor moléculas con 8+0,1% de mortalidad presentado en este bioensayo..... 45

Figura 15. Muestra la actividad insecticida de los 24 análogos sintéticos a las 72 horas y 1500 mg.L⁻¹ en ninfas de V estadio de *Rhodnius prolixus* en la topicación de **Terguitos**. Test de Kruskal-Wallis: $H(25, N= 78) = 49,14073$ $p = 0,0027$ en este caso las moléculas con presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad Terguitos NV (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: MOLECULA Chi-Square = 55,46667 df = 25 $p = 0,0004$. Las moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida fueron: AL184, AL119 y AL114 con 6+0,0%; 4+0,04%; 3 +0% por ciento de mortalidad siendo la AL184 la mejor moléculas con 6+0,0% de mortalidad presentado en este bioensayo..... 46

Figura 16. Actividad insecticida de las moléculas AL184, AL185, AL119, AL114 y AL117 a las 72 horas y 500 mg.L⁻¹ en ninfas de I estadio de *Rhodnius prolixus* en la exposición a superficies No Porosas. Test de Kruskal-Wallis $H(6, N= 21) = 18,58344$ $p = ,0049$ en este caso las moléculas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median Test, Overall Median = ,750000; MORTALIDAD SUPERFICIES NO POROSAS NI (Spreadsheet10) Independent (grouping) variable: MOLECULA Chi-Square = 15,55556 df = 6 $p = ,0164$. La moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida en el bioensayo de superficies no porosas fueron: AL184, AL185, AL119, AL114 y AL117 con 67+0,03%; 63+0,06%; 60+0,07%; 52+0,03%, 46+0,03%, por ciento de mortalidad siendo la AL184 la mejor moléculas con 67+0,03% de mortalidad presentado en este bioensayo..... 48

Figura 17. Actividad insecticida de las moléculas AL184, AL185, AL114, AL117 y AL119 a las 72 horas y 500 mg.L^{-1} en ninfas de I estadio de *Rhodnius prolixus* en la exposición a **superficies Porosas**. Test de Kruskal-Wallis $H(6, N=21) = 14,02580$ $p = 0,0294$ en este caso las moléculas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,166666; Mortalidad Porosas NI (Spreadsheet14) Independent (grouping) variable: MOLECULA Chi-Square = 10,11111 df = 6 $p = 0,1201$. La moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida en el bioensayo de superficies no porosas fueron: AL184, AL185, AL114, AL117 y AL119 con $19 \pm 0,06\%$; $17 \pm 0,1\%$; $17 \pm 0,07\%$; $10 \pm 0,1\%$, $8 \pm 0,1\%$, porcentaje de mortalidad siendo la AL184 la mejor moléculas con $19 \pm 0,06\%$ de mortalidad presentado en este bioensayo. 49

Figura 18. Actividad insecticida de las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 a las 72 horas y 500 mg.L^{-1} en ninfas de V estadio de *Rhodnius prolixus* en la exposición a **superficies No Porosas**. Test de Kruskal-Wallis $H(6, N=21) = 12,88889$ $p = 0,0448$ en este caso las moléculas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad No Porosas NV (Spreadsheet19) Independent (grouping) variable: MOLECULA Chi-Square = 10,11111 df = 6 $p = 0,1201$. La moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida en el bioensayo de superficies no porosas fueron: AL184, AL185, AL119 y AL117 con $4 \pm 0,03\%$; $4 \pm 0,03\%$; $2 \pm 0\%$; $2 \pm 0\%$ y 0% por ciento de mortalidad siendo la AL114 la mejor moléculas con $4 \pm 0,03\%$ de mortalidad presentado en este bioensayo. 50

Figura 19. Actividad insecticida de las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 a las 72 horas y 500 mg.L^{-1} en ninfas de V estadio de *Rhodnius prolixus* en la exposición a **superficies Porosas**. Test de Kruskal-Wallis $H(6, N=21) = 17,47368$ $p = 0,0077$ en este caso

las moléculas No presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad Porosas NV (Spreadsheet24) Independent (grouping) variable: MOLECULAS Chi-Square = 17,32500 df = 6 p = 0,0082. Los porcentajes de mortalidad en superficies porosas fueron: AL114, AL184, AL185, AL119 y AL117 con 0%; 0%; 0%; 0% y 0% por ciento de mortalidad presentado en este bioensayo. 51

Figura 20. Durante el bioensayo en las superficies no porosas se observó agrupamientos de las ninfas NI como reacción al contacto con las moléculas probadas. 52

Figura 21 (A- B.-C.) Vista posterior, anterior y lateral de ninfas NI del control negativo en comparación con ninfas NV **(D.- E.-F.) en distensión abdominal** en por exposición a los compuestos evaluados 53

Figura 22. (A.- B.-C.) Vista posterior, anterior y lateral de ninfas NV del control negativo en comparación con ninfas NV **(D.- E.-F.) en distensión abdominal** en por exposición a los compuestos evaluados 54

Figura 23. Evaluación de la actividad Inhibitoria de la eclosión en huevos de *Rhodnius prolixus* por las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184, AL185 y controles a **25 mg.L⁻¹** Kruskal-Wallis test: H (6, N= 21) =17,55615 p =0,0074 ; a **125 mg.L⁻¹** Kruskal-Wallis test: H (6, N= 21) =16,68033 p =0,0105 ; a **500 mg.L⁻¹** Kruskal-Wallis test: H (6, N= 21) =17,06122 p =0,0091 ;a **800 mg.L⁻¹** Kruskal-Wallis test: H (6, N= 21) =16,93923 p =0,0095 ; a **1500 mg.L⁻¹** Kruskal-Wallis test: H (6, N= 21) =16,94615 p =0,0095. en estos casos las moléculas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona), evidenciándose un aumento en la inhibición de la eclosión a medida que se aumenta las concentraciones en las diferentes moléculas, siendo la molécula AL185 con 83+0% la que genero el mayor porcentaje de inhibición de la eclosión. 58

- Figura 24.* **A)** Se muestran huevos viables comparados con patrón prospectivo en la embriogénesis temprana de *Rhodnius prolixus* en las fases de n y (Berni et al.2014) **B)**
- a.)** Embriones en fase de finalización de la segmentación 72 horas de oviposición donde se aprecian la segmentación definida en los embriones **C) b) y c)** embriones totalmente formada en continuidad de crecimiento 96 horas de oviposición. 59
- Figura 25.* Inhibición de la eclosión de huevos de *Rhodnius prolixus* expuestos a 1500 mg.L⁻¹ de AL 114, donde se aprecia posible inhibición de crecimiento (**a**) y disminución de tanización (**b**). 60
- Figura 26.* **a)** Huevo de control negativo comparado con **b.)** Huevo no eclosionado de *Rhodnius prolixus* expuesto a 1500 mg.L⁻¹ de AL114, con última lectura a 16 días del bioensayo se evidencia posible inhibición de crecimiento. 60
- Figura 27.* Impregnación por Molécula AL117 **A)** Inhibición de la eclosión y muerte post eclosión de ninfas NI a 800 mg.L⁻¹ **B)** Inhibición de la eclosión y muerte post eclosión a 1500 mg.L⁻¹, la mortalidad presentada en las ninfas eclosionadas se debe posiblemente al contacto con la molécula expuesta en la superficie de la caja de Petri, otro factor por el cual se puede presentar este tipo de mortalidades es toxicidad demorada según (O'Brien.R., 1960). 61
- Figura 28.* Impregnación por Molécula AL119 **A)** Inhibición de la eclosión y muerte post eclosión a 500 mg.L⁻¹, también se observó agrupamiento entre ninfas como respuesta al contacto con las moléculas especialmente al ser las superficies no porosas. **B)** Inhibición de la eclosión y muerte post eclosión a 800 mg.L⁻¹. La mortalidad presentada en las ninfas eclosionadas se debe posiblemente al contacto con la molécula expuesta en la superficie de la caja de Petri, otro factor por el cual se puede presentar este tipo de mortalidades es toxicidad demorada según (O'Brien.R., 1960). 61

- Figura 29.* Impregnación por molécula AL184 a 800 mg.L⁻¹ A) huevos no eclosionados de *Rhodnius prolixus*, donde se aprecian embriones con distensión abdominal como signo de toxicidad por exposición a compuestos con naturaleza insecticida (Moretti, A. N. 2015) en comparación con los huevos viables del control negativo B). 62
- Figura 30.* Impregnación por molécula **AL185** A) huevos no eclosionados con embriones de *Rhodnius prolixus* en distensión abdominal **a**) como signo de toxicidad por exposición a compuestos con naturaleza insecticida (Moretti, A. N. 2015) así como inhibición de crecimiento. **B)** Inhibición de la eclosión y muerte post eclosión a 1500 ppm. La mortalidad presentada en las ninfas eclosionadas se debe posiblemente al contacto con la molécula expuesta en la superficie (O'Brien.R., 1960). 62
- Figura 31.* Control Positivo Deltametrina, se presentó inhibición de la eclosión en un 95 % de los huevos **A)** también mostró disminución de la tanización así como embriones de *Rhodnius prolixus* en distensión abdominal (Moretti, A. N. 2015) en **B), C)** y **D)** Mortalidad presentada en las ninfas eclosionadas por el contacto con la molécula expuesta en la superficie (O'Brien.R., 1960)..... 63

Resumen

Título: Evaluación de la actividad insecticida e inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) de 24 análogos sintéticos del alcaloide girgensohnina en huevos y ninfas de I (NI) y V (NV) estadio de *Rhodnius prolixus* stål 1859 (Hemíptera: Reduviidae: triatominae)*.

Autor: Juan Pablo Pabon González**

Palabras claves: *Rhodnius prolixus*, actividad insecticida, actividad ovicida, actividad locomotora, inhibición, análogos sintéticos.

Los Análogos sintéticos del alcaloide Girgensohnina han sido reportados en un estudio previo con actividad insecticida sobre vector del dengue *Aedes aegypti* en acción inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Carreño et al., 2014). En este trabajo fueron evaluados 24 análogos sintéticos del alcaloide Girgensohnina en ninfas de I y V estadio de *Rhodnius prolixus de la cepa de referencia* CINTROP-UIS, su mantenimiento alimenticio se realizó cada 8 días con aves de la especie *Gallus gallus*, la actividad insecticida se realizó con los métodos de aplicación tópica en terguitos/esternitos y exposición a superficies tratadas a diferentes dosis exploratorias (DE). Se determinaron las dosis letales (DL) por medio de análisis Probit para la moléculas con mayor porcentaje de mortalidad en DE, también se evaluó la actividad locomotora y ovicida de estas moléculas. Como resultados la mayor mortalidad para los análogos sintéticos fue: a 500 mg.L⁻¹ para molécula la AL119 con 65±2,6% en esternitos y AL184 con 46±0,5 % en terguitos. En la exposición a superficies tratadas la mayor mortalidad fue a 500mg.L⁻¹ por la molécula AL184 con 65±0% en superficie No porosa y de 18,75±0,5 % en superficie porosa. Para la AL119 las dosis letales fueron: DL₅₀ 489,1 ppm, DL₉₅ 1537 mg.L⁻¹ y para AL184 DL₅₀ 182,9 mg.L⁻¹, DL₉₅ 6228 mg.L⁻¹ en esternitos. En la actividad locomotora las ninfas presentaron hiperactividad con las moléculas AL114 y AL184 a 4640,09 y 6319,90 pixeles/área respectivamente. Por otro lado el análogo con mejor IC₅₀ concentración Inhibitoria 50 % de la enzima AChE fue AL185 con 8,78 µg/mL, para el caso de la actividad ovicida los compuestos generaron inhibición de la eclosión y muerte siendo la AL185 la molecula con mayor efecto inhibitorio de 83±4,8%. En conclusión los análogos sintéticos de Girgensohnina presentaron actividad insecticida y ovicida en ninfas de I estadio de *Rhodnius prolixus*.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jonny Edward Duque Luna, Doctor en Ciencias Biológicas

Abstract

Title: Evaluation of the insecticide activity and inhibitory of the acetilcolinesterase (AChE) enzyme of 24 synthetic analogs of the alcaloid girgensohnine in eggs and nines of I (NI) and V (NV) stage of *Rhodnius prolixus* stål 1859 (Hemiptera: Reduviidae: triatominae)*

Author: Juan Pablo Pabon González**

Key words: *Rhodnius prolixus* nymphs, insecticidal activity, ovicidal activity, locomotor activity, inhibition, synthetic analogues.

Synthetic analogs of the alkaloid Girgensohnina have been reported in a previous study with insecticidal activity on the *Aedes aegypti* dengue vector in inhibitory action on the enzyme acetylcholinesterase (AChE) (Carreño et al., 2014). In this work, 24 synthetic analogues of the alkaloid Girgensohnina in *Rhodnius prolixus* I and V stage nymphs of the CINTROP-UIS reference strain were evaluated. Their maintenance was carried out every 8 days with birds of the species *Gallus gallus*, insecticidal activity performed with tergite / sternite topical application methods and exposure to treated surfaces at different exploratory doses (ED). Lethal doses (LD) were determined by Probit analysis for the molecules with the highest mortality rate in ED, the locomotor and ovicidal activity of these molecules were also evaluated. As a result, the highest mortality for synthetic analogs was: at 500 mg.L⁻¹ per molecule the AL119 with 65 ± 2.6% in sternites and AL184 with 46 ± 0.5% in tergites. In the exposure to treated surfaces the highest mortality was at 500 mg.L⁻¹ for the AL184 molecule with 65 ± 0% in non-porous surface and of 18.75 ± 0.5% in porous surface. For AL119 the lethal doses were: LD₅₀ 489.1 mg.L⁻¹, LD₉₅ 1537 mg.L⁻¹ and for AL184 LD₅₀ 182.9 mg.L⁻¹, DL₉₅ 6228 mg.L⁻¹ in sternites. In the locomotor activity the nymphs presented hyperactivity with the molecules AL114 and AL184 at 4640.09 and 6319.90 Movement / area respectively. On the other hand, the analogue with the best IC₅₀ 50% inhibitory concentration of AChE enzyme was AL185 with 8.78 µg / mL, in the case of ovicidal activity the compounds generated inhibition of hatching and death with AL185 being 83±4,8%. Inhibition the best. In conclusion the synthetic analogs of Girgensohnina showed insecticidal and ovicidal activity in *Rhodnius prolixus* I stage nymphs.

* Work Degree

** Faculty of Science. School of Biology. Tutor: Jonny Edward Duque Luna, Doctor of Biological Sciences.

Introducción

El Chagas o Tripanosomiasis Americana es una de las enfermedades tropicales más importantes de Latino América según(Duthie MS et al., 2005)la importancia de esta parasitosis radica en su elevada prevalencia, grandes pérdidas económicas, incapacidad laboral y muerte repentina de personas aparentemente sanas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el mundo hay 18 millones de personas infectadas por *Tripanozoma cruzi*, anualmente se reportan cerca de 21.000 muertes, 300.000 nuevos casos de infección y se estima que alrededor de 100 millones de personas viven en zonas de alto riesgo (figura 1. A) (WHO Distribución., 2010; Schofield et al., 1994; Moncayo et al., 2003; OMS., 2002) la mayoría de ellas en América Latina (OMS., 2015).

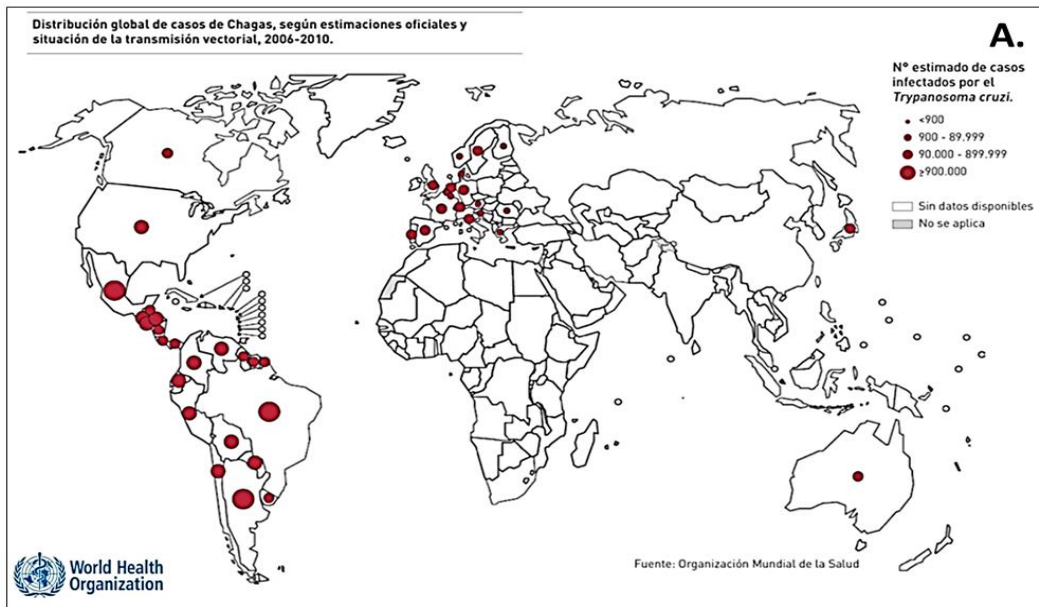
En Colombia, las zonas de riesgo de contagio con la enfermedad se han determinado de acuerdo a la presencia de los triatomos en las viviendas; a lo largo del valle del río Magdalena, la región del Catatumbo, la sierra nevada de Santa Marta, el piedemonte de los llanos orientales y la serranía de la Macarena. Los departamentos con mayor presencia de triatomos vectores de Chagas son: Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Casanare y Arauca con una prevalencia de la tripanosomiasis estimada entre 700.000 y 1.200.000 habitantes infectados y 8.000.000 en riesgo de adquirir la infección (Vega et al., 2014). En el departamento de Santander, la seroprevalencia es superior al 40% en algunas localidades (Zafra, German, et al., 2008; Hernández et al., 2009).

La principal vía de transmisión de la enfermedad es vectorial siendo en Colombia el triatomino hematófago *Rhodnius prolixus* el vector más importante de esta enfermedad (figura 1. B) (Bestetti

et al., 2013; Cuadros M.J., 2014; WHO., 2014) los parásitos penetran en el organismo cuando la persona picada se frota instintivamente y esparce las heces hacia la picadura, los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta, alcanzando los tejidos donde finalmente se establece (WHO., 2014).

La presentación clínica característica de la enfermedad consta de tres fases: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda, se caracteriza por alta parasitemia, con síntomas que incluyen fiebre, edema, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, miocarditis y/o meningoencefalitis. En la fase indeterminada, se disminuye la parasitemia y desaparecen las manifestaciones clínicas; ésta se detecta por métodos serológicos y finalmente, la fase crónica que consiste principalmente en cardiopatía o enfermedad digestiva, entre otras, puede manifestarse al cabo de 10 o más años entre el 20% y el 40% de los infectados. (Hernández et al., 2009; Nicholls, R. S et al., 2007).

A) Mapa de distribución global de Chagas 2006-2010.



B) Regiones de Colombia con la distribución de vectores más importantes de Chagas.

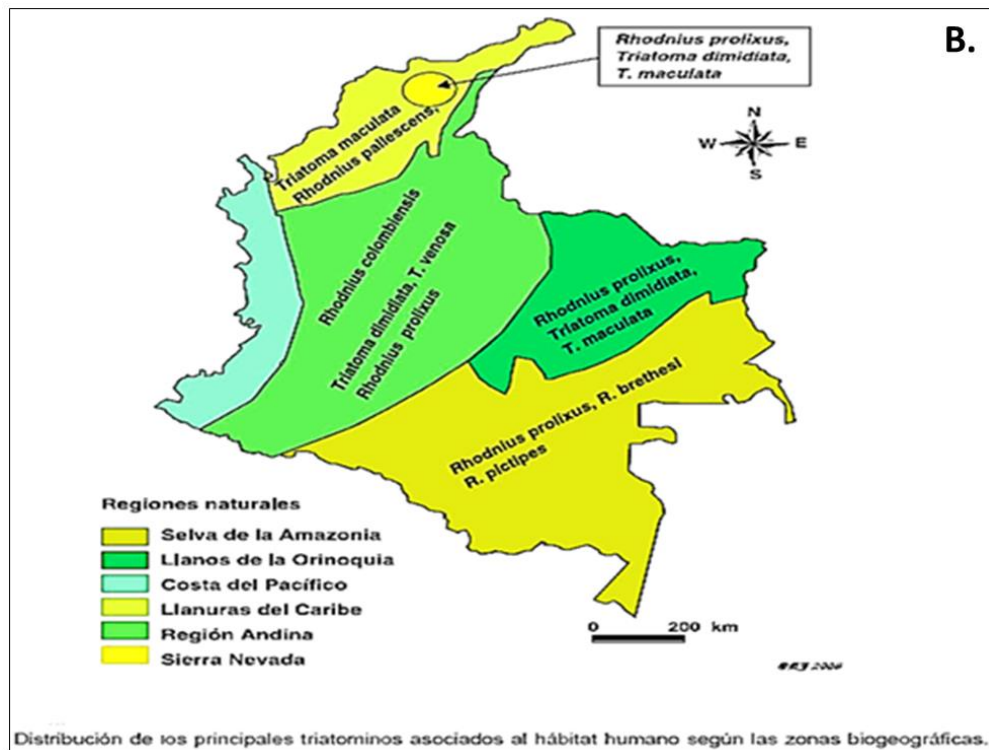


Figura 1. A) Distribución Global de casos de Chagas WHO 2010 B) Distribución de los principales triatomos asociados al hábitat humano según zonas biogeográficas en Colombia (Guhl F. et al., 2013).

1. Justificación

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana según la décima Clasificación Internacional de Enfermedades (C.I.E.B57-B57.5), es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (Moctezuma C M. et al 2015).

Debido a que la enfermedad de Chagas es una zoonosis, no se puede erradicar, además el número de reservorios animales hace que sea imposible eliminar todas las fuentes de infección, tampoco se dispone de medicamentos que puedan reducir las posibilidades de trasmisión. Desafortunadamente hasta el momento no existe vacuna para proteger las personas susceptibles; en consecuencia, el método más eficaz para prevenir la enfermedad de Chagas en América Latina es el control vectorial (Zambrano., et al 2014) utilizando insecticidas para eliminar los triatomíneos domiciliados con la fumigación que van desde agentes agroquímicos, organofosforados, carbamatos, nicotinoides, neonicotinoides y en su mayoría piretroides (Fontalvo et al., 2014) que generan afectación en los receptores nicotínicos de la acetilcolina (NACHR) y la Acetilcolinesterasa (AChE) induciendo la muerte del vector. Otra forma de control es el control cultural que busca educar en el riesgo y mejorar la calidad de la viviendas con el fin de reducir las áreas de establecimiento de las colonias, (OMS., 2003). A pesar de esto las políticas de control han sido insuficientes hasta el momento; no obstante el grave problema radica en que algunas especies como *Rhodnius prolixus* han presentado resistencia cruzada a insecticidas organoclorados y piretroides (T.N Bolívar et al., 2005; C. Barbu et al., 2009) (Mougabure-Cueto & Picollo., 2015).

A su vez la alta toxicidad para los humanos en el uso de estos compuestos genera preocupación y una gran necesidad de encontrar nuevas alternativas de control vectorial; más específicas, eficientes y menos tóxicas.

Una clara alternativa de nuevos compuestos son los análogos sintéticos al alcaloide girgensohnina los cuales fueron diseñados y sintetizados para potencializar su acción inhibitoria a nivel de la enzima AChE y han sido reportados en un estudio previo con actividad insecticida contra el vector del Dengue (Carreño *et al.*, 2014) con base en esto y a los pocos trabajos en síntesis de nuevas sustancias con propiedad insecticida en triatominos es que este proyecto se hizo relevante.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar la acción biocida de 24 análogos sintéticos del alcaloide Girgensohnina en *Rhodnius prolixus* stål 1859 (Hemíptera: Reduviidae: triatominae).

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la susceptibilidad de ninfas NI y NV de *Rhodnius prolixus* a 24 análogos sintéticos del alcaloide gingersohnina mediante topicación en tergitos y esternitos.

- Determinar la susceptibilidad de ninfas NI y NV de *Rhodnius prolixus* a análogos sintéticos del alcaloide gingersohnina aplicadas sobre superficies porosas y no porosas.
- Evaluar el efecto de las mejores moléculas con capacidad insecticida sobre la actividad locomotora de ninfas NI y NV de *Rhodnius prolixus*.
- Determinar las DL50 y DL95 NI y NV de *Rhodnius prolixus* frente a los análogos sintéticos de Girsensohnina con mayor porcentaje de mortalidad.
- Identificar in vitro la actividad inhibitoria de las moléculas sintetizadas del alcaloide girsensohnina frente a la enzima comercial AChE de *Rhodnius prolixus*.
- Determinar la actividad ovicida in vivo de *Rhodnius prolixus* de aquellas moléculas con mayor actividad inhibitoria de la AChE, así como calcular el porcentaje (%) de inhibición de la eclosión e intoxicación.

3. Competencias Desarrolladas

- a) Capacidad de mantener colonias vivas de *Rhodnius prolixus*, teniendo en cuenta su complejidad y relevancia biológica.
- b) Experticia en la evaluación de la susceptibilidad de ninfas de *Rhodnius prolixus* a los compuestos evaluados mediante topicación en terguitos, esternitos y superficies porosas y no porosas.
- c) Agudeza en la estimación de porcentajes de mortalidad entre el 5 y 95% de *Rhodnius prolixus* a los compuestos evaluados.

- d) Destreza en el manejo de programas de análisis estadísticos (análisis de varianza y Probit), mediante el software Statistic V11.
- e) Experiencia en la utilización del Monitor de Movimiento Múltiple del Software videomez V (Columbos OH) en la realización de análisis de locomoción.
- f) Competencias técnicas de evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de las moléculas sintetizadas del alcaloide Gingersohnina frente a la enzima AChE de *Rhodnius prolixus*.
- g) Experiencia en la evaluación de las moléculas y su efecto en la viabilidad, inhibición de la eclosión y malformaciones en huevos de *Rhodnius prolixus*.

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Material Biológico. Se utilizaron huevos y ninfas de la cepa de referencia de *Rhodnius prolixus* mantenida en el laboratorio hace más de diez años en el insectario de cría del CINTROP-UIS la cual se ha mantenido libre de contacto con insecticidas y bajo condiciones controladas de 25 ± 4 °C de temperatura, humedad relativa de $75 \pm 4\%$ y un fotoperiodo de 12:12 (figura 3). En los bioensayos se emplearon ninfas NI de 24 a 36 horas de edad, con ayuno desde la eclosión y un peso entre $0,6 \pm 0,1$ mg también ninfas NV recién mudadas con peso entre 142 ± 10 mg (figura 2) las cuales fueron alimentadas a los 7-8 días con sangre de ave de la especie (*Gallus gallus*) y 7-8 días después se emplearon en el ensayo.

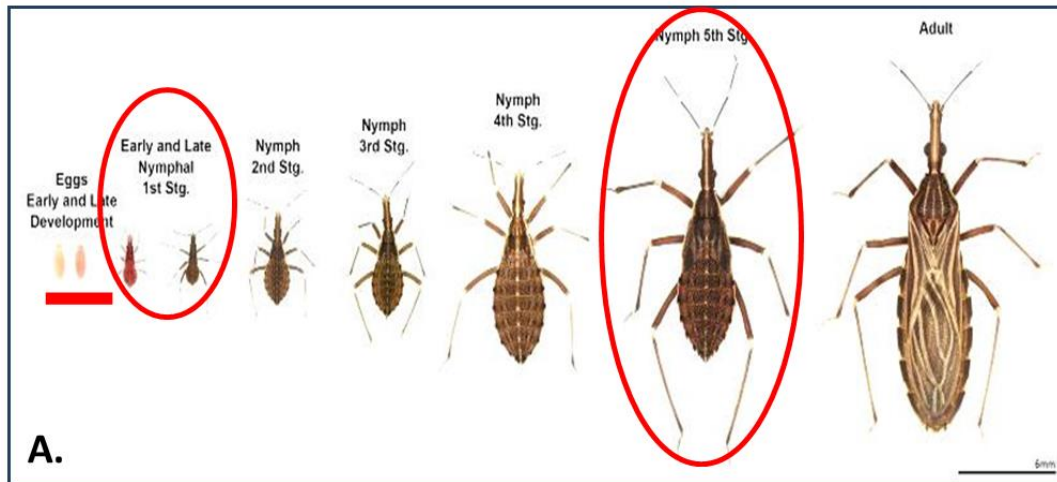


Figura 2. A) Ciclo de vida de *Rhodnius prolixus*, se señalan los huevos y estadios ninfales NI y NV con los cuales se desarrolló este trabajo (Galvao et al 2014).

Colonia de Triatominos *Rhodnius prolixus* CINTROP-UIS

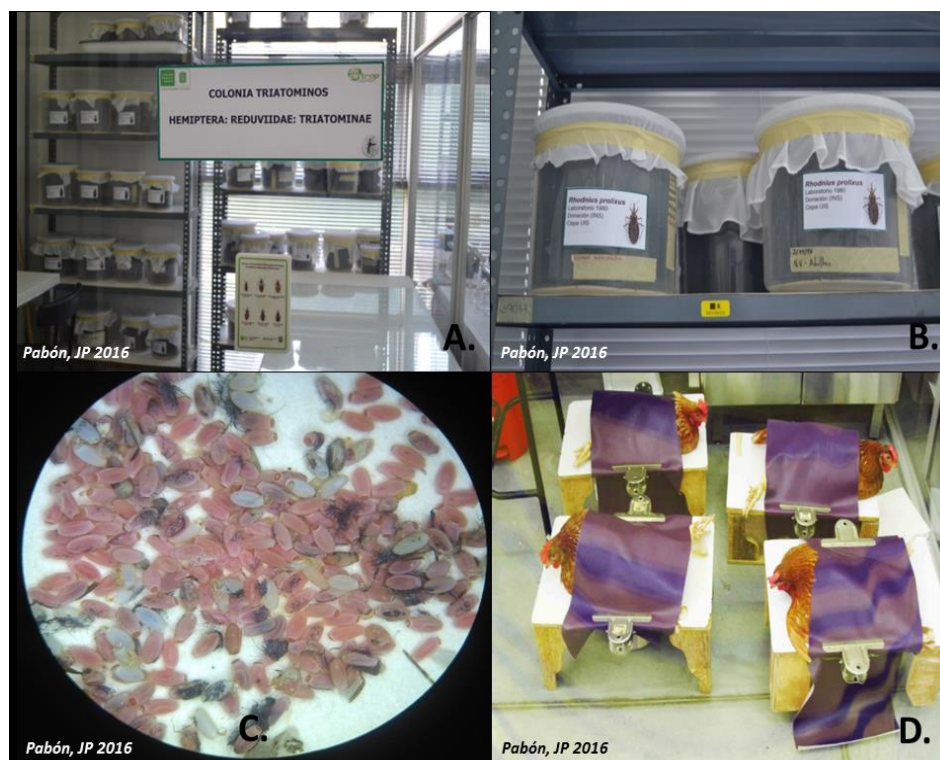


Figura 3. A) Y-B) Colonia de Triatominos *Rhodnius prolixus* en condiciones de laboratorio C) Huevos D) Proceso de alimentación de la colonia con aves de la especie *Gallus gallus*.

4.1.2. Material Químico. La Girgensohnina es un alcaloide cianogénico de origen natural con actividad insecticida capaz de inhibir a la AChE, se encuentra dentro de los metabolitos secundarios de las plantas que cumplen funciones de defensa (figura 4) (Hegnauer.,1977).

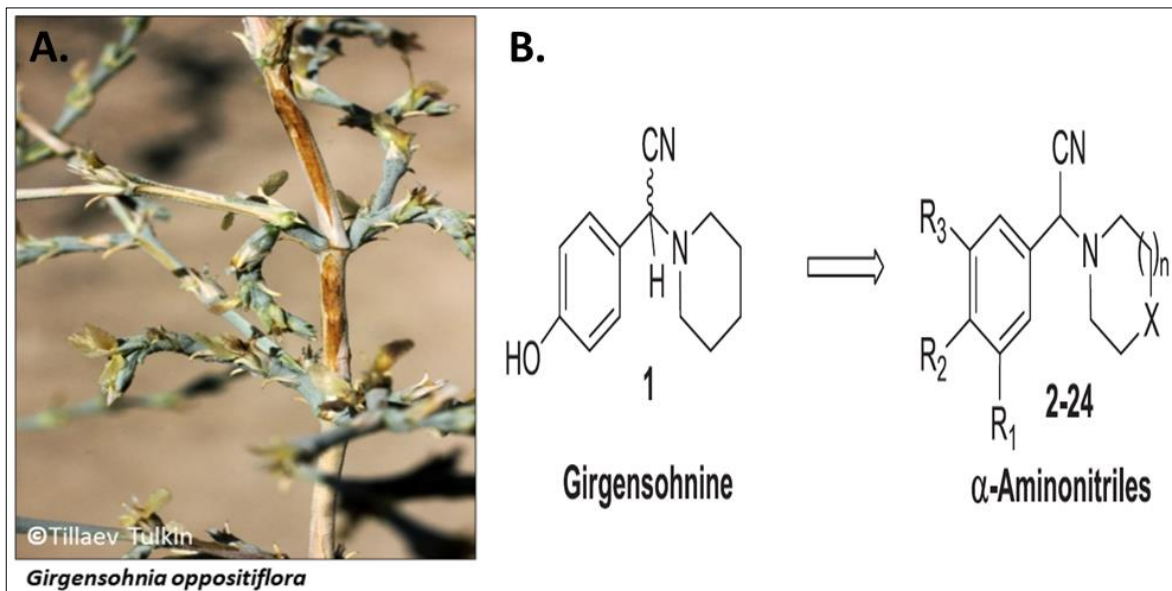


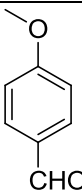
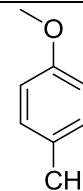
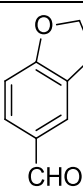
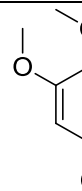
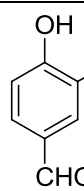
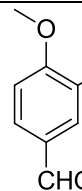
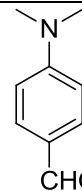
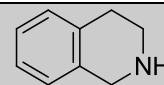
Figura 4. A) *Girgensohnia oppositiflora* (Amaranthaceae) planta de la que se obtiene la Girgensohnina este arbusto crece en Rusia y desiertos de Irán B) estructura de Girgensohnina y α -Aminonitrilos (Carreño Otero et al. 2014).

Se emplearon 24 α -Aminonitrilos, análogos del alcaloide girgensohnina como nuevos insecticidas a ensayar organizados en 5 grupos ver (Tablas 1, 2, 3, 4,5).

Análogos obtenidos a partir de la 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina

Tabla 1.

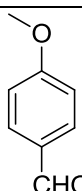
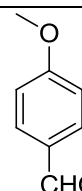
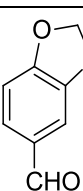
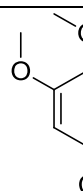
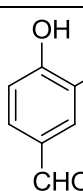
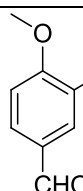
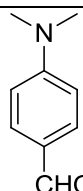
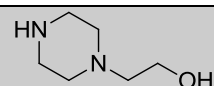
Grupo A: Análogos obtenidos a partir de la 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina.

Ensayo							
	AL119	AL113	AL114	AL116	AL118	AL117	AL126
Numeración	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>

Análogos obtenidos a partir de la 1-(2-hidroxietil) piperacina.

Tabla 2.

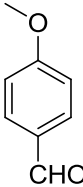
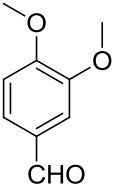
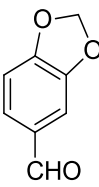
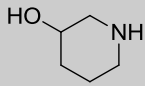
Grupo B: Análogos obtenidos a partir de la 1-(2-hidroxietil) piperacina.

Ensayo							
	AL134	AL131	AL132	AL135	AL136	AL137	AL138
Numeración	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>

Análogos obtenidos a partir de la 3-piperidinol.

Tabla 3.

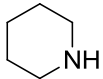


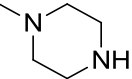
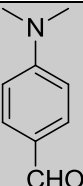
Grupo C: Análogos obtenidos a partir de la 3-piperidinol.

Ensayo			
	AL133	AL129	AL130
<u>Numeración</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>

Análogos obtenidos a partir del 4-dimetilaminobenzaldehído.

Tabla 4.

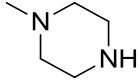
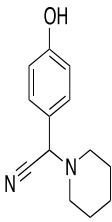
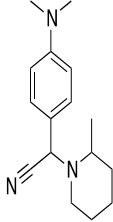
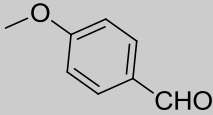
Grupo D: Análogos obtenidos a partir del 4-dimetilaminobenzaldehído.

Ensayo				
	AL124	AL123	AL1122	AL125
<u>Numeración</u>	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>	<u>21</u>

Análogos obtenidos a partir del p-metoxibenzaldehído.

Tabla 5.

Grupo E: Análogos obtenidos a partir del p-metoxibenzaldehído.

Ensayo			
	AL120	AL184 2-(4-Hidroxifenil)-2-(piperidin-1-il)acetonitrilo Formula molecular: C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O Peso molecular: 216,28 g/mol	AL185 2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-(2-metilpiperidin-1-il)acetonitrilo Formula molecular: C ₁₆ H ₂₃ N ₃ Molecular: 257,37 g/mol
<u>Numeración</u>	<u>22</u>	<u>23</u>	<u>24</u>

4.2. Metodología.

4.2.1. Evaluación De La Actividad Insecticida Screening.

4.2.2. Aplicación tópica. Se manejó el protocolo (OMS, 2005) modificado. Las Ninfas de NI y NV de *Rhodnius prolixus* se trataron de forma tópica con dosis exploratorias (DE) por cada uno de los 24 análogos sintéticos de girsensohnina y un insecticida comercial (Deltametrina al 99,1%). Cada análogo sintéticos fue diluido en acetona y aplicados con microgeringa Hamilton de 5 y 25 µl provista de descargador repetitivo. Para la manipulación de las ninfas se empleó el método de enfriamiento con hielo a 4°C por 2 minutos, para disminuir la motricidad del insecto temporalmente y permitir su manipulación sin afectar sus apéndices. La aplicación de los tratamientos se realizó sobre los terguitos y esternitos de cada ninfa de I y V estadio aplicando 0,1 y 0,5µl de las DE respectivamente.

En los experimentos se realizaron 4 repeticiones por dosis, evaluándose por cada replica 3 ninfas, para un total de 12 ninfas por dosis y 48 ninfas por bioensayo incluyendo los controles ver (figura 5). Cada bioensayo se realizó por triplicado en días diferentes. Las ninfas se colocaron en vasos plásticos de 1/2 onza, con papel plegado en su interior y cubiertos con tapas perforadas que permitieron la respiración de las ninfas. El registro de mortalidad se realizó a las 2, 12, 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. Ver (figura 6) (WHO., 1994; 2001; 2005).

Esquema metodológico de bioensayo por topicación repeticiones.

















Dosis Exploratorias En Ninfas		REPETICIONES				Nº NINFAS
NI	NV	R1	R2	R3	R4	-
25 mg.L ⁻¹	800 mg.L ⁻¹					12
125 mg.L ⁻¹	1000 mg.L ⁻¹					12
500 mg.L ⁻¹	1500 mg.L ⁻¹					12
Control (-) Acetona 0,1 µL	Control (-) Acetona 0,5µL					12
Totales		12	12	12	12	48

Figura 5. Esquema metodológico de bioensayo por topicación, número de ninfas por repeticiones, concentraciones a evaluar en dosis exploratorias (DE).

Esquema de protocolo de evaluación de efecto insecticida por topicación.

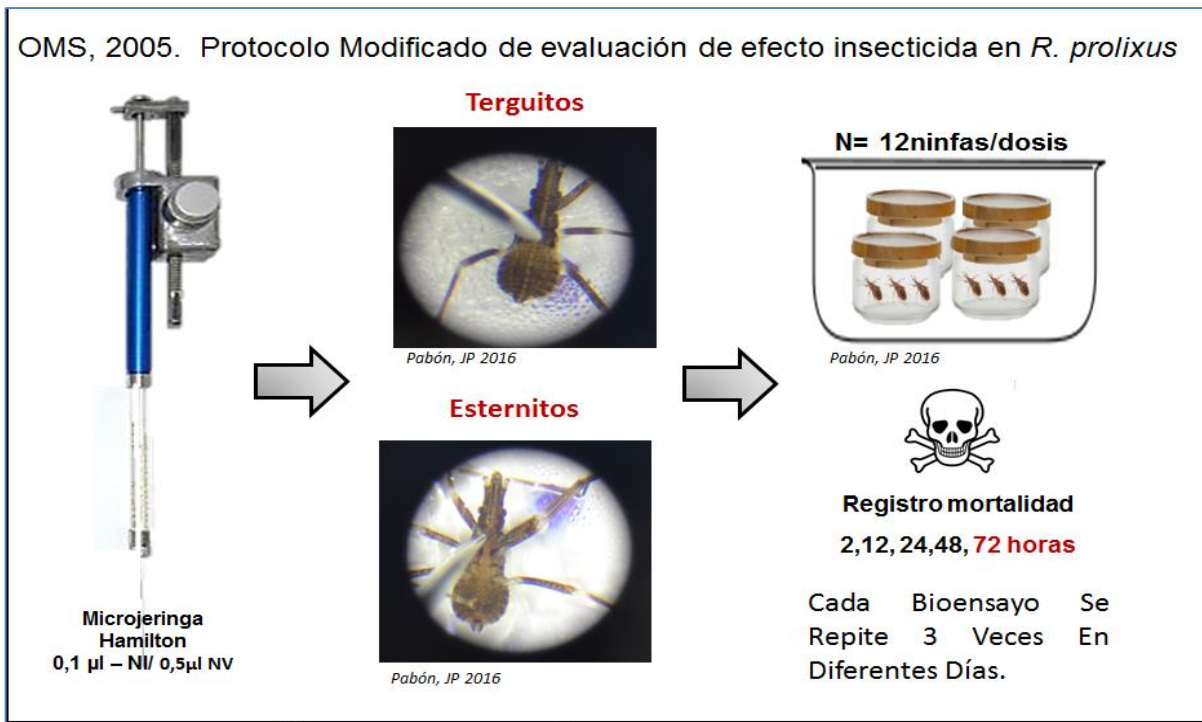


Figura 6. Esquema metodológico de bioensayo por topicación terguitos y esternitos, protocolo CINTROP-UIS.

Ejemplo 1: Cálculo de las concentraciones de control positivo a evaluar (Deltametrina al 99,1%). Se prepara solución Matriz 1 a una concentración de 2000 mg.L^{-1} : se pesó en una balanza analítica 10 mg de Deltametrina y llevó a un volumen de 5mL en un balón aforado usando acetona como solvente.

$$\frac{10 \text{ mg sustancia}}{5 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 2000 \text{ mg. L}^{-1}$$

La solución Matriz 2 a una concentración de 50 mg.L⁻¹: Utilizando la fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ se determina la cantidad a tomar de la solución Matriz 1 (de 2000 mg.L⁻¹) para obtener 500µL de solución con una concentración final de 50 mg.L⁻¹. A partir de la solución Matriz 2, se calculan las diferentes dosis exploratorias (las siguientes concentraciones se citan a manera de ejemplo):

1 mg.L⁻¹: Utilizando la fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ se determina la cantidad a tomar de la solución Matriz 2 (50 mg.L⁻¹) para obtener 500µL de solución con una concentración de 1 mg.L⁻¹. La preparación de las diferentes concentraciones se realizó de igual manera para las moléculas evaluadas, teniendo en cuenta su peso y la presentación de los mismos.

4.2.3. Bioensayos dosis letales (DL). Fueron seleccionadas las moléculas con mejor actividad insecticida en el “screening inicial”. Con base en esto se realizó una nueva batería de dosis múltiples asimétricas evaluadas por aplicación tópica con (95 mg.L⁻¹, 195 mg.L⁻¹, 295 mg.L⁻¹, 495 mg.L⁻¹, 695 mg.L⁻¹, 1000 mg.L⁻¹ para ninfas NI y (1525 mg.L⁻¹, 1550 mg.L⁻¹, 1650 mg.L⁻¹, 1750 mg.L⁻¹, 1850 mg.L⁻¹ y 2000 mg.L⁻¹) para ninfas NV, cuyos resultados de mortalidad dosis-respuesta a las 72 horas se utilizaron para determinar los parámetros estadísticos la DL₅₀ y DL₉₅ (Dosis Letales) con los respectivos intervalos de confianza mediante el análisis de probit.

4.2.4. Exposición a superficies tratadas

4.2.4.1. Impregnación de superficies porosas y no porosas. Para este bioensayo se utilizó material biológico con las mismas características descritas anteriormente y el material químico utilizado fueron las moléculas con la mejor actividad insecticida reportadas por el screening inicial (AL114, AL117, AL119, AL184, AL185) se emplearon cajas de Petri de vidrio de 5,7 cm de

diámetro, radio de 2,87 y a un área de $25,87\text{cm}^2$ para las de superficies no porosas y para las superficies porosas se les colocaron discos de papel de filtro cualitativo Whatman N° 1 ver (figura 7). La descarga de la sustancia a evaluar se realizó en forma espiralada homogénea hacia el centro, con un volumen tal que $16\ \mu\text{L}$ de dilución acuosa impregnaron cada $1\ \text{cm}^2$ de superficie siguiendo el protocolo (OMS, 2005) de acuerdo al diámetro de la caja empleada se calculó la cantidad en μL para una distribución uniforme de la sustancia a evaluar donde $25,87\text{cm}^2 \times 16\ \mu\text{L} / 1\ \text{cm}^2 = 414\ \mu\text{L}$ de Molécula por caja. Las superficies se dejaron secar durante 15 minutos debido a que el disolvente utilizado fue acetona, de esa forma las superficies ya sea Porosa o No porosa quedan impregnadas sólo con la molécula a probar.

Procedimiento.

La lectura de ejemplares muertos se realizó a las 24, 48 y 72 horas después de la aplicación del tratamiento. Se considera muertos los ejemplares que situados sobre un papel filtro no presente actividad locomotora propia, ya fuera en forma espontánea o al ser estimulado con un pincel o una pinza según lo establecido por el protocolo de evaluación de la actividad insecticida en triatominos de la Organización Mundial de la Salud (OMS., 2005).

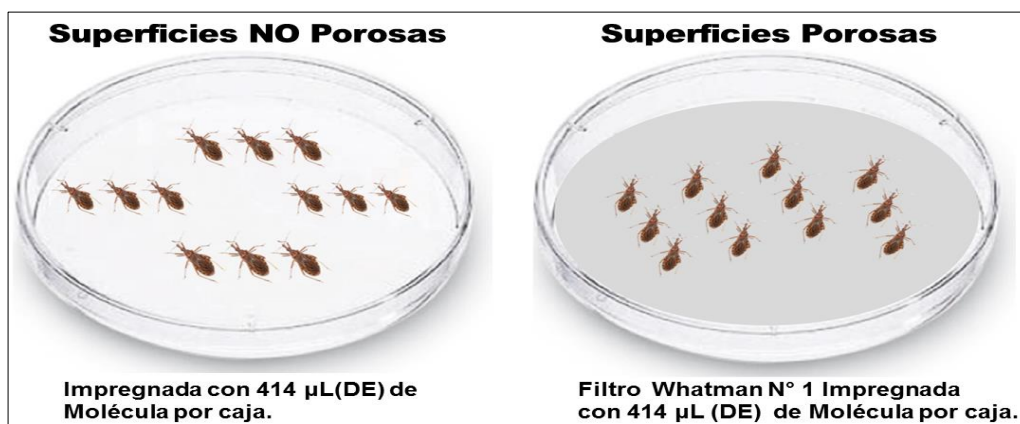


Figura 7. Esquema de distribución de ninfas en las superficies porosas y no porosas impregnadas con $414\ \mu\text{L}$ de las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184, AL185 y controles.

4.2.5. Actividad locomotora. Con este bioensayo se cuantificó el efecto de una sustancia insecticida sobre la actividad locomotora de ninfas N I y N V de *Rhodnius prolixus*.

Para evaluar la actividad locomotora de ninfas de triatomíneos expuestas a insecticidas, se empleó el analizador de imágenes en blanco y negro Videomex-V, Columbus Instruments, con una resolución de 256 x 192 pixels y una velocidad de adquisición y procesado de 30 cuadros por segundo. La videocámara captura la imagen de los insectos ubicados en una arena experimental (círculo de papel de filtro ubicado 10 cm por debajo de la videocámara). El analizador de imágenes convierte la señal analógica que recibe de la videocámara en datos digitales con una resolución de 256 x 192 píxeles y una velocidad de adquisición y procesamiento de 30 cuadros/segundo, e invierte los colores de la imagen. La presencia de los insectos sobre el papel de filtro es determinada por contraste visual entre sus cuerpos (que en el monitor se ven blancos [píxeles encendidos]) y el papel (que en el monitor se ven negro [píxeles apagados]) y es cuantificada a través del número de píxeles encendidos (que representa el área ocupada por la silueta del insecto). Para evitar ruido de fondo, el contraste de la imagen se graduó de tal manera que la cámara registrará únicamente el tórax y el abdomen de las ninfas.

Para cuantificar el movimiento de los insectos, el Videomex-V usó el software *Multiple Zone Motion Monitor* (Monitor de Múltiples Zonas de Movimiento) que compara imágenes consecutivas capturadas por la videocámara y registra el número de píxeles que cambian de “on” (encendido) a “off” (apagado) y viceversa. La suma de píxeles que cambian de estado durante el tiempo experimental es llamada *motion* (*M*, movimiento).

El software calcula el número promedio de píxeles “on” durante el tiempo experimental, parámetro que representa el área promedio ocupada por los insectos, el *área* (*A*). La iluminación fue provista por un bombillo de luz fría (22 watts) philips. La temperatura se mantuvo a 26 ± 2 °C. Cada

serie de datos fue importada y procesada en una computadora personal (Moretti, A. N., 2015). Al final de la sesión (30 minutos), el programa expresa la sumatoria de los pixeles que cambiaron de estado y la cantidad de pixeles encendidos en cada imagen, sumándolos y promediándolos por la cantidad de imágenes procesadas durante la sesión ver (figura 8). Los resultados se reportan en pixels/área o movimiento / area (Alzogaray, et al., 1996).

Para cuantificar la actividad locomotora se calculó el siguiente cociente (Alzogaray et al., 1997):
Actividad locomotora = M/A los resultados se expresan en unidades de pixeles/área.

Procedimiento.

La zona experimental constó de un anillo de acrílico de 7 cm de diámetro x 2 cm de alto, cuyo fondo fue cubierto con papel filtro tipo Whatman. La cámara de video se ubicará a una distancia prudente, con una fuente de iluminación proporcionada por un bombillo fluorescente de 22 W colocado encima del plano de la zona experimental con el fin de eliminar las sombras y obtener una buena resolución.

Para la evaluación de la actividad locomotora por topicación, tras la aplicación de las dosis del tratamiento a evaluar y el tratamiento control (acetona), las ninfas se depositaron en el fondo del aro de acrílico con el fin de registrar sus movimientos por un periodo de 30 minutos.

Cada experimento fue replicado 4 veces, después de la evaluación de los diferentes tratamientos, los ejemplares se descartaron en un frasco con alcohol. Los datos obtenidos se importaron para su posterior análisis (Moretti, A. N., 2015).

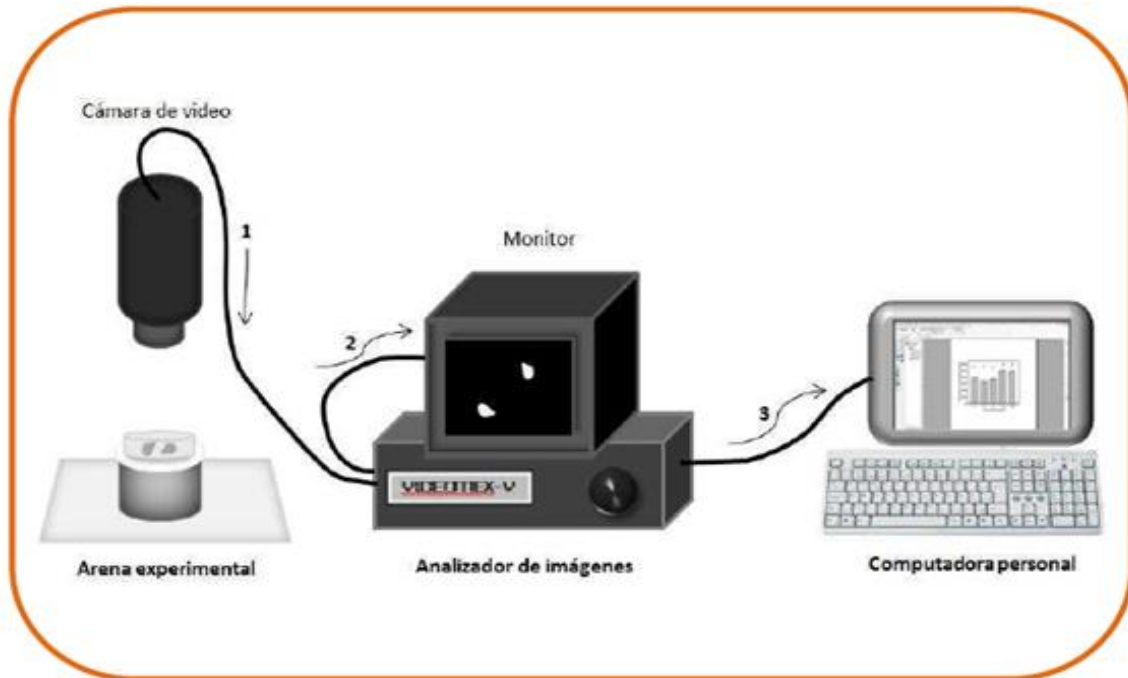


Figura 8. Esquema Del Analizador De Imagen Video- Mex. (Moretti, A. N., 2015)

4.2.6. Inhibición In Vitro de la enzima AChE

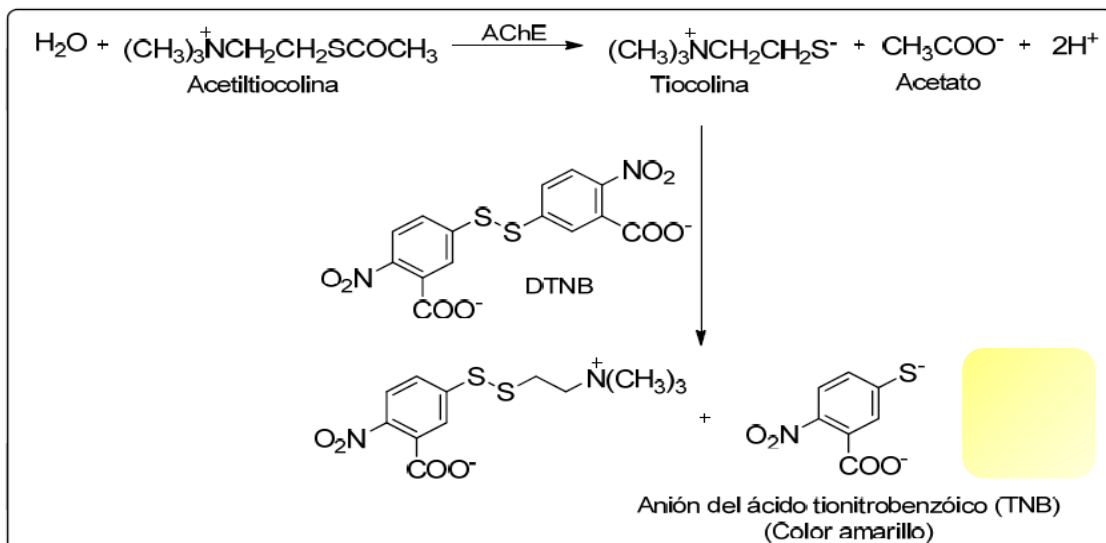


Figura 9. Esquema de reacción método (Ellman en 1961) utilizado para la determinación de la actividad de la Acetilcolinesterasa AChE.

El método Ellman (Figura 9) utilizado para la determinación de la actividad de la Acetilcolinesterasa AChE, fue elaborado por Ellman en 1961, se basa en un ensayo colorimétrico, donde en lugar de utilizar acetilcolina, compuesto que no presenta propiedades espectroscópicas características, se utiliza la acetiltiocolina como sustrato alternativo en la Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, para permitir su detección por medio de la absorción de la luz se acopla una reacción a la conversión. La acetiltiocolina se hidroliza por medio de la AChE, produciendo sus respectivos compuestos tiol, este es interceptado por el ácido 5,5´ditiobis [2-nitrobenzónico] (DTNB) formando un enlace bisulfuro y liberando el anión TNB de color amarillo. La formación de este compuesto se monitorea midiendo la absorción de la mezcla reaccionante a una longitud de onda definida (Ellman.,1961; Lopez S., B. et al.,2002).

La actividad enzimática se determinó mediante la lectura espectrofotométrica a 412 nm de la mezcla realizada entre muestra (disoluciones seriadas en buffer PBS), enzima AChE (0.25 mM en buffer fosfato) y buffer PBS (8 mM K₂HPO₄, 2.3 mM NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,6). Las placas fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se añadió a cada pocillo una solución de sustrato (0.1 M a 2HPO₄, 0.5 M ácido 5,5-ditiobis-[2-nitrobenzónico] (DTNB), 0.6 mM ioduro de acetilcolina (ACTI) en agua destilada, pH 7.5). Los compuestos se evaluaron por triplicado en disoluciones seriadas a partir de 100 µg/mL. Como inhibidores de referencia empleamos el fármaco Galanthamine con IC₅₀ de 0.30 µg/mL y el insecticida Diazinon con IC₅₀ de 0.57 µg/mL (Carreño Otero et al., 2014).

4.2.7. Determinar la actividad ovicida in vivo de *Rhodnius prolixus*. Se utilizaron huevos viables de *Rhodnius prolixus* con 72 horas y 96 horas de oviposición revisando anteriormente la etapa de embriogénesis (figuras 10,11) (Berni et al.,2014) estos se trataron de forma tópica con

las moléculas de mayor porcentaje de actividad insecticida reportadas por el screening inicial AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 y se aplicaron con microgeringa Hamilton de 5 y 25 μl provista de descargador repetitivo. La aplicación de los tratamientos se efectuó sobre la superficie del huevo aplicando 0,1 y 0,5 μl de las DE. a 25-125-500 mg.L^{-1} y 800 -1500 mg.L^{-1} respectivamente.

En este experimento se realizaron 4 repeticiones por dosis, evaluándose por cada replica 3 huevos, para un total de 12 huevos por dosis y 48 huevos por bioensayo

incluyendo los controles, cada bioensayo se realizó por triplicado en días diferentes. Después del tratamiento, los huevos se ubicaron en cajas de Petri cubiertos por tela porosa tipo tul y colocados en cavas de icopor para mantener la humedad relativa a ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 70-80 %HR). El registro de acción de las moléculas se realizó a los 2, 4, 6, 8, 10, 12,14 y16 días pos tratamiento, así como el porcentaje de eclosión y malformaciones (OMS, 2005).

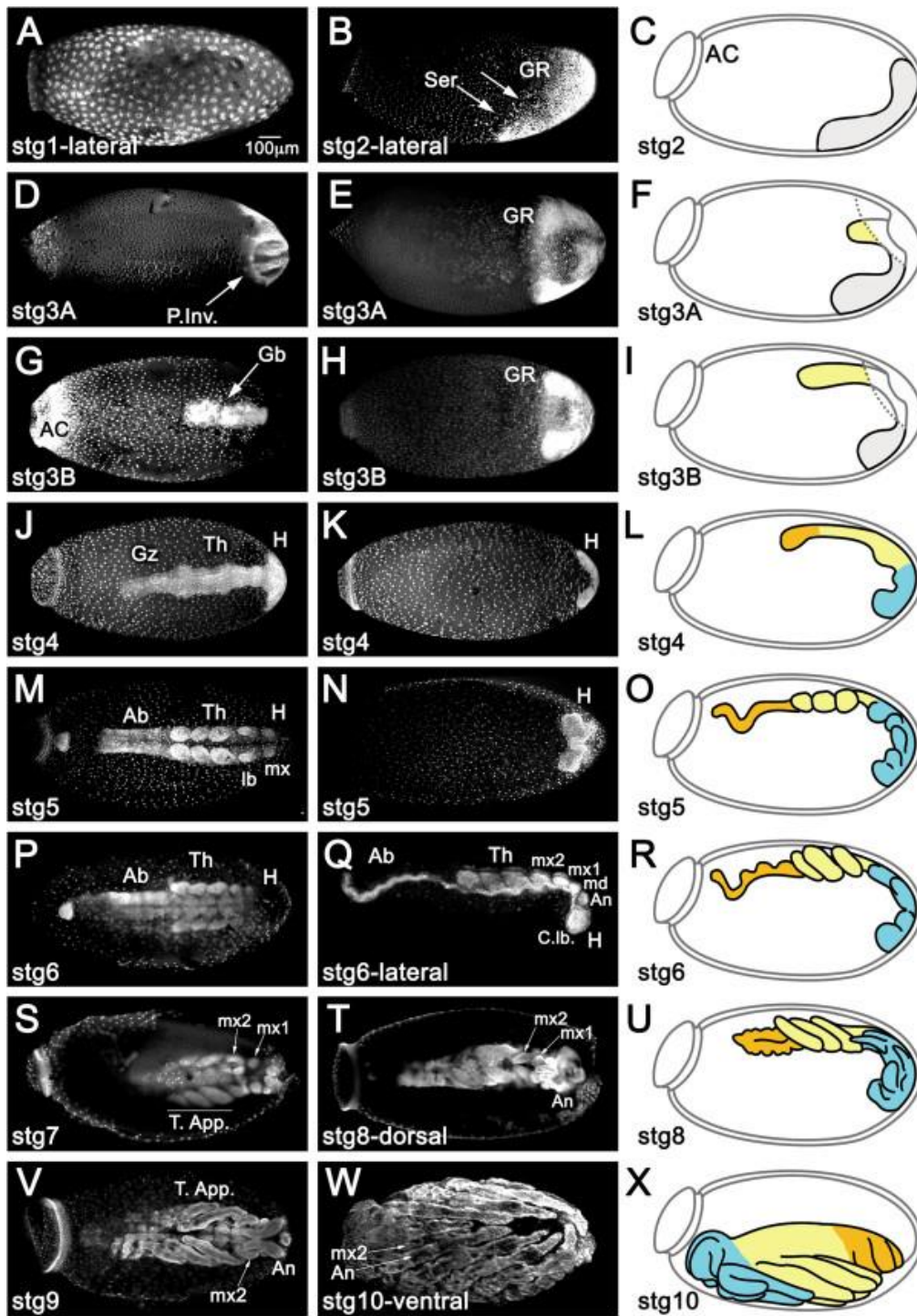
Etapas de embriogénesis en *Rhodnius prolixus*

Figura 10. Etapas de patrón prospectivo en la embriogénesis temprana de triatómimo *Rhodnius prolixus* (Berni et al., 2014).

Descripción de las etapas de embriogénesis en *Rhodnius prolixus*.

Las principales características de <i>Rhodnius</i> desarrollo embrionario hasta katatrepsis				
Periodo	Escenario	El tiempo de desarrollo a 28 ° C		Los rasgos característicos en su conjunto se monta
		horas	% *	
Escote	1A	0-6	1.8	Los núcleos se dividen internamente
	1B	6-12	3.6	Los núcleos llegar a la periferia
Blastodermo	2A	12-18	5.3	Formación de rudimento germen
	2B	18-24	7.1	Los núcleos se concentran progresivamente al posterior del huevo
gastrulación	3A	24-30	8.9	invaginación germen rudimento comienza
	3B	30-36	10.7	de extensión de banda germen
Segmentación	4	36-48	14.3	La segmentación anterior (en la cabeza y el tórax) comienza
	5	48-60	17.9	brotos de apéndices aparecen; no segmentado abdomen
	6	60-72	21.4	Apéndices crecen; abdomen segmentado; surco neural evidente
Crecimiento	7	72-84	25	apéndices torácicos se alargan, más grande que la cabeza apéndices
	8	84-96	26.6	apéndices antenales crecen sobre primeros apéndices maxilares
	9	96-108	32	Primeros apéndices superiores ocultos por los apéndices de las antenas; acorta embrión y ensancha (germen banda de retracción)
Katatrepsis y Cierre Dorsal	10	108-132	35	Al final de katatrepsis, ejes antero-posteriores de embriones y huevos coinciden; embrión cierra dorsalmente

*% Se refiere al total de desarrollo embrionario a 28 ° C.

Figura 11. Principales características de las etapas de patrón prospectivo en la embriogénesis temprana de *Rhodnius prolixus* (Berni et al., 2014) patrón de referencia para medir la viabilidad de los huevo evaluados en el trabajo.

4.2.8. Análisis estadístico. Los datos de mortalidad de las dosis-respuestas de los bioensayos en NI y NV se sometieron a los “test” de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, mean/std.dev Know), (Liliefors test, mean/std.dev unknow)(Shapiro-Wilk’s test). Para su posterior análisis, se realizó el test de Probit para determinar los parámetros estadísticos, dosis letales (DL50 y DL95) y sus respectivos intervalos de confianza para las moléculas con mejor actividad insecticida. Los

programas estadísticos que se utilizaron fueron “Statistica v11” y Probit (Finney, 1971; Raymond, 1985).

5. Resultados

5.1. Evaluación de la actividad insecticida

La mayor actividad insecticida se observó en las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 a las 72 horas a una concentración de 500 mg.L⁻¹ en los bioensayos por topicación de terguitos/esternitos y exposición a superficies tratadas ver (**figura 12-19**). Para el caso de las pruebas en huevos, se presentó inhibición de eclosión por impregnación con las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 a los 16 días siendo la molécula AL185 la que presentó mayor inhibición de la eclosión a concentraciones de 25 mg.L⁻¹, 125 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹, 800 mg.L⁻¹ y 1500 mg.L⁻¹, siendo 1500 mg.L⁻¹ la concentración en la que hubo mayor inhibición ver (**figura 22**), adicionalmente se observó signos de intoxicación en ninfas NI y NV en los bioensayos por topicación de terguitos/esternitos y exposición a superficies tratadas (**figuras 20, 21**) y en los huevos no eclosionados por exposición a las moléculas evaluadas ver (**figuras 27-34**).

No hubo mortalidad para los controles con Acetona para los tratamientos utilizados. Los datos no cumplieron con las premisas de normalidad y homogeneidad de varianza (Kolmogorov-Smirnov & Liliefors / Shapiro – Wilk) por lo cual todos los resultados se analizaron mediante los test no paramétricos de Kruskal-Wallis.

5.2. Mortalidad en Ninfas NI

Evaluación de la actividad insecticida en esternitos de *R. prolixus* NI.

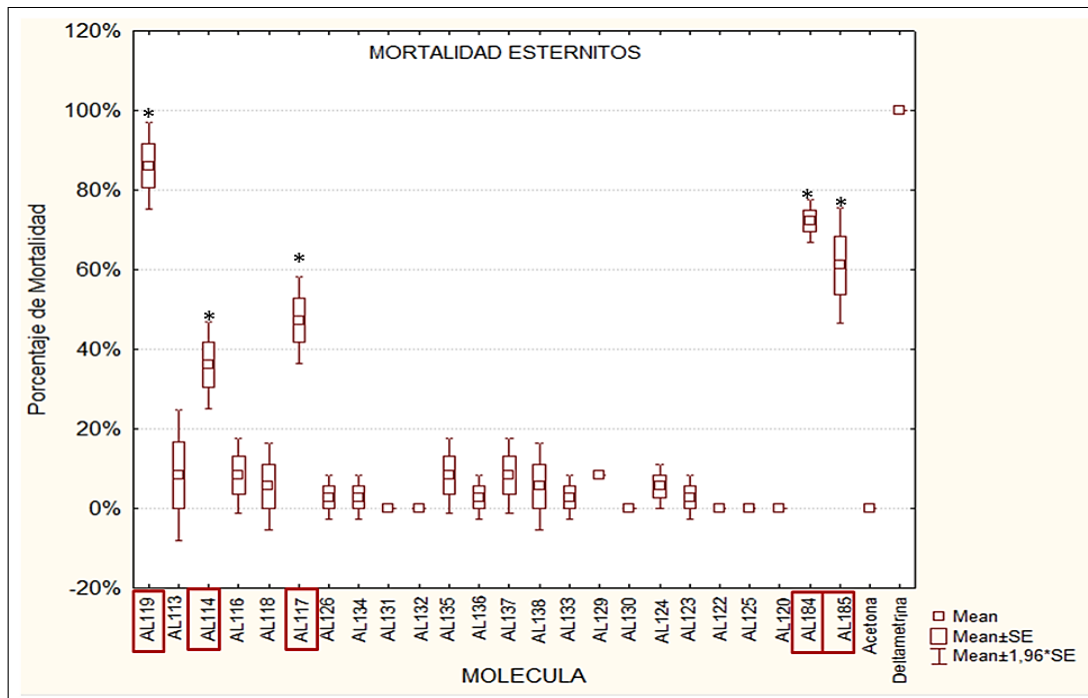


Figura 12. Muestra la actividad insecticida de los 24 análogos sintéticos de girsengonina a las 72 horas y 500 mg.L^{-1} en ninfas de I estadio de *Rhodnius prolixus* en la topicación de **esternitos**, se aplicó el Test de Kruskal-Wallis: $H(25, N= 78) = 59,04579$ $p = 0,0001$ los asteriscos representan las moléculas con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona), Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad esternitos NI (Spreadsheet2) Independent (grouping) variable Chi-Square = 45,91562 $df = 25$ $p = 0,0066$.

La moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida fueron: AL119, AL184, AL185, AL117 y AL114 con $85 \pm 2,6\%$, $66 \pm 2,7\%$, $64 \pm 3,4\%$, $45 \pm 1,4\%$ y $27 \pm 1\%$ por ciento de mortalidad siendo la AL119 la mejor molécula con $85 \pm 2,6\%$ de mortalidad presentado en este bioensayo.

Evaluación de la actividad insecticida en tergutitos de *R. prolixus* NI.

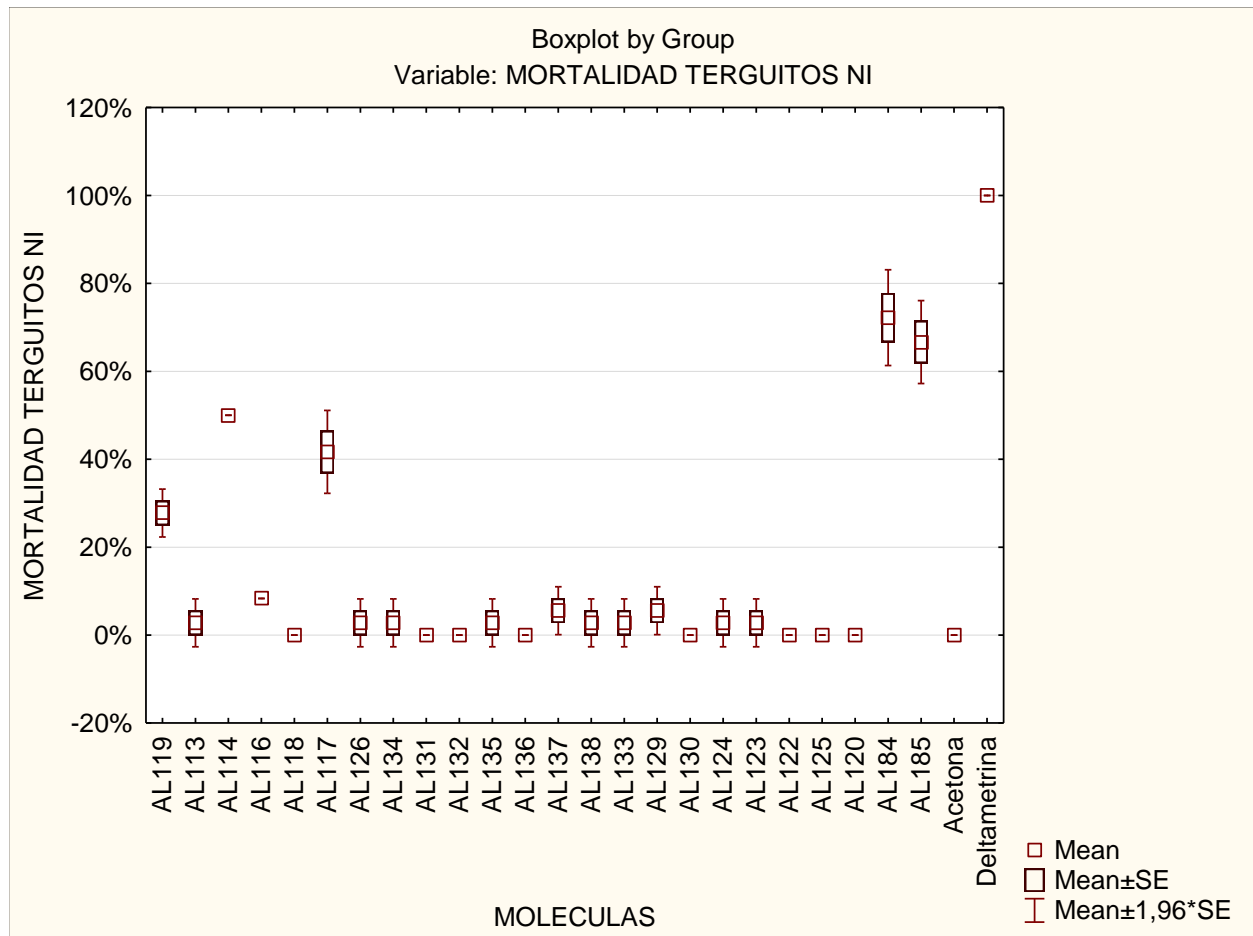


Figura 13. Muestra la actividad insecticida de los 24 análogos sintéticos a las 72 horas y 500 mg.L-1 en ninfas de I estadio de *Rhodnius prolixus* en la topicación de **tergutitos**, se aplicó el test de Kruskal-Wallis: $H(25, N=78) = 62,34683$ $p = 0,0000$ Median Test, Overall Median = 0,00000 los asteriscos representan las moléculas con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad Terguitos NI (Spreadsheet5) Independent (grouping) variable:MOLECULAS Chi-Square = 50,68687 $df = 25$ $p = 0,0018$. Las moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida fueron: AL184, L185, AL117, AL114 y AL119 con $67 \pm 0,07\%$, $63 \pm 0,06\%$, $29 \pm 0,1\%$, $38 \pm 0\%$, $21 \pm 0,04\%$, por ciento de mortalidad siendo la AL184 la mejor molécula con $67 \pm 0,07\%$ de mortalidad presentado en este bioensayo.

Mortalidad En Ninfas NV

Evaluación de la actividad insecticida en esternitos de *R. prolixus* NV.

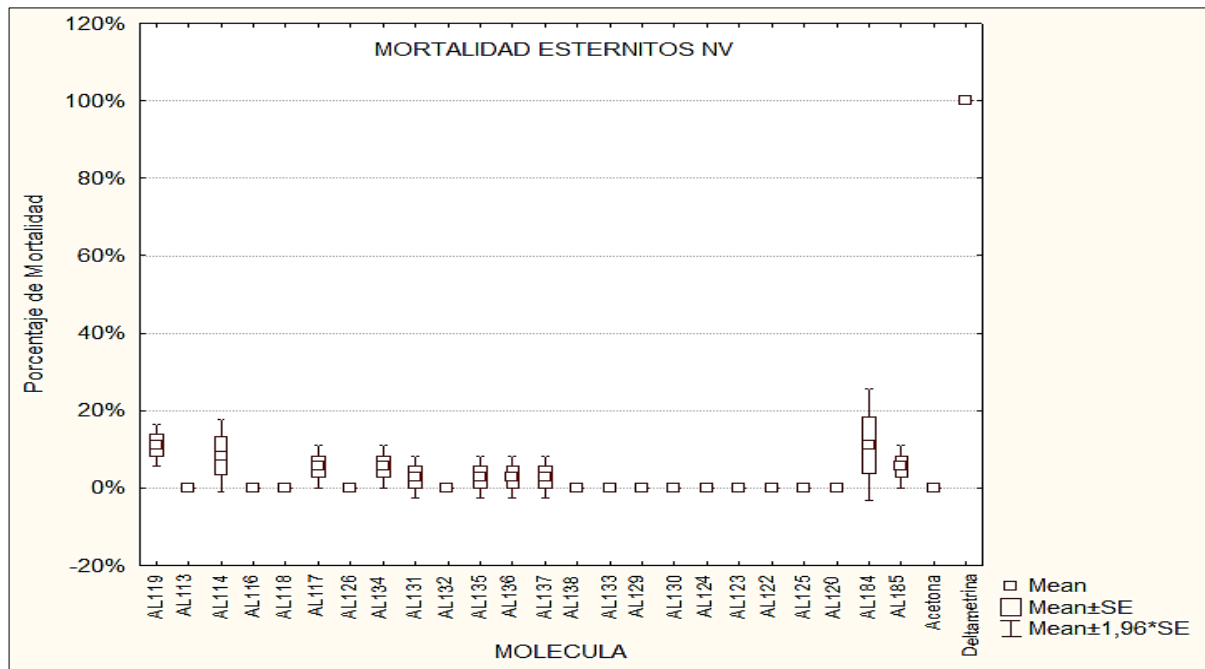


Figura 14. Actividad insecticida de los 24 análogos sintéticos a las 72 horas y 1500 mg.L^{-1} en ninfas de V estadio de *Rhodnius prolixus* en la topicación de **Esternitos**, se aplicó el Test de Kruskal-Wallis: $H(25, N=78) = 49,14073$ $p = 0,0027$ en este caso las moléculas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad esternitos NV (Spreadsheet2) Independent (grouping) variable: MOLECULA Chi-Square = 46,53103 df = 25 $p = 0,0056$. La moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida fueron: AL184, AL119 y AL114 con $8 \pm 0,1\%$, $7 \pm 0,04\%$ y $6 \pm 0,07\%$ por ciento de mortalidad siendo la AL184 la mejor moléculas con $8 \pm 0,1\%$ de mortalidad presentado en este bioensayo.

Evaluación de la actividad insecticida en terguitos de *R. prolixus* NV

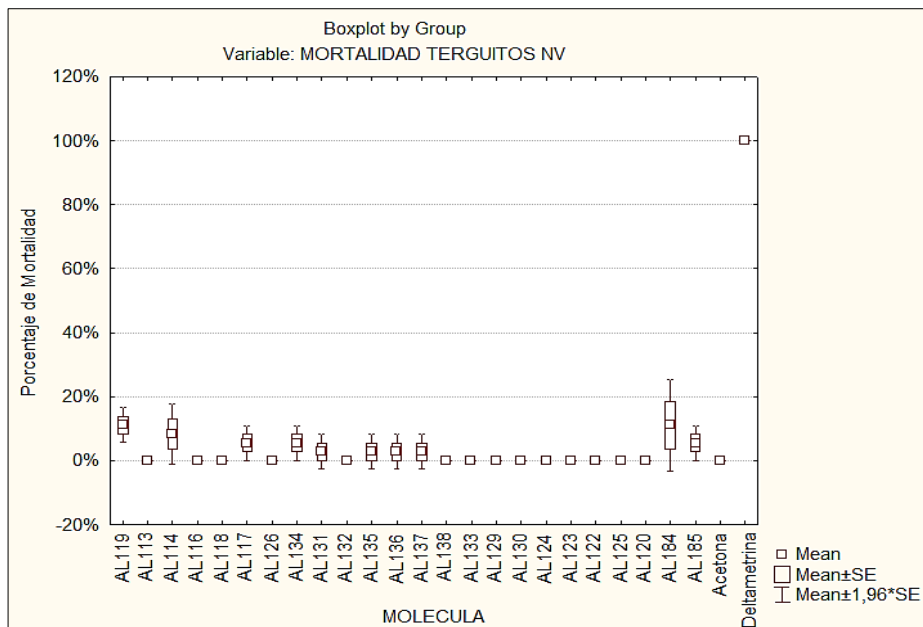


Figura 15. Muestra la actividad insecticida de los 24 análogos sintéticos a las 72 horas y 1500 mg.L⁻¹ en ninfas de V estadio de *Rhodnius prolixus* en la topicación de **Terguitos**. Test de Kruskal-Wallis: $H(25, N=78) = 49,14073$ $p = 0,0027$ en este caso las moléculas con presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad Terguitos NV (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: MOLECULA Chi-Square = 55,46667 df = 25 $p = 0,0004$. Las moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida fueron: AL184, AL119 y AL114 con $6 \pm 0,0\%$; $4 \pm 0,04\%$; $3 \pm 0\%$ por ciento de mortalidad siendo la AL184 la mejor moléculas con $6 \pm 0,0\%$ de mortalidad presentado en este bioensayo.

5.3. Bioensayos dosis letales

Dosis letales DL₅₀ y DL₉₅ (ppm) bioensayo en **esternitos** de la mejores moléculas con actividad insecticida: AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 a las 72 h en ninfas I estadio de *Rhodnius prolixus*.; con Intervalos de confianza de (95%). **DL₅₀**: dosis letal que causa la mortalidad al 50% de las ninfas expuestas al tratamiento. **DL₉₅**: dosis letal que causa la mortalidad al 95% de las ninfas expuestas al tratamiento. **X²**: Chi-cuadrado (Tablas 6 y 7).

Dosis Letales Esternitos NI

Tabla 6.

En esternitos las mejores DL₅₀ y DL₉₅ las presento la molécula AL184 con 182,9 mg.L⁻¹ y 6228,9 mg.L⁻¹ debido a que son las concentraciones más bajas, es decir que se requiere una dosis más baja de compuesto para eliminar entre el 50 y 95 % de las ninfas evaluadas.

MOLECULA	DOSIS LETALES ESTERNITOS (mg.L ⁻¹)		X ²
	DL ₅₀	DL ₉₅	
AL 114	336,065 (226,00-568,34)	9642 (3446,7-7155,9)	3,17
AL 117	707,9 (427,8-1859,5)	33049,4 (7281-1399738)	2,98
AL 119	489,1 (323,3-927,4)	15377 (4671,7-213093)	2,54
AL 184	182,9 (114,3-276,5)	6228,9 (3631,1-30248)	2,06
AL185	647,2 (473,7-1004)	9513 (3950-62216)	2,42

Dosis Letales Terguitos

Tabla 7.

En tergutitos las mejores DL₅₀ y DL₉₅ las presento la molécula AL184 con 526,4mg.L⁻¹ y 4898 mg.L⁻¹ debido a que son las concentraciones más bajas, es decir que se requiere una dosis más baja de compuesto para eliminar entre el 50 y 95 % de las ninfas evaluadas.

MOLECULA	DOSIS LETALES TERGUITOS(ppm)		X ²
	DL ₅₀	DL ₉₅	
AL 114	883 (632.7-1563.1)	15810 (5695.4-146915)	4.45
AL 117	857,2 (568,2-1681,1)	31703 (9140-454116)	1,01
AL 119	600,2 (438,7-946,8)	11600,4 (4753,1-60054,6)	2,29
AL 184	526,4 (405,1-704,7)	4898 (2425,3-25130)	2,62
AL185	10206,3 (791,8-20881,7)	28922 (8009,2-673534)	1,15

5.4. Exposición a superficies tratadas

5.4.1. Impregnación de superficies porosas y no porosas

Actividad Insecticida En Superficies No Porosas Ninfas NI

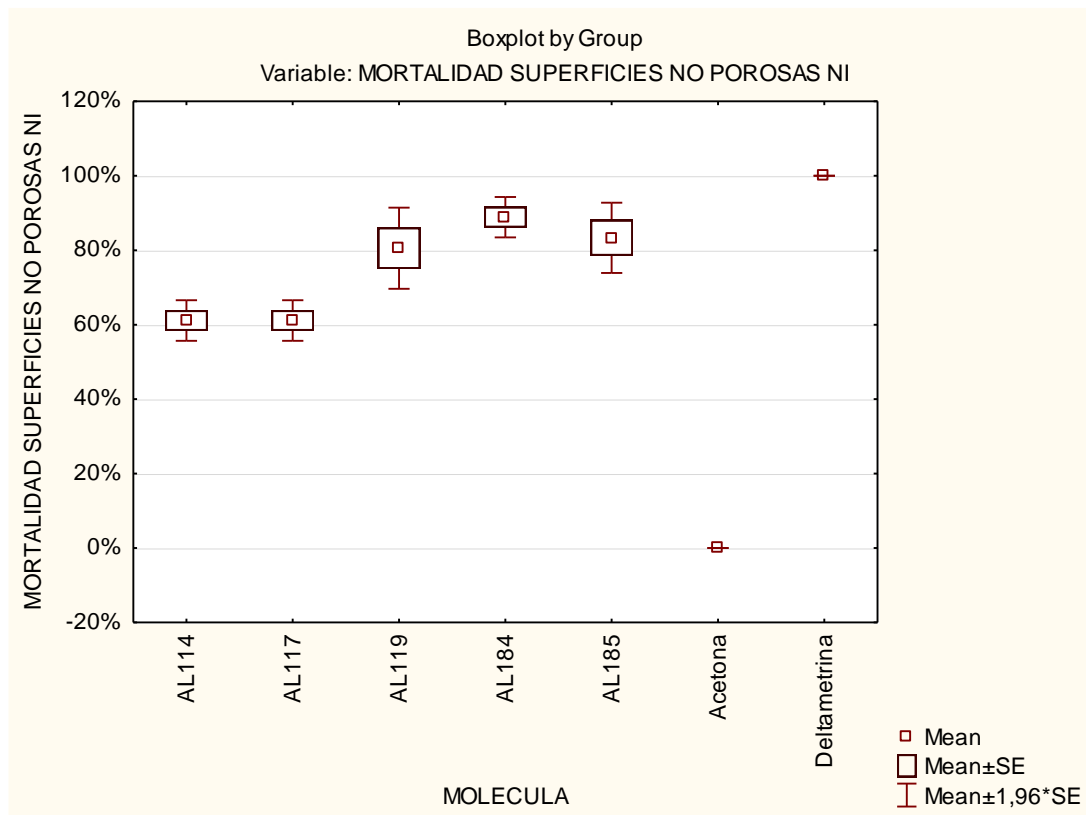


Figura 16. Actividad insecticida de las moléculas AL184, AL185, AL119, AL114 y AL117 a las 72 horas y 500 mg.L-1 en ninfas de I estadio de *Rhodnius prolixus* en la exposición a superficies No Porosas. Test de Kruskal-Wallis $H(6, N=21) = 18,58344$ $p = ,0049$ en este caso las moléculas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median Test, Overall Median = ,750000; MORTALIDAD SUPERFICIES NO POROSAS NI (Spreadsheet10) Independent (grouping) variable: MOLECULA Chi-Square = 15,55556 df = 6 $p = ,0164$. La moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida en el bioensayo de superficies no porosas fueron: AL184, AL185, AL119, AL114 y AL117 con $67 \pm 0,03\%$; $63 \pm 0,06\%$; $60 \pm 0,07\%$; $52 \pm 0,03\%$, $46 \pm 0,03\%$, porcentaje de mortalidad siendo la AL184 la mejor moléculas con $67 \pm 0,03\%$ de mortalidad presentado en este bioensayo.

Actividad Insecticida En Superficies Porosas Ninfas NI

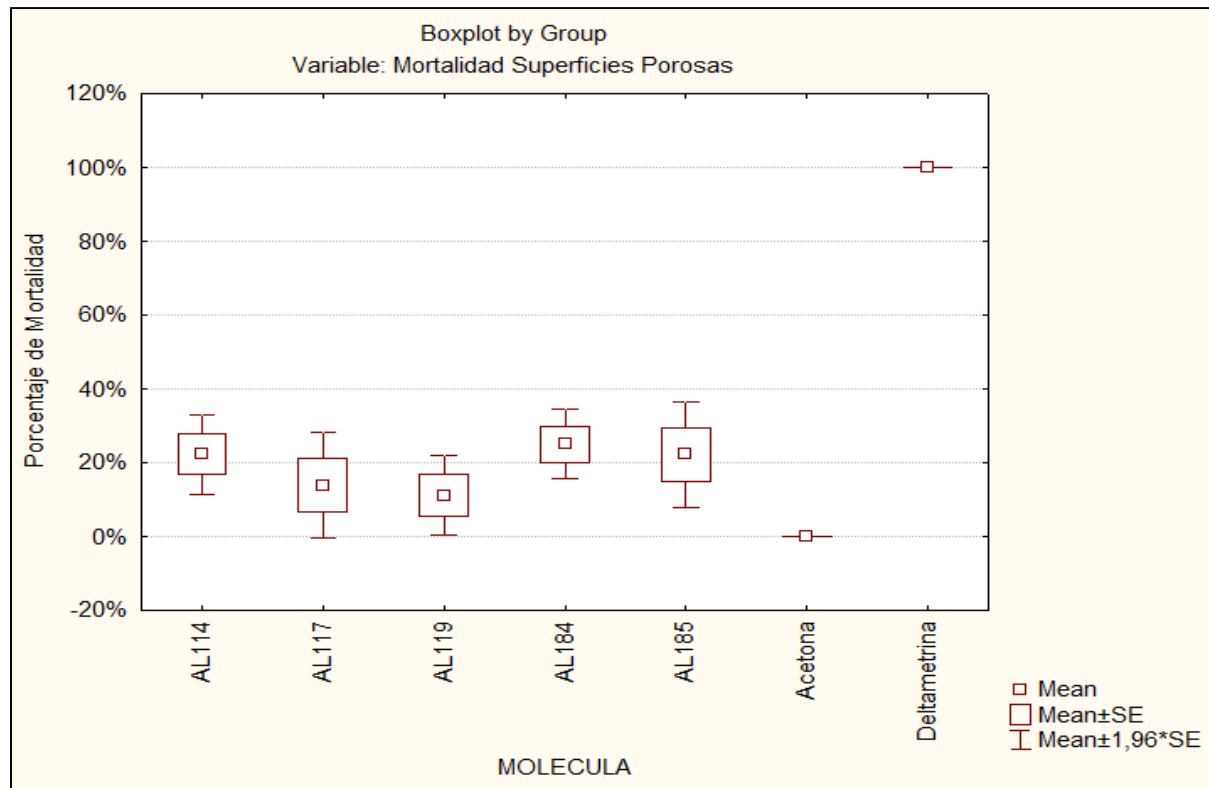


Figura 17. Actividad insecticida de las moléculas AL184, AL185, AL114, AL117 y AL119 a las 72 horas y 500 mg.L^{-1} en ninfas de I estadio de *Rhodnius prolixus* en la exposición a **superficies Porosas**. Test de Kruskal-Wallis $H(6, N=21) = 14,02580$ $p = 0,0294$ en este caso las moléculas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,166666; Mortalidad Porosas NI (Spreadsheet14) Independent (grouping) variable: MOLECULA Chi-Square = 10,11111 df = 6 $p = 0,1201$. La moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida en el bioensayo de superficies no porosas fueron: AL184, AL185, AL114, AL117 y AL119 con $19 \pm 0,06\%$; $17 \pm 0,1\%$; $17 \pm 0,07\%$; $10 \pm 0,1\%$; $8 \pm 0,1\%$, por ciento de mortalidad siendo la AL184 la mejor moléculas con $19 \pm 0,06\%$ de mortalidad presentado en este bioensayo.

5.4.2. Mortalidad En Superficies De Ninfas NV.

Actividad Insecticida En Superficies No Porosas Ninfas NV

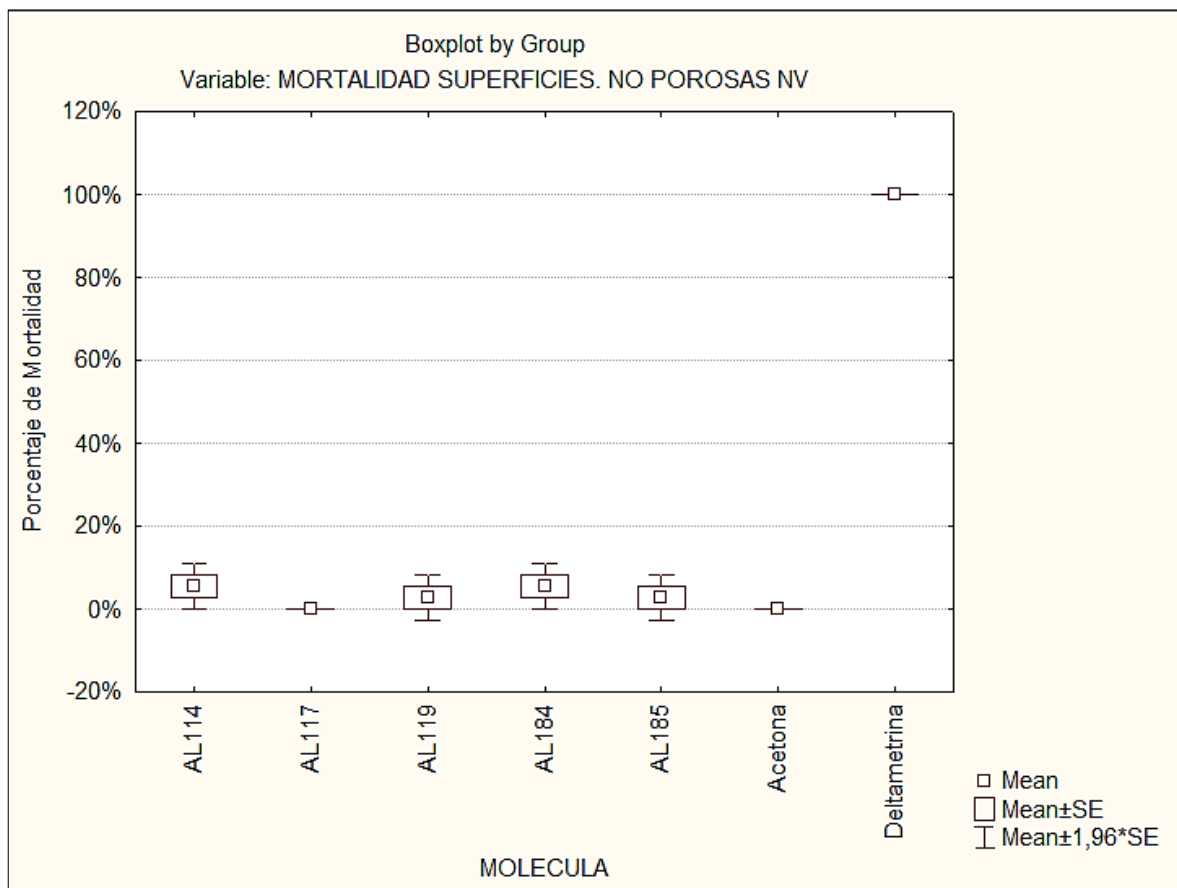


Figura 18. Actividad insecticida de las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 a las 72 horas y 500 mg.L^{-1} en ninfas de V estadio de *Rhodnius prolixus* en la exposición a **superficies No Porosas**. Test de Kruskal-Wallis $H(6, N=21) = 12,88889$ $p = 0,0448$ en este caso las moléculas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad No Porosas NV (Spreadsheet19) Independent (grouping) variable: MOLECULA Chi-Square = 10,11111 $df = 6$ $p = 0,1201$. La moléculas con mayor porcentaje de actividad insecticida en el bioensayo de superficies no porosas fueron: AL184, AL185, AL119 y AL117 con $4 \pm 0,03\%$; $4 \pm 0,03\%$; $2 \pm 0\%$; $2 \pm 0\%$ y 0% por ciento de mortalidad siendo la AL114 la mejor moléculas con $4 \pm 0,03\%$ de mortalidad presentado en este bioensayo.

Actividad Insecticida En Superficies Porosas Ninfas NV

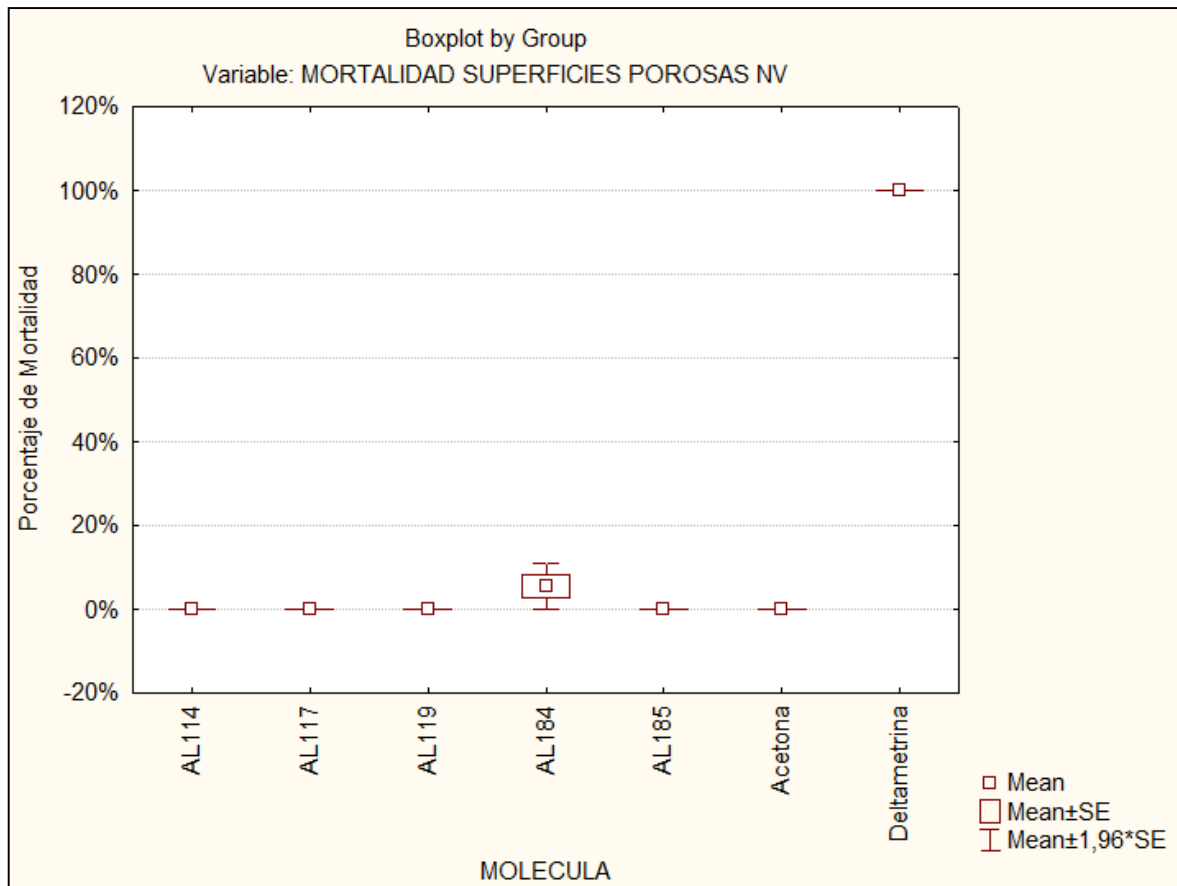


Figura 19. Actividad insecticida de las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 a las 72 horas y 500 mg.L^{-1} en ninfas de V estadio de *Rhodnius prolixus* en la exposición a **superficies Porosas**. Test de Kruskal-Wallis $H(6, N=21) = 17,47368$ $p = 0,0077$ en este caso las moléculas No presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona). Median Test, Overall Median = 0,00000; Mortalidad Porosas NV (Spreadsheet24) Independent (grouping) variable: MOLECULAS Chi-Square = 17,32500 df = 6 $p = 0,0082$. Los porcentajes de mortalidad en superficies porosas fueron: AL114, AL184, AL185, AL119 y AL117 con 0%; 0%; 0%; 0% y 0% por ciento de mortalidad presentado en este bioensayo.

5.4.3. Signos De Intoxicación

Comportamientos Por Intoxicación



Figura 20. Durante el bioensayo en las superficies no porosas se observó agrupamientos de las ninfas NI como reacción al contacto con las moléculas probadas.

Distensión Abdominal En Ninfas NI Y NV Por Exposición A Los Compuestos Evaluados.

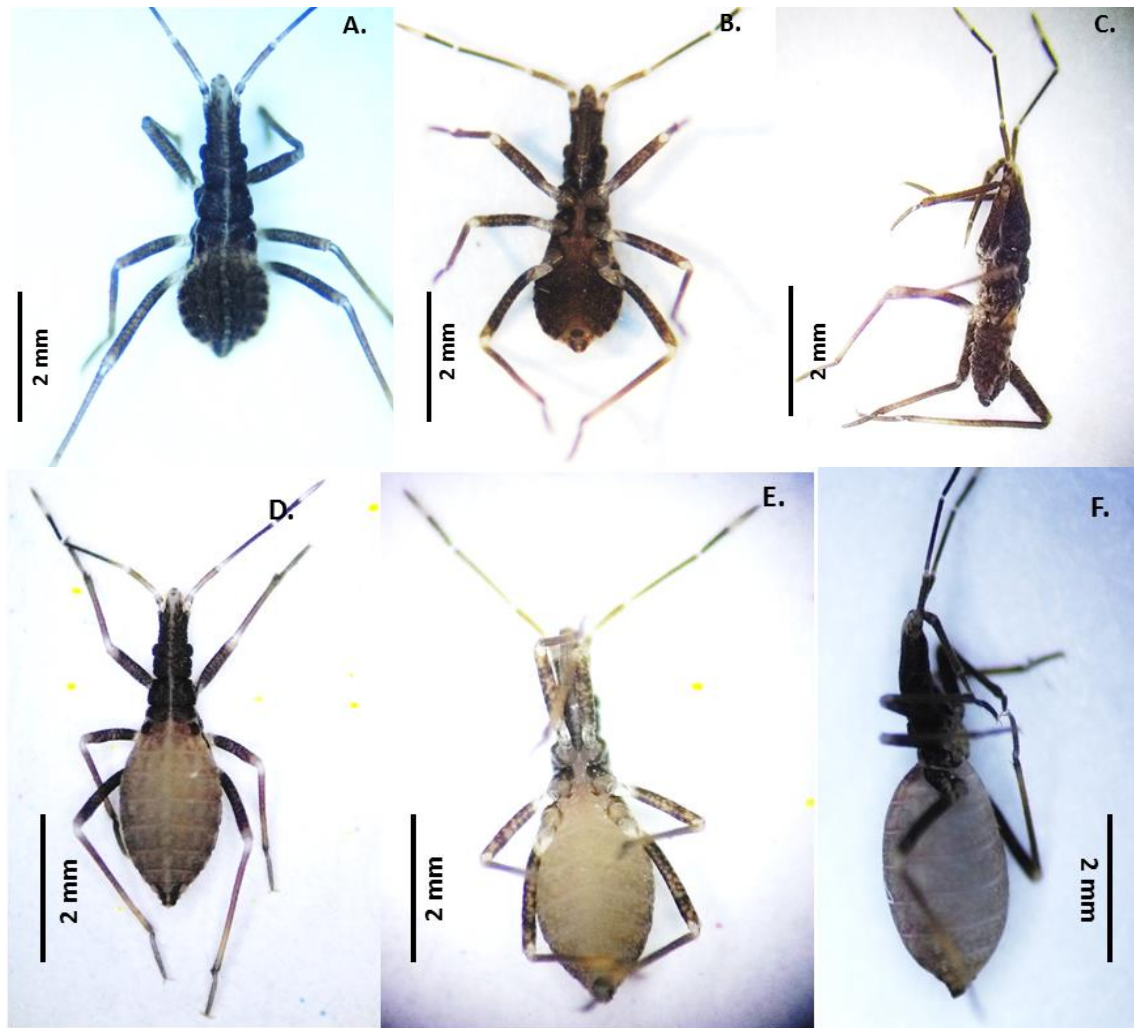


Figura 21 (A- B.-C.) Vista posterior, anterior y lateral de ninfas NI del control negativo en comparación con ninfas NV (D.- E.-F.) en **distensión abdominal** en por exposición a los compuestos evaluados

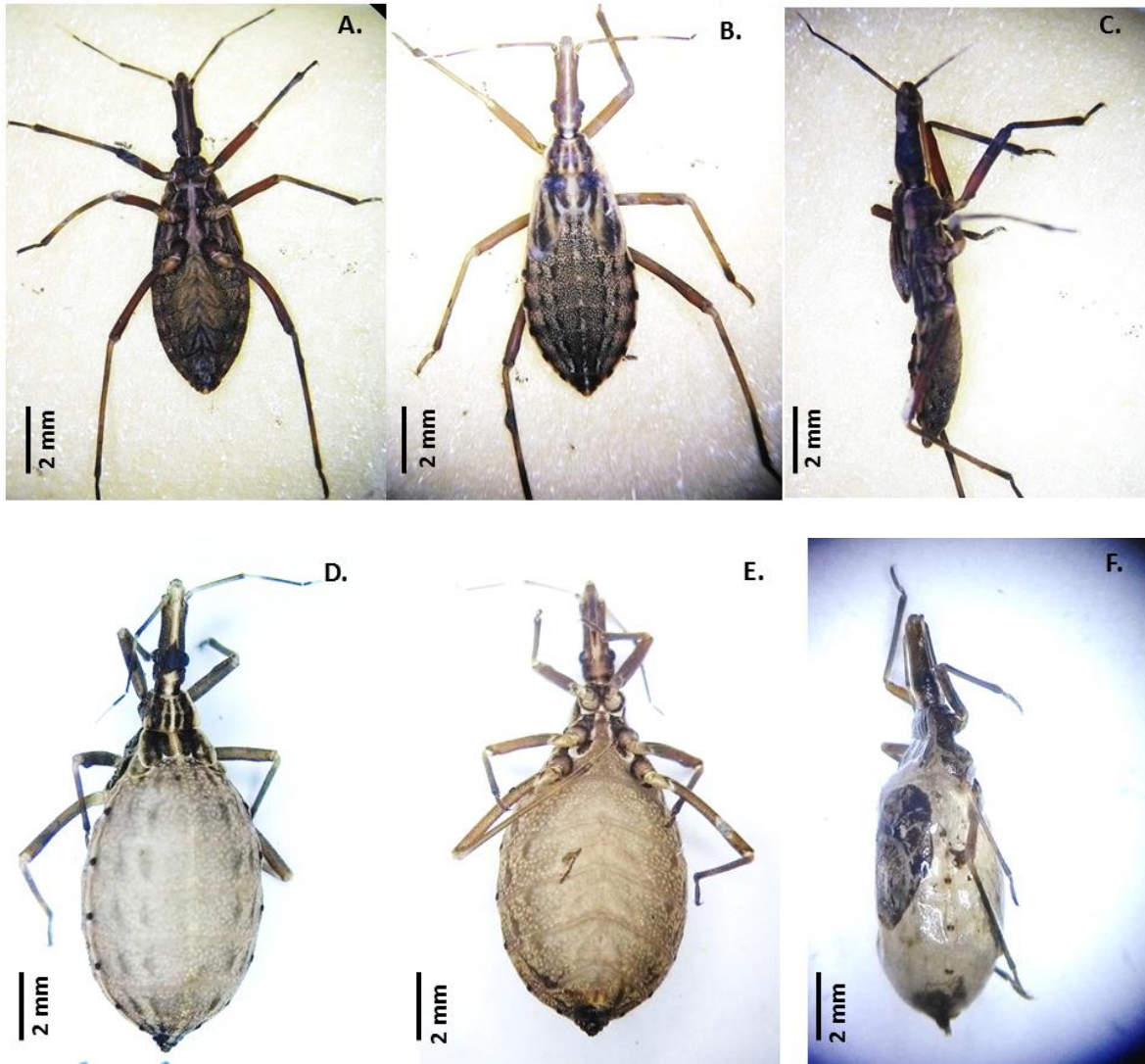


Figura 22. (A.- B.-C.) Vista posterior, anterior y lateral de ninfas NV del control negativo en comparación con ninfas NV (D.- E.-F.) en **distensión abdominal** en por exposición a los compuestos evaluados

5.5. Actividad locomotora.

Actividad Locomotora Presentada En Ninfas NI.

Tabla 8.

Muestra la actividad locomotora de las ninfas expuestas por topicación a las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184, AL185. a 195 mg.L⁻¹ y 695 mg.L⁻¹.

ACTIVIDAD LOCOMOTORA 195 PPM		
MOLECULAS	MOVIMIENTO/AREA	Desviación Estándar
AL 114	4640,09	0,014
AL 117	3463,99	0,033
AL 119	2258,62	0,012
AL 184	6319,90	0,043
AL 185	3901,95	0,061
Acetona	3204,01	0,024
Deltametrina	4096,05	0,000
ACTIVIDAD LOCOMOTORA 695 PPM		
MOLECULAS	MOVIMIENTO/AREA	Desviación Estándar
AL 114	2751,99	0,048
AL 117	1425,18	0,033
AL 119	2429,26	0,028
AL 184	5078,72	0,055
AL 185	2378,73	0,045
Acetona	3204,01	0,056
Deltametrina	4096,05	0,000

Las moléculas AL114 y AL184 reportan signos de hiperactividad a 195 mg.L⁻¹ respecto al control negativo (acetona) y similares al del control positivo (deltametrina). Por otro lado Las moléculas AL117, AL119 y AL185 no reportan diferencias significativas en la actividad locomotora respecto al control negativo (acetona) a 195 mg.L⁻¹ y a 695 mg.L⁻¹ las moléculas AL114 y AL184 reportan una disminución de la actividad locomotora.

5.6. Inhibición In Vitro de la enzima AChE

Tabla 9.

Muestra las IC₅₀ Concentración Inhibitoria 50 % de La Enzima AChE por las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184, AL185 y los inhibidores de referencia Galanthamine y Diazinon (Carreño Otero et al., 2014). Siendo la AL185 la molécula que presenta la menor IC₅₀, lo que indica que se requiere solo 8,78 µg/mL de AL185 para inhibir el 50% de AChE.

IC ₅₀ Concentración Inhibitoria 50 % De La Enzima AChE	
AL 114	33,8 µg/mL
AL 117	33.69 µg/mL
AL 119	33 µg/mL
AL123	0,44 µg/mL
AL 184 GINGER	20,1 µg/mL
AL 185	8,78 µg/mL
Galanthamine	0.30 µg/mL
Diazinon	0.57 µg/mL

Las concentraciones Inhibitorias 50 % de la enzima AChE IC₅₀, más bajas en la inhibición, son consideradas las de mejor respuesta. en nuestro caso las moléculas AL114, AL117, AL119 presentaron concentraciones Inhibitorias IC₅₀ de 33,8 µg/mL, 33.69 µg/ml y 33 µg/mL respectivamente, estas se mantuvieron relativamente iguales a diferencia de las moléculas AL184,AL185 y AL123 que presentaron concentraciones Inhibitorias IC₅₀ más bajas a 20,1 µg/mL, 8,78 µg/mL y 0,44 µg/mL respectivamente, considerándose así las de mejor inhibición debido a que se requiere una menor concentración de compuesto para inhibir la enzima AChE y que comparadas con los inhibidores de referencia Galanthamine con(IC₅₀ de 0.30 µg/mL) y el insecticida Diazinon con IC₅₀ de (0.57 µg/mL) las diferencias nos son significativas.

5.7. Determinación de la actividad ovicida in vivo de *Rhodnius prolixus*

La mayor actividad ovicida en función de la inhibición de la eclosión se observó a los 16 días a 25 mg.L⁻¹, 125 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹, 800 mg.L⁻¹ y 1500 mg.L⁻¹ en los bioensayos de topicación de huevos. No hubo inhibición de la eclosión ni mortalidades para los controles con acetona en los tratamientos utilizados. Los datos no cumplieron con las premisas de normalidad y homogeneidad de varianza (Kolmogorov-Smirnov & Liliefors / Shapiro – Wilk) por lo cual todos los resultados se analizaron mediante los test no paramétricos de Kruskal-Wallis y U de Mann WhitneyVer (figura 22).

Inhibición De Eclosión En Huevos De *Rhodnius Prolixus* Por Exposición A Análogos Sintéticos Del Alcaloide Girgensohnina.

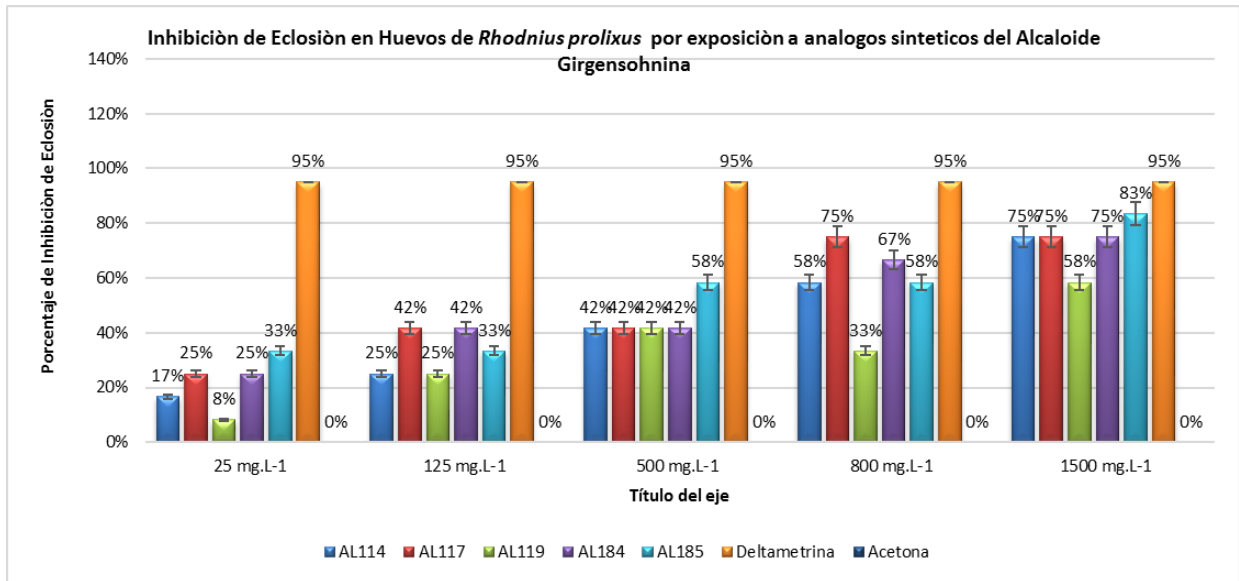


Figura 23. Evaluación de la actividad Inhibitoria de la eclosión en huevos de *Rhodnius prolixus* por las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184, AL185 y controles a **25 mg.L⁻¹** Kruskal-Wallis test: $H (6, N= 21) =17,55615$ $p =0,0074$; a **125 mg.L⁻¹** Kruskal-Wallis test: $H (6, N= 21) =16,68033$ $p =0,0105$; a **500 mg.L⁻¹** Kruskal-Wallis test: $H (6, N= 21) =17,06122$ $p =0,0091$; a **800 mg.L⁻¹** Kruskal-Wallis test: $H (6, N= 21) =16,93923$ $p =0,0095$; a **1500 mg.L⁻¹** Kruskal-Wallis test: $H (6, N= 21) =16,94615$ $p =0,0095$. en estos casos las moléculas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control negativo (acetona), evidenciándose un aumento en la inhibición de la eclosión a medida que se aumenta las concentraciones en las diferentes moléculas, siendo la molécula AL185 con $83 \pm 0\%$ la que genero el mayor porcentaje de inhibición de la eclosión.

5.8.1 Control negativo Acetona.

Huevos viables en el control negativo con Acetona.

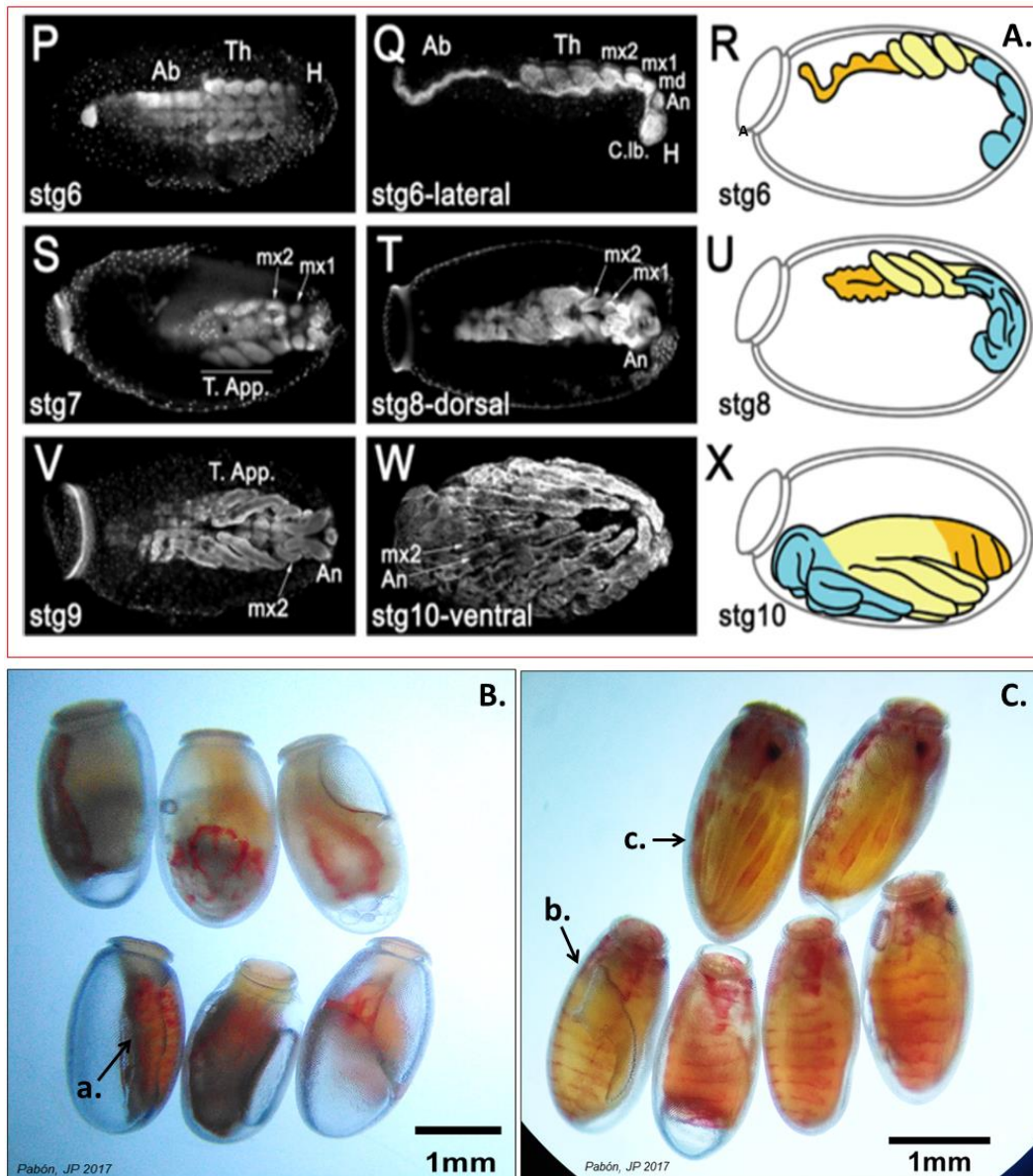


Figura 24. **A)** Se muestran huevos viables comparados con patrón prospectivo en la embriogénesis temprana de *Rhodnius prolixus* en las fases de n y (Berni et al.2014) **B)** **a.)** Embriones en fase de finalización de la segmentación 72 horas de oviposición donde se aprecian la segmentación definida en los embriones **C)** **b)** y **c)** embriones totalmente formada en continuidad de crecimiento 96 horas de oviposición.

5.7.2. Respuesta en impregnación por molécula AL114.

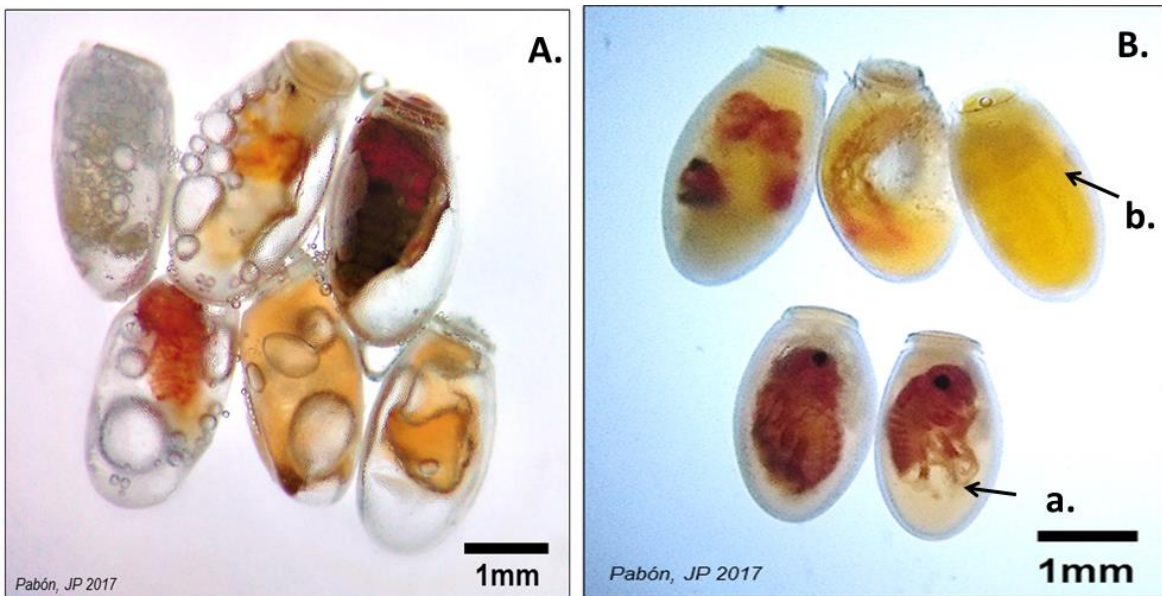


Figura 25. Inhibición de la eclosión de huevos de *Rhodnius prolixus* expuestos a 1500 mg.L^{-1} de AL 114, donde se aprecia posible inhibición de crecimiento (a) y disminución de tanización (b).

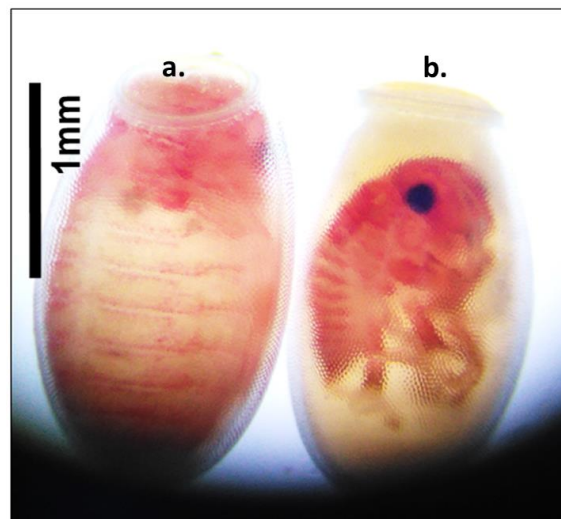


Figura 26. a) Huevo de control negativo comparado con b.) Huevo no eclosionado de *Rhodnius prolixus* expuesto a 1500 mg.L^{-1} de AL114, con última lectura a 16 días del bioensayo se evidencia posible inhibición de crecimiento.

5.7.3. Respuesta en impregnación por molécula AL117

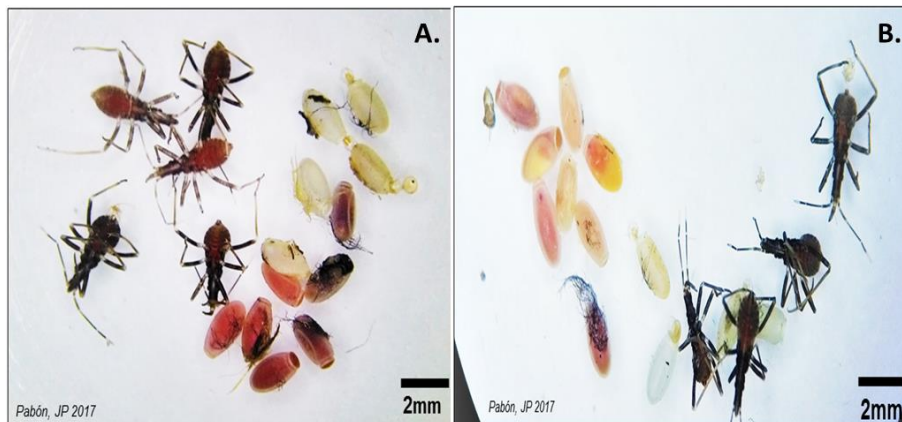


Figura 27. Impregnación por Molécula AL117 **A)** Inhibición de la eclosión y muerte post eclosión de ninfas NI a 800 mg.L⁻¹ **B)** Inhibición de la eclosión y muerte post eclosión a 1500 mg.L⁻¹, la mortalidad presentada en las ninfas eclosionadas se debe posiblemente al contacto con la molécula expuesta en la superficie de la caja de Petri, otro factor por el cual se puede presentar este tipo de mortalidades es toxicidad demorada según (O'Brien.R., 1960).

5.7.4. Respuesta en impregnación por molécula AL119

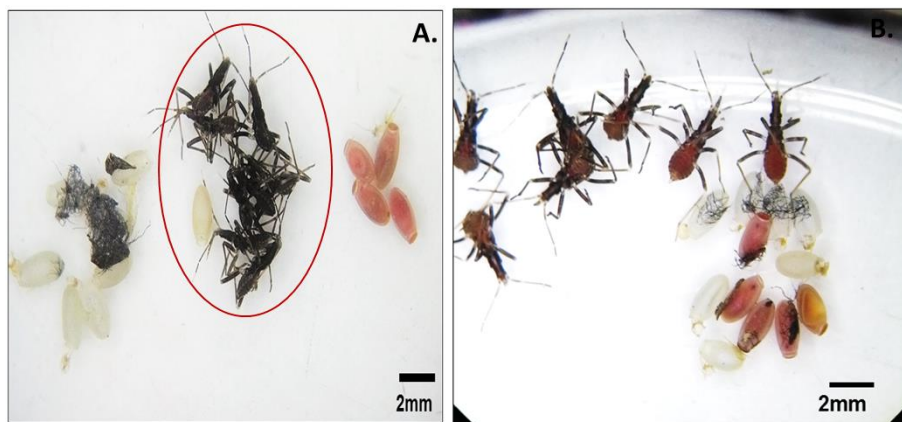


Figura 28. Impregnación por Molécula AL119 **A)** Inhibición de la eclosión y muerte post eclosión a 500 mg.L⁻¹, también se observó agrupamiento entre ninfas como respuesta al contacto con las moléculas especialmente al ser las superficies no porosas. **B)** Inhibición de la eclosión y muerte post eclosión a 800 mg.L⁻¹. La mortalidad presentada en las ninfas eclosionadas se debe posiblemente al contacto con la molécula expuesta en la superficie de la caja de Petri, otro factor por el cual se puede presentar este tipo de mortalidades es toxicidad demorada según (O'Brien.R., 1960).

5.7.5. Respuesta en impregnación por molécula AL184



Figura 29. Impregnación por molécula AL184 a 800 mg.L^{-1} A) huevos no eclosionados de *Rhodnius prolixus*, donde se aprecian embriones con distensión abdominal como signo de toxicidad por exposición a compuestos con naturaleza insecticida (Moretti, A. N. 2015) en comparación con los huevos viables del control negativo B).

5.7.6. Respuesta en impregnación por molécula AL185

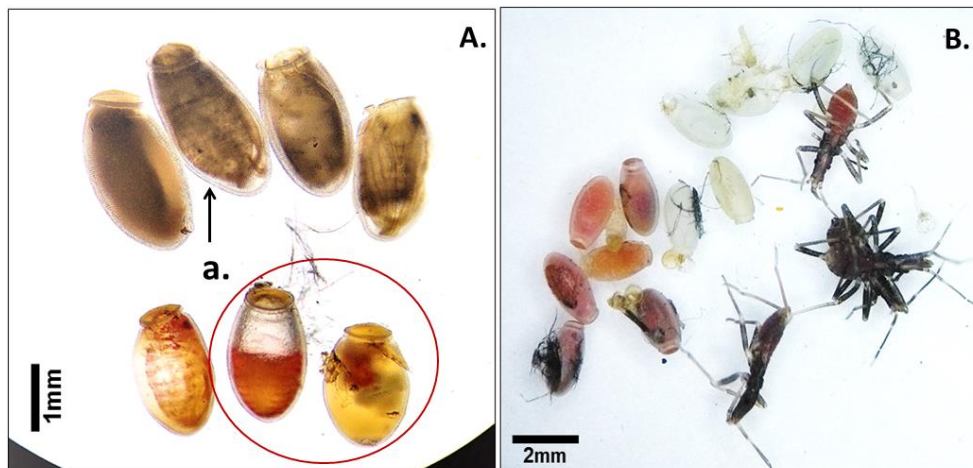


Figura 30. Impregnación por molécula AL185 A) huevos no eclosionados con embriones de *Rhodnius prolixus* en distensión abdominal a) como signo de toxicidad por exposición a compuestos con naturaleza insecticida (Moretti, A. N. 2015) así como inhibición de crecimiento. B) Inhibición de la eclosión y muerte post-eclosión a 1500 ppm. La mortalidad presentada en las ninfas eclosionadas se debe posiblemente al contacto con la molécula expuesta en la superficie (O'Brien.R., 1960).

5.7.7. Control Positivo Deltametrina.

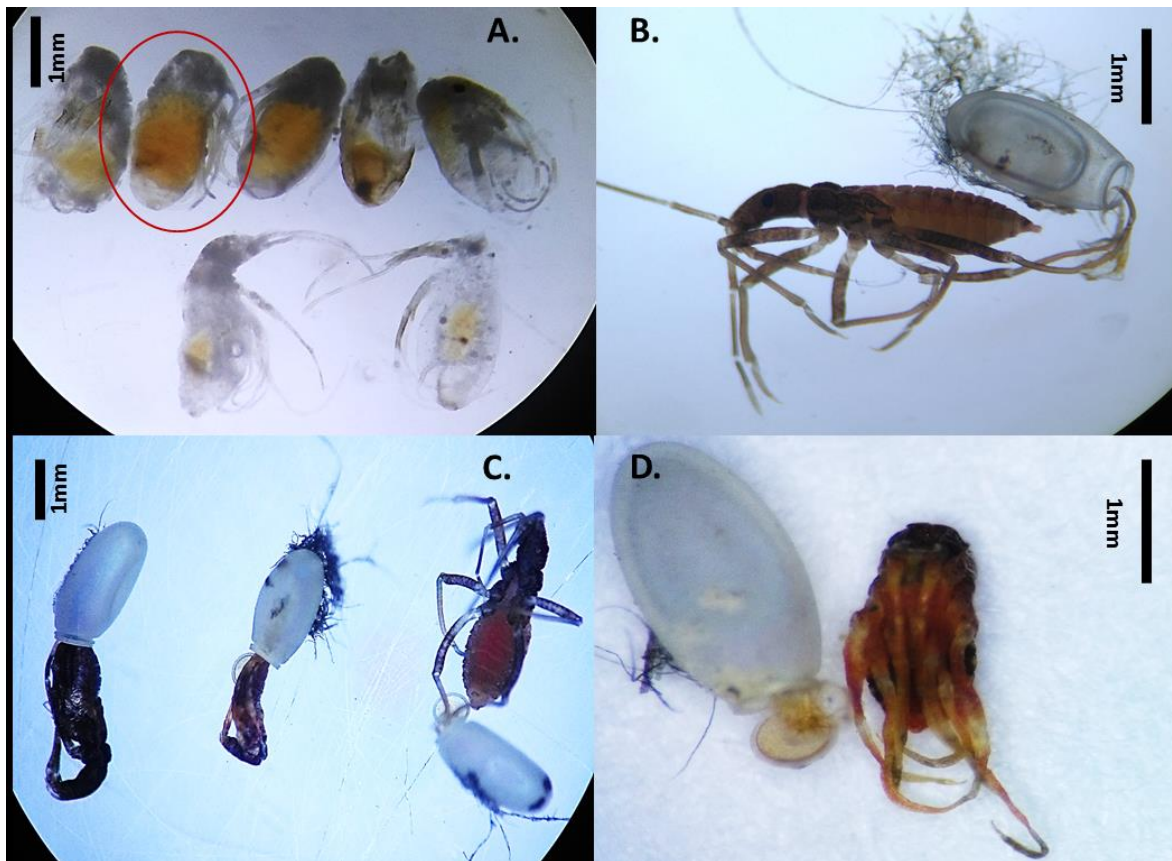


Figura 31. Control Positivo Deltametrina, se presentó inhibición de la eclosión en un 95 % de los huevos A) también mostró disminución de la tanización así como embriones de *Rhodnius prolixus* en distensión abdominal (Moretti, A. N. 2015) en B), C) y D) Mortalidad presentada en las ninfas eclosionadas porl contacto con la molécula expuesta en la superficie (O'Brien.R., 1960).

6. Discusión

6.1. Susceptibilidad de ninfas NI y NV de *R. prolixus* a 24 análogos sintéticos del alcaloide girsensohnina mediante topicación en tergitos, esternitos y superficies porosas y no porosas.

La superficie cuticular de triatominos está cubierta por una fina capa de lípidos, principalmente hidrocarburos, ésteres de cera, alcoholes grasos y ácidos grasos libres o esterificados, estos lípidos desempeñan un papel importante en la prevención de desecación letal, regulando la absorción de productos químicos y la penetración de microorganismos especialmente hidrofílicos (Juárez, M.P., & Fernández, G. C. 2007) los análogos sintéticos evaluados son moléculas hidrofóbicas y al ser aplicadas tópicamente en tergitos y esternitos estas lograron atravesar la cutícula de las ninfas de primer estadio NI. (Hadaway, et al., 1971; Germano., 2012; Cuadros, M.J 2014), sin embargo la respuesta obtenida en la ninfas de quinto estadio NV fue menor respecto a la NI ver (figura 12; figura 14), posiblemente debido al procesos de toxicocinética en cada uno de los estadios (Reyes, M., Angulo, V. M., & Sandoval, C. M. 2007 ; Alzogaray et al., 2001) o tanización, es decir al aumento en la esclerotización a medida que aumenta el estadio ninfal (Haroldo T., et al 2003). Esto a su vez permite identificar las áreas con mejor respuesta a los bioensayos por topicación; específicamente los intersegmentos articulatorios y apéndices, pues estas son las zonas menos esclerosadas del insecto. (Haroldo T. et al., 2003) según (Alzogaray, et al., 1996; Juárez & Fernández., 2007; Reyes *et al.*, 2007; Cáceres *et al.*, 2011; Germano, 2012). La

baja esclerotización en las ninfas NI favorece la susceptibilidad de las mismas a sustancias externas.

En el caso de los bioensayos en superficies la mejor respuesta insecticida se obtuvo en las superficies No Porosas (figura 16) esta respuesta posiblemente se deba a que los análogos sintéticos son compuestos no volátiles que al ser disueltos en un solvente volátil como acetona permiten que se formen nuevamente los cristales dejando residuos en las superficies (Cuadros M.J., 2014), esta característica permitió que las ninfas se impregnaran de los compuestos especialmente con sus apéndices, adicionalmente se observó a manera de comportamiento que las ninfas se agruparon unas con otras (figuras 20-21), este agrupamiento generó una mejor dispersión de los compuestos entre las ninfas por ende una mayor mortalidad, por otro lado la baja respuesta evidenciada en las superficies porosas se debió a que los poros del papel filtro retienen las partículas, disminuyendo la disponibilidad y la interacción insecto - sustancia. Rojas de Arias *et al.*, 2003.

Otras respuestas observadas fueron los signos de intoxicación, dentro de los cuales se identificaron; movimientos anormales de probóscide y antenas, incoordinación, parálisis de patas, volteo e incapacidad para regresar a la posición y distención abdominal (figura 21), síntomas similares a los que producen insecticidas neurotóxicos como los organofosforados y piretroides (Wood *et al.* 1982) (Alzogaray *et al.* 1997), estos síntomas sugieren que el sitio de acción principal se encuentra en el sistema nervioso de los insectos (Moretti, A. N. 2015).

6.2 Inhibición In Vitro De La Enzima AChE.

En la determinación Inhibitoria de enzima AChE comercial se utilizó el método modificado (Ellman en 1961)(figura 9) en el cual las moléculas que presentaron los mejores IC_{50} (Concentraciones Inhibitorias 50 % de la enzima AChE), más bajas en la inhibición, son consideradas las de mejor respuesta; cabe resaltar que para el caso del alcaloide girsensohnina ya han sido reportadas otros análogos sintéticos con Concentraciones Inhibitorias IC_{50} de la enzima AChE(Carreño Otero et al., 2014) en nuestro caso las moléculas AL114, AL117, AL119 presentaron concentraciones Inhibitorias IC_{50} de 33,8 $\mu\text{g/mL}$, 33.69 $\mu\text{g/mL}$ y 33 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, estas se mantuvieron relativamente iguales a diferencia de las moléculas AL184, AL185 y AL123 que presentaron concentraciones Inhibitorias IC_{50} más bajas a 20,1 $\mu\text{g/mL}$, 8,78 $\mu\text{g/mL}$ y 0,44 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, considerándose así las de mejor inhibición debido a que se requiere una menor concentración de compuesto para inhibir la enzima AChE y que comparadas con los inhibidores de referencia Galanthamine con(IC_{50} de 0.30 $\mu\text{g/mL}$) y el insecticida Diazinon con IC_{50} de (0.57 $\mu\text{g/mL}$) las diferencias nos son significativas ver (tabla 9).

Sin embargo a pesar que la molécula AL123 presentó el IC_{50} (0,44 $\mu\text{g/mL}$) inclusive más bajo que el insecticida de referencia Diazinon, esta no evidencio ninguna respuesta en mortalidad en ninfas NI y NV de *Rhodnius prolixus* por ninguno de los bioensayos realizados. Los efectos observados, pueden estar relacionados con este mecanismo de acción de la molécula pues debe tenerse en cuenta la habilidad de los diferentes compuestos para penetrar la cutícula, las barreras intestinales y las diferentes solubilidades en la hemolinfa de los insectos (Ryan & Byrne., 1988) pues esos factores influyen en la migración de los diferentes compuestos a los sitios colinérgicos. (Castillo M.R., 2015).

Esta prueba de inhibición de la AChE refuerza los resultados de mortalidad presentados en los bioensayos por topicación y superficies, pues evidencia la acción de las moléculas con afectación sobre el sistema nervioso especialmente en la AChE. Según (Ryan & Byrne, 1988). Los compuestos que inhiben o activan la AChE causan la acumulación de acetilcolina en el sitio de unión colinérgico, causando una estimulación continua de las fibras nerviosas a través del sistema nervioso periférico y central, seguido por parálisis y muerte.

6.3 Evaluación del efecto de las mejores moléculas con capacidad insecticida sobre la actividad locomotora de ninfas NI de *Rhodnius prolixus*.

En la prueba de actividad locomotora las moléculas AL114 y AL184 reportaron signos de hiperactividad a 195 mg.L^{-1} respecto al control negativo y similar al control positivo (deltametrina) la hiperactividad es el primer síntoma visible en insectos intoxicados (Gammon, 1978; Toth y Sparks, 1990; Alzogaray et al. 1997) Las moléculas AL117, AL119 y AL185 no reportaron diferencias significativas en la actividad locomotora respecto al control negativo a 195 mg.L^{-1} ; por otro lado a 695 mg.L^{-1} las moléculas AL114 y AL184 reportan una disminución de la actividad locomotora, esta respuesta se debe posiblemente a que el aumento en la dosis de 195 mg.L^{-1} a 695 mg.L^{-1} y cercana a las DL_{50} reportadas en este mismo trabajo para estas moléculas ver (tabla 9) (Alzogaray et al. 2013;Moretti, A. N., 2015).

6.4 Determinación de la actividad ovicida in vivo, en huevos de *R. prolixus*

La mayor actividad ovicida en función de la inhibición de la eclosión se observó en las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 a los 16 días de inicio del bioensayo y con 20 días de oviposición tomando como referencia el tiempo promedio de incubación de los huevos de *R. prolixus* de 15,4 días (Arévalo, A., et al 2007; Ledezma E. et al., 2002) a concentraciones de 25 mg.L⁻¹, 125 mg.L⁻¹, 500 mg.L⁻¹, 800 mg.L⁻¹ y 1500 mg.L⁻¹ (figura 22) ,en los bioensayos de topicación de huevos y no se presentó inhibición de la eclosión ni mortalidades post eclosión en el control negativo con acetona. Los datos no cumplieron con las premisas de normalidad y homogeneidad de varianza (Kolmogorov-Smirnov & Liliefors / Shapiro – Wilk) por lo cual todos los resultados se analizaron mediante los test no paramétricos de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney.

Se observó aumento en la inhibición de la eclosión a medida que se aumentaron las concentraciones en cada una de las moléculas, adicionalmente se presentaron mortalidades en la ninfas NI que eclosionaron, posiblemente se deba a que la superficie no porosa de las cajas de Petri quedaron impregnada con las moléculas al momento de tópicar los huevos, este resultado reafirma la eficiencia de los compuestos evaluados.

En la revisión estereoscópica de los huevos no eclosionados se observaron patrones posibles de toxicidad, como es el caso de la distensión abdominal en embriones, bajo nivel de tanización e inhibición de crecimiento ver (figuras 28-34). Algunos autores sugieren que se favorece la acción ovicida por contacto por topicación, pues permite su adhesión y solubilizarían de los compuestos en la capa más externa del corion (P de villar, M., 1979) también sugieren que estos tipos de respuesta en diferentes días se deba al fenómeno de toxicidad demorada donde huevos tratados en

diferentes estadios de su embriogénesis continúan su desarrollo embrionario muriendo durante el último día del mismo, poco antes o durante la eclosión (O'Brien.R., 1960) este fenómeno se debe a la lesión bioquímica crítica responsable de la muerte demorada del embrión.

7. Conclusiones

- Los análogos sintéticos AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 del alcaloide Girgensohnina presentaron actividad insecticida en ninfas de I estadio de *R. prolixus*.
- La actividad insecticida de los análogos sintéticos del alcaloide Girgensohnina presentó variaciones en función del bioensayo aplicado. Los mejores métodos fueron la topicación en terguitos/esternitos y superficies no porosas con una alta actividad frente a las superficies porosas donde se presentó baja actividad especialmente en ninfas de I estadio.NI.
- Las moléculas que presentaron mayor actividad insecticida en ninfas de I estadio NI fueron AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185.
- En ninfas de V estadio NV hubo muy baja actividad insecticida en cada uno de los tratamientos y moléculas evaluadas.
- Se logró cuantificar la actividad locomotora en Ninfas de primer estadio NI de *Rhodnius prolixus* por acción de análogos sintéticos del alcaloide Girgensohnina.
- Los análogos sintéticos AL114 y AL184 del alcaloide Girgensohnina mostraron efecto hiperactivante en ninfas de primer estadio NI de *Rhodnius prolixus* con valores superior a la del control positivo (deltametrina).

- Se Identificó in vitro la actividad inhibitoria de las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 frente a la enzima AChE de *R. prolixus*. Siendo la AL185 la que presento IC₅₀ a una menor concentración.
- Las moléculas AL114, AL117, AL119, AL184 y AL185 presentaron actividad ovicida in vivo, en huevos de *R. prolixus*.

Referencias Bibliográficas

- Alzogaray, R.A. (1996) *Caracterización de la toxicidad de insecticidas piretroides en Triatoma infestans* (Klug). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Alzogaray, R. A.; Fontán, A.; Zerba, E.N. (1997) Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Archives of insect biochemistry and physiology*, vol. 35, no 3, p. 323-333.
- Alzogaray, R. A.; Zerba, E. N. (2001) Third instar nymphs of *Rhodnius prolixus* exposed to α -cyanopyrethroids: From hyperactivity to death. *Archives of insect biochemistry and physiology*, vol. 46, no 3, p. 119-126.
- Alzogaray, R. A., et al. (2013) Behavioural and toxicological responses of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) to monoterpenes. *European Journal of Entomology*, vol. 110, no 2, p. 247.
- Alzogaray, R. A.; Zerba, E N. (2017) *Rhodnius prolixus* intoxicated. *Journal of insect physiology*, vol. 97, p. 93-113.
- Angulo Silva, V. M. (2001) *Monitoreo de la resistencia a insecticidas en Triatominos en América Latina*.
- Arévalo, A., et al. (2007) Comparación del ciclo de vida de *Rhodnius colombiensis* Moreno, Jurberg & Galvão, 1999 y *Rhodnius prolixus* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomedica*, 2007, vol. 27, p. 119-129.
- Berni, M., et al. (2014) Toll signals regulate dorsal–ventral patterning and anterior–posterior placement of the embryo in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. *EvoDevo*, vol. 5, no 1, p. 38.

- Bestetti, R. B.; Cardinalli-Neto, A.. (2013) Dissecting slander and crying for justice: Carlos Chagas and the Nobel Prize of 1921. *International journal of cardiology*, vol. 168, no 3, p. 2328-2334.
- Cáceres, L., et al. (2011) Evaluación de la actividad tóxica de los insecticidas piretroides deltametrina y lambdacihalotrina en dos poblaciones de campo de *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) de Panamá. *Biomédica*, vol. 31, no 1, p. 8-14.
- Carneiro, Â. P. (2010) *Atividade biocida De Annona coriacea Mart 1841 sobre o vetor Rhodnius neglectus lent 1954 (Hemiptera: Reduviidae)*. 2010. Tesis Doctoral. Universidade do Estado de Mato Grosso.
- Carreño O., Aurora L., et al. (2014) Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsensohnine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. *European journal of medicinal chemistry*, vol. 78, p. 392-400.
- Cuadros, M.J (2014) *Evaluación de la actividad insecticida del aceite esencial de Cymbopogon flexuosus (poaceae) y análogos sintéticos al alcaloide Girsensohnina en ninfas de I y V estadio de Rhodnius prolixus stål 1859 (hemiptera: reduviidae)*. Colombia Tesis Facultad de Ciencias, Biología, Universidad Industrial de Santander.
- Gammon, D. W. (1978) Neural effects of allethrin on the free walking cockroach *Periplaneta americana*: an investigation using defined doses at 15 and 32 C. *Pest Management Science*, vol. 9, no 1, p. 79-91.
- Guhl, F.; Ramírez, J. D. (2013) Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 20, p. 148-154.
- Duthie, M. S., et al. (2005) Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity*, vol. 73, no 1, p. 181-192.
- Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. In *Cambridge University Press* (3rd ed., p. 333).
- Germano, M. D. (2012) *Herencia y efectos demográficos de la resistencia a deltametrina en Triatoma infestans*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

- Galvão, C. (2014) *Vetores da doença de chagas no Brasil*. SciELO-Sociedade Brasileira de Zoologia.
- Hadaway, A. B. (1971) Some factors affecting the distribution na rate of action of insecticide. En: Bull. Org. mond. Santé. Vol. 44; p. 221-224.
- Hernández, L. M., et al. (2009) Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander, 2008. *Revista del Observatorio de Salud Pública de Santander*, vol. 4, p. 28-36.
- Hegnauer, R. (1977) Cyanogenic compounds as systematic markers in Tracheophyta. En *Flowering Plants*. Springer Vienna. p. 191-210.
- Juárez, M. P.; Fernández, G. Calderón. (2007) Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, vol. 147, no 3, p. 711-730.
- López, S., et al. (2002) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sciences*, , vol. 71, no 21, p. 2521-2529.
- Ledezma, E. Z. (1927) *Ciclo biológico de Rhodnius robustus Larrouse, (Hemiptera: Triatominae)*, alimentado con sangre humana en condiciones de laboratorio.
- Montenegro, D., et al. (2016) Estrategia para determinar la línea base en áreas de interrupción vectorial de la enfermedad de Chagas.
- Moncayo, A. (2003) Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2003, vol. 98, no 5, p. 577-591.
- Moretti, A. N. (2015) *Efectos letales y subletales de monoterpenos sobre vectores de Chagas y su posible uso como herramientas de control*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Moctezuma Cuauhtémoc M. et al (2015) “Manual de diagnóstico y tratamiento de enfermedad de Chagas” Centro Nacional De Programas Preventivos De Control De Enfermedades Cenaprece México.

- Nicholls, R. S., et al. (2007) Enfermedad de Chagas aguda en Colombia, una entidad poco sospechada. Informe de 10 casos presentados en el periodo 2002 a 2005. *Biomédica*, vol. 27, p. 8-17.
- Nordmeyer, D.; Dickson, W. (1990) On *Meloidogyne incognita* (l). *Revue Nématol*, vol. 13, no 2, p. 229-232.
- Organización Mundial de la Salud - OMS. (2005) Protocolo de evaluación de efecto insecticida en *Triatoma infestans*. Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas. CIPEIN Argentina.
- Organización Mundial de la Salud – OMS (2003) *OMS control de enfermedad de Chagas segundo informe del comité de expertos de la CIPEIN Argentina*.
- Parra G.J., Flórez M. Y Angulo V.M. (EDS).(2010) Vigilancia de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Colombia (1era Ed., pp. 127). Bogotá D.C. Colombia. Editorial Sic Editorial Ltda.
- Raymond, M. (1985). Presentation d'un programme basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORSTOM Ser. Entomol. Med. Parasitol*, vol. 23, no 11.
- Reyes, M.; Angulo, V. M.; Sandoval, C. M. (2007) Toxic effect of b-cipermethrin, deltamethrin and fenitrothion in colonies of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) and *Triatoma maculata* (Erichson, 1848)(Hemiptera, Reduviidae). *Biomédica*, , vol. 27, p. 75-82.
- Rodrigues, Vera L. Cortiço Corrêa, et al. (2002) Triatomíneos: ação ovicida de alguns piretróides. *Rev Soc Bras Med Trop*, vol. 35, no 3, p. 237-241.
- Rojas de Arias, A., et al. (2003) Comparative evaluation of pyrethroid insecticide formulations against *Triatoma infestans* (Klug): residual efficacy on four substrates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 98, no 7, p. 975-980.
- Ryan, M. F.; Byrne, O. (1988) Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of chemical ecology*, vol. 14, no 10, p. 1965-1975.
- Ruth M. C.M. (2015), *Manifestaciones Semioquímicas Y Mecanismo De Acción De Salvia officinalis (Lamiaceae) Frente A Stegomyia aegypti (Reinert et al., 2009) (DIPTERA:*

- CULICIDAE*). Colombia tesis Facultad De Salud, Escuela De Medicina Maestría En Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad Industrial De Santander.
- Schofield, C. J.; Galvão, C. (2009) Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*, vol. 110, no 2, p. 88-100.
- Sfara, V., et al. (2011) Adaptation of the repellency response to DEET in *Rhodnius prolixus*. *Journal of insect physiology*, vol. 57, no 10, p. 1431-1436.
- Sandoval, C. M. (2001) *Actividad insecticida del malatión y la deltametrina en una cepa colombiana de Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae). Monitoreo de la resistencia a insecticidas en triatominos en América Latina*. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano, Red Latinoamericana de Control de Triatominos RELCOT, p. 27-33.
- Toth, S. J.; Sparks, T. C. (1990) Effect of temperature on toxicity and knockdown activity of cis-permethrin, esfenvalerate, and λ -cyhalothrin in the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of economic entomology*, vol. 83, no 2, p. 342-346.
- Toro, H.; Chiappa, E.; Tobar,. (2003) *Biología de insectos. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile*.
- Vega, M. (2014). *Informe final del evento enfermedad de Chagas, Colombia*, 1–17.
- World Health Organization (WHO). (1994) *Taller sobre la evaluación de efecto insecticida sobre triatominos. Workshop on the insecticide effect evaluation in triatominos*. Acta Toxicol Argentina; 2:29-33.
- World Health Organization, et al. (2010) Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). *Weekly Epidemiological Record*, vol. 85, no 34, p. 334-336.
- World Health Organization, et al. (2003) Control de la enfermedad de Chagas: segundo informe del comité de expertos de la OMS.
- World Health Organization. (2001) The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000–2002. Geneva: WHO;. WHO/ PCS/01.5.

Wood, E.J.; Picollo De Villar, M.I.; Melgar, F. Y Zerba, E.N. (1982). Mode of action of organophosphorus insecticides in *T. infestans*. *Anales de la Asociación Química Argentina* 70: 801–814.

Zambrano, P. (2014) Protocolo de vigilancia en salud pública: Chagas. *Colombia: Instituto Nacional de Salud*,.

Zafra, G., et al. (2008) Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. *Parasitology research*, vol. 103, no 3, p. 731-734.