

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*CYMBOPOGON FLEXUOSUS* (POACEAE) Y ANÁLOGOS SINTÉTICOS AL  
ALCALOIDE GIRGENSOHNINA EN NINFAS DE I Y V ESTADIO DE  
*RHODNIUS PROLIXUS* STÄL 1859 (HEMÍPTERA: REDUVIIDAE)**

**JULIANA CUADROS MARTÍNEZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*CYMBOPOGON FLEXUOSUS* (POACEAE) Y ANÁLOGOS SINTÉTICOS AL  
ALCALOIDE GIRGENSOHNINA EN NINFAS DE I Y V ESTADIO DE  
*RHODNIUS PROLIXUS* STÄL 1859 (HEMÍPTERA: REDUVIIDAE)**

**JULIANA CUADROS MARTÍNEZ**

**Trabajo de Grado Modalidad pasantía de Investigación para optar al título de  
Bióloga**

**Tutor**

**JONNY EDWARD DUQUE LUNA**

**Doctor en Ciencias Biológicas**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión –VIE de la Universidad Industrial de Santander por la financiación del proyecto No. 1389.

Al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) donde se realizó la pasantía de investigación.

A los centros de investigación que donaron las moléculas y aceites esenciales para la realización de la pasantía de investigación: Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio), Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM) de la Universidad Industrial de Santander.

Agradecer al doctor Jonny Edward Duque Luna y Magister Aurora Lisette Carreño Otero por sus orientaciones y enseñanzas durante el desarrollo de la presente pasantía de investigación, y por sus aportes para mi formación profesional.

A todos los compañeros del CINTROP, porque todos hicieron valiosísimos aportes para la realización de la pasantía de investigación.

A la escuela de Biología y a la Universidad Industrial de Santander que contribuyeron en mi formación profesional.

A Dios por la fortaleza y a mi familia por su apoyo incondicional.

## CONTENIDO

	pág
INTRODUCCIÓN	13
1. JUSTIFICACIÓN	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GENERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3.MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 MATERIALES	17
3.1.1 Material biológico	17
3.1.2 Aceites esenciales y material químico	17
3.2 METODOLOGÍA	18
3.2.1 Bioensayos	18
3.2.1.1 Evaluación de la actividad insecticida	18
3.2.1.1.1 Aplicación tópica	18
3.2.1.1.2 Exposición a superficies tratadas	19
3.2.2 Bioensayos Dosis Letales (DL)	20
3.2.3 Análisis estadístico	21

4. RESULTADOS	22
4.1 ANÁLOGOS SINTÉTICOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA, APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS I ESTADIO <i>R. PROLIXUS</i> .	22
4.2 ACEITE ESENCIAL <i>C. FLEXUOSUS</i> , APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS I ESTADIO <i>R. PROLIXUS</i> .	29
4.3 ANÁLOGOS SINTÉTICOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA Y ACEITE ESENCIAL <i>C. FLEXUOSUS</i> , APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS V ESTADIO <i>R. PROLIXUS</i> .	29
5. DISCUSIÓN	30
5.1 ANÁLOGOS SINTÉTICOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA, APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS I ESTADIO <i>R. PROLIXUS</i> .	30
5.2 ACEITE ESENCIAL <i>C. FLEXUOSUS</i> , APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS I ESTADIO <i>R. PROLIXUS</i> .	31
5.3 ANÁLOGOS SINTÉTICOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA Y ACEITE ESENCIAL <i>C. FLEXUOSUS</i> , APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS V ESTADIO <i>R. PROLIXUS</i> .	32
6. CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

## LISTA DE FIGURAS

	pág
<b>Figura 1.</b> Protocolo de OMS, 2005 modificado para la aplicación tópica de tergutitos y esternitos.	18
<b>Figura 2.</b> Protocolo de OMS, 2005 modificado para la exposición a superficies tratadas.	19
<b>Figura 3.</b> Actividad insecticida de cada uno de los 12 análogos sintéticos a las 72 h y 500 ppm en ninfas de I estadio de <i>R. prolixus</i> en la topicación de tergutitos.	23
<b>Figura 4.</b> Actividad insecticida de cada uno de los 12 análogos sintéticos a las 72 h y 500 ppm en ninfas de I estadio de <i>R. prolixus</i> en la topicación de esternitos.	24
<b>Figura 5.</b> Actividad insecticida de cada uno de los 12 análogos sintéticos a las 72 h y 500 ppm en ninfas de I estadio de <i>R. prolixus</i> en la exposición a superficies tratadas.	24
<b>Figura 6.</b> Comparación de tergutitos, esternitos y exposición a superficies de los 12 análogos en ninfas de I estadio de <i>R. prolixus</i> a las 72 h y 500 ppm.	26

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Estructura de los análogos $\alpha$ -aminonitrílicos evaluados.	18
<b>Tabla 2.</b> Comparación entre cada uno de los 12 análogos sintéticos con respecto a su aplicación tópica en tergutitos y esternitos en ninfas de I estadio de <i>R. prolixus</i> a las 72 h y 500 ppm.	26
<b>Tabla 3.</b> Comparación de cada uno de los 12 análogos sintéticos y los tres tipos de tratamientos en ninfas de I estadio de <i>R. prolixus</i> a las 72 h y 500 ppm.	27
<b>Tabla 4.</b> Dosis letales DL <sub>50</sub> y DL <sub>95</sub> (ppm) de la mejor molécula con actividad insecticida AL51 a las 72 h en ninfas I estadio de <i>R. prolixus</i> .	28
<b>Tabla 5.</b> Comparación entre los tres tipos de tratamientos y el aceite esencial <i>C. flexuosus</i> en ninfas de I estadio de <i>R. prolixus</i> a las 72 h y 1000 ppm y sus respectivos controles.	29

## RESUMEN

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *CYMBOPOGON FLEXUOSUS* (POACEAE) Y ANÁLOGOS SINTÉTICOS AL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA EN NINFAS DE I Y V ESTADIO DE *RHODNIUS PROLIXUS* STÄL 1859 (HEMÍPTERA: REDUVIDAE)\*

JULIANA CUADROS MARTÍNEZ\*\*

**Palabras claves:** Ninfas *Rhodnius prolixus*, actividad insecticida, análogos sintéticos, aceite esencial.

Análogos del alcaloide girgensohnina, diseñados y sintetizados para potenciar la acción inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y el aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* han presentado efecto insecticida sobre el vector del Dengue. Se evaluó la actividad biocida del *C. flexuosus* y de análogos a la girgensohnina en ninfas de I y V estadio, utilizando una cepa susceptible de *R. prolixus* CINTROP-UIS. Semanalmente la colonia fue alimentada con sangre de gallina para la obtención de las ninfas. La evaluación de la actividad insecticida de *C. flexuosus* y 12 análogos se realizó en las ninfas empleando el método de aplicación tópica en terguitos/esternitos y exposición a superficies tratadas a diferentes dosis exploratorias (DE). Para la molécula con mayor porcentaje de mortalidad en DE, se realizaron experimentos de dosis múltiples determinando la dosis letal (DL) por medio de análisis Probit. En la topicación, la mortalidad para los análogos sintéticos fue: a 500 ppm, 83,3±16,7% en terguitos y 38,9±4,8% en esternitos. La mortalidad de *C. flexuosus* fue: a 1000 ppm, 11,1±4,8% en esternitos. En la exposición a superficies tratadas la mortalidad fue de 16,7±0% a 500 ppm para los análogos sintéticos y 11,1±4,8% a 1000 ppm para *C. flexuosus*. La molécula con mayor actividad insecticida fue el análogo sintético AL51 con una mortalidad a 500 ppm de 83,3±16,7% en terguitos, 38,9±4,8% en esternitos y 16,7±0% en exposición a superficies tratadas. Para AL51 las dosis letales fueron: DL<sub>50</sub> 225,60 ppm, DL<sub>95</sub> 955,90 ppm terguitos. En conclusión los análogos sintéticos y *C. flexuosus* presentaron actividad insecticida en ninfas de I estadio de *R. prolixus*.

---

\* Trabajo de grado.

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

## ABSTRACT

### INSECTICIDAL ACTIVITY OF CYMBOPOGON FLEXUOSUS (POACEAE) ESSENTIAL OIL AND SYNTHETIC ANALOGS OF GIRGENSOHNINE ALKALOID ON I AND V INSTAR NYMPHS FROM *RHODNIUS PROLIXUS* STÄL 1859 (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)\*

JULIANA CUADROS MARTÍNEZ\*\*

**Keywords:** *Rhodnius prolixus* nymphs, insecticidal activity, synthetic analogs, essential oil.

Girgensohnine alkaloid analogs, designed and synthesized to empower their inhibitory activity on the acetylcholinesterase enzyme (AChE) and *C. flexuosus* essential oil have presented insecticide effect on the dengue vector. The *C. flexuosus* and girgensohnine analogs biocidal activity was evaluated using I and V instar nymphs from *R. prolixus* CINTROP-UIS susceptible colony. Weekly the colony was fed with hen blood to obtain nymphs. The insecticidal activity of *C. flexuosus* and 12 analogs was developed on nymphs using the topical application on tergites/sternites and exposition to treated surfaces methods, at different exploratory doses (ED). For the molecule with highest percentage of mortality in ED experiments were developed a multiple doses protocol to determine lethal dose (LD) through probit analysis. The topical mortality for the synthetic analogs was: 500 ppm, 83.3±16.7% in tergites and 38.9±4.8% in sternites. The mortality of *C. flexuosus* was: to 1000 ppm, 11,1±4,8% in sternites. The mortality of treated surfaces exposure was 16,7±0% to 500 ppm for synthetic analogs and 11,1±4,8% to 1000 ppm for *C. flexuosus*. The molecule with highest insecticide activity was the AL51 synthetic analog with a mortality of 500 ppm to 83,3±16,7% in tergites, 38,9±4,8% in sternites and 16.7±0% treated surfaces exposure. For AL51 lethal doses were: LD50 225,60 ppm, LD95 955.90 ppm on tergites. In conclusion, the synthetic analogs and *C. flexuosus* presented insecticidal activity on I and V instar nymphs of *R. prolixus*.

---

\* Work Degree.

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

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, afectando 21 países de América latina (WHO, 2014). Ha sido ampliamente reconocida por las autoridades de salud pública mundial como una dolencia tropical desatendida, asociada a la pobreza y malas condiciones de las viviendas tanto en áreas rurales como periurbanas (Bonney, 2014). Se calcula que en el mundo hay de 7 y 8 millones de personas infectadas, más de 25 millones en riesgo de infección y 15.000 muertes por año en América Latina (Perez *et al.*, 2014). El mal de Chagas, es endémico de América Latina, pero en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los EEUU, Canadá, en varios países del continente Europeo y algunos del Pacífico Occidental. Esta dispersión obedece sobre todo a la movilidad de la población entre Latinoamérica y el resto del mundo (Carabarin-Lima *et al.*, 2013; WHO, 2014), convirtiéndose en un problema internacional de salud presente en zonas endémicas y no endémicas (Abuhab *et al.*, 2013).

La principal vía de transmisión de la enfermedad en países endémicos es vectorial a través de las heces del insecto vector hematófago (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae) (Bestetti *et al.*, 2013). 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). Otras formas de transmisión son: congénita, transfusional, por trasplante de órganos, consumo de alimentos contaminados y accidentes de laboratorio (Bonney, 2014). En la actualidad, no existe una vacuna contra el agente causal de la enfermedad y los medicamentos existentes son parcialmente eficaces y además, presentan severos efectos secundarios (WHO, 2014; Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

Existen aproximadamente 140 especies de triatomíneos (Schofield & Galvão, 2009), las especies domiciliadas más importantes implicadas en la transmisión de *T. cruzi* son *Triatoma infestans* (Klug, 1834), en los países del Cono Sur, *R. prolixus*, en Centroamérica y el norte de Suramérica, y *T. dimidiata* (Latreille, 1811) que se extiende a lo largo de la costa pacífica desde México hasta el Ecuador y el norte de Perú (Moretti *et al.*, 2013). La prevalencia de la Tripanosomiasis en Colombia se ha estimado entre 700.000 y 1.200.000 habitantes infectados y 8.000.000 en riesgo de adquirir la infección, los principales vectores adaptados a la vivienda humana en orden de importancia son: *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *T. venosa* (Stål, 1872) y *T. maculata* (Erichson, 1878) (WHO, 2014; Zambrano, 2014). Dentro de los principales departamentos endémicos de la enfermedad en Colombia se encuentra Santander, cuyos principales vectores domiciliados son: *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *T. maculata*, *T. venosa* y *Pastrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Gulh *et al.*, 2005).

## 1. JUSTIFICACIÓN

El método más eficaz para prevenir la enfermedad del Chagas en América Latina es el control vectorial (Zambrano, 2014) mediante el uso convencional de insecticidas sintéticos (organofosforados, carbamatos y piretroides). El uso prolongado e inadecuado ha generado en los insectos mecanismos de resistencia, por lo cual la búsqueda de ingredientes activos o sustancias nuevas que puedan sustituir estos insecticidas es de suma importancia (Sfara *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2013).

Una de estas nuevas moléculas son los análogos sintéticos al alcaloide girsensohnina los cuales fueron diseñados y sintetizados para potencializar su acción inhibitoria a nivel de la enzima AChE. En un estudio previo presentaron actividad insecticida contra el vector del Dengue (Carreño *et al.*, 2014).

Los aceites esenciales son otra herramienta potencial para el control de insectos, debido a su selectividad, efectos ambientales mínimos y en algunos casos, su acción ha sido eficaz contra insectos resistentes a insecticidas convencionales (Sfara *et al.*, 2009). Los Aceites esenciales tienen efecto repelente, atrayente, deterrente, insecticida contra insectos plaga y insectos vectores de enfermedades (Sfara *et al.*, 2009; Sainz *et al.*, 2012; Moretti *et al.*, 2013).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad insecticida del aceite esencial *Cymbopogon flexuosus* y análogos sintéticos del alcaloide girsensohnina en ninfas de I y V estadio de *Rhodnius prolixus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer los límites de mortalidad (5 y 95%) en ninfas de *R. prolixus* de I y V estadio frente al aceite esencial *C. flexuosus* y una serie de análogos sintéticos de girsensohnina.

Determinar la  $DL_{50}$  y  $DL_{95}$  en ninfas de *R. prolixus* de I y V estadio frente a la molécula con mayor porcentaje de mortalidad.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

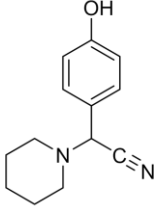
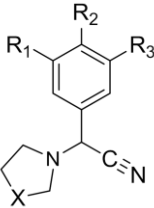
##### 3.1.1 Material biológico

Se utilizó una cepa de *R. prolixus* mantenida en el laboratorio hace más de diez años en el insectario de cría del CINTROP-UIS, el cual no ha tenido aporte de material externo y se ha mantenido libre de contacto con insecticidas. Esta colonia se mantuvo bajo condiciones controladas de  $25\pm 4$  °C de temperatura, humedad relativa de  $75\pm 4\%$  y un fotoperiodo de 12:12. Los adultos de *R. prolixus* se alimentaron cada ocho días con sangre de gallina *Gallus gallus*. En los bioensayos se utilizaron ninfas de I estadio de 24 a 36 horas de edad, con ayuno desde la eclosión y ninfas de V estadio con 8 días de ayuno y peso promedio  $20\pm 30$  mg.

##### 3.1.2 Aceites esenciales y material químico

Los aceites esenciales extraídos de plantas *Cymbopogon flexuosus* y sus controles *Citrus sinensis* y *Eucalyptus citriodora* fueron donado por el CENIVAM-UIS. Los 12 análogos sintéticos de girsensohnina utilizados (Tabla 1) fueron diseñados, sintetizados y donados por el laboratorio LQOBio-UIS que hace parte de nuestro centro de investigación CINTROP-UIS, cuyos controles fueron insecticidas de grado técnico: Deltametrina (99,5%), piretroide utilizado para el control del vector *R. prolixus* en campo en Santander y que actúa a nivel de los canales de calcio y Fenitrotión (98,0%), organofosforado utilizado para el control vectorial en Latinoamérica y que actúa inhibiendo la enzima AChE. Para todas las diluciones y los otros controles se utilizó el disolvente acetona.

**Tabla 1.** Estructura de los análogos  $\alpha$ -aminonitrílicos evaluados.

Molécula	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		
 <i>Girgensohnina</i> Alcaloide cabeza de serie	<u>AL47</u>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	 Análogos $\alpha$ -aminonitrílicos	
	<u>AL49</u>	CH <sub>2</sub>	H	OCH <sub>3</sub>		
	<u>AL51</u>	CH <sub>2</sub> O	H	OCH <sub>3</sub>		
	<u>AL84</u>	CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )	H	OCH <sub>3</sub>		
	<u>AL48</u>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	OCH <sub>2</sub> O		
	<u>AL50</u>	CH <sub>2</sub>	H	OCH <sub>2</sub> O		
	<u>AL52</u>	CH <sub>2</sub> O	H	OCH <sub>2</sub> O		
	<u>AL85</u>	CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )	H	OCH <sub>2</sub> O		
	<u>AL81</u>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>
	<u>AL83</u>	CH <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>
	<u>AL82</u>	CH <sub>2</sub> O	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>
	<u>AL86</u>	CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		OCH <sub>3</sub>

X, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: fragmentos modificados con respecto a su alcaloide cabeza de serie.

## 3.2 METODOLOGÍA

### 3.2.1 Bioensayos

#### 3.2.1.1 Evaluación de la actividad insecticida

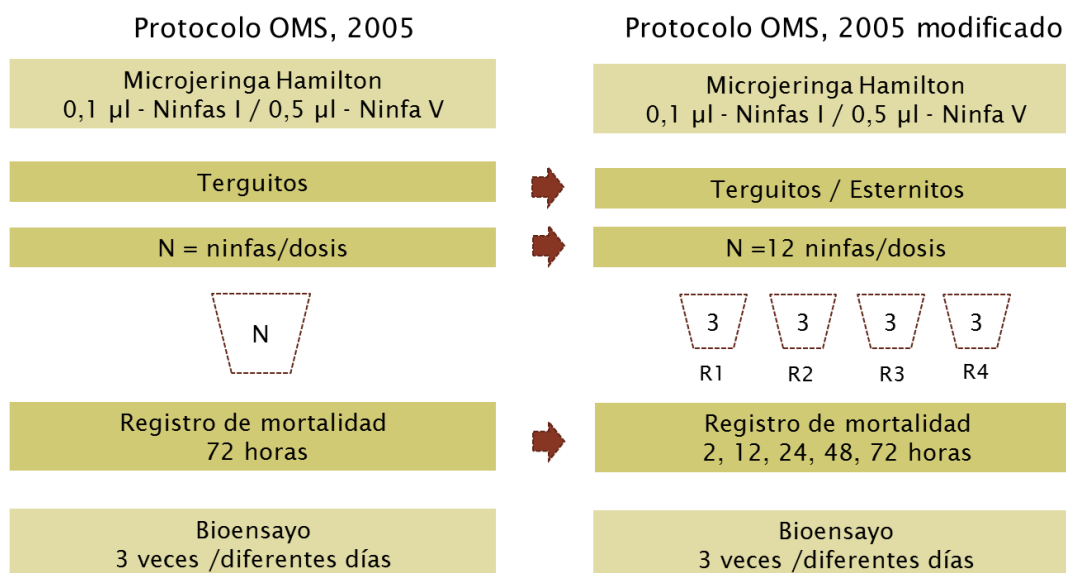
##### 3.2.1.1.1 Aplicación tópica

Se utilizó el protocolo OMS, 2005 con modificaciones (Figura 1). Las ninfas de I y V estadio de *R. prolixus* se trataron con aplicación tópica de principios activos de 12 análogos sintéticos de girgensohnina, 3 aceites esenciales y 2 insecticidas comerciales, diluidos en acetona y aplicados con microgiringa Hamilton de 5 y 25  $\mu$ l provista de descargador repetitivo. En la región de los terguitos y esternitos de cada ninfa de estadio I y V se aplicaron 0,1 y 0,5  $\mu$ l de las soluciones,

respectivamente. Las dosis utilizadas fueron 500, 125 y 25 ppm para los análogos sintéticos de la girgensohnina y 1000, 300, 30 ppm para los aceites esenciales más el tratamiento control con el mismo volumen de acetona. Se realizaron 4 réplicas por dosis cada réplica con 3 ninfas para un total de 12 ninfas por dosis y 48 ninfas por bioensayo incluyendo el control. Cada bioensayo se realizó tres veces en días diferentes.

Después del tratamiento, las ninfas se colocaron en vasos plásticos de 1/2 onza, con papel plegado en su interior y cubiertos con tapas perforadas. El registro de mortalidad se realizó las 2, 12, 24, 48 y 72 horas postratamiento.

**Figura 1.** Protocolo de OMS, 2005 modificado para la aplicación tópica de terguitos y esternitos.

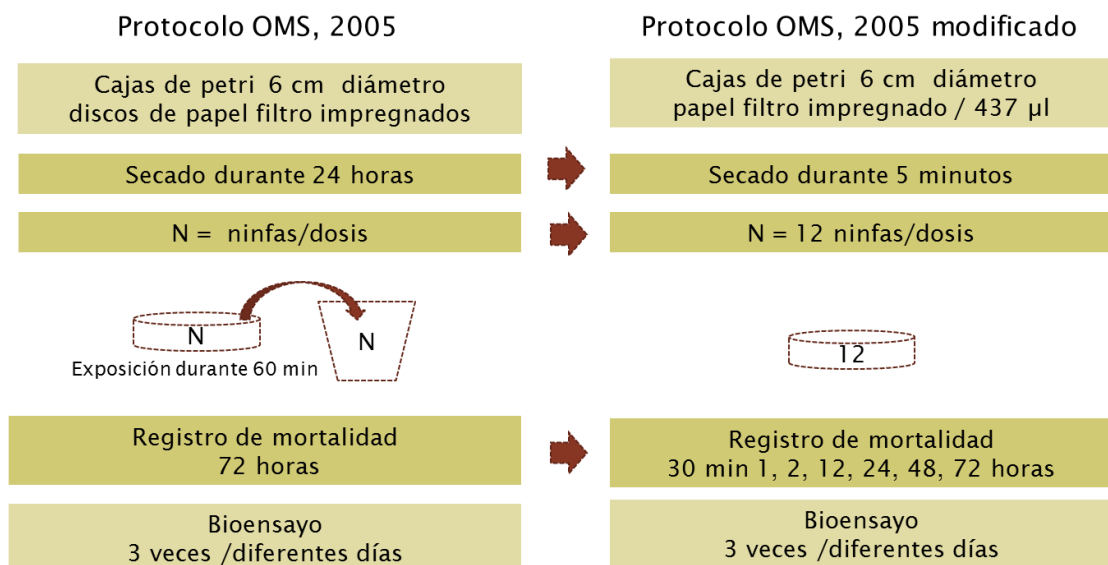


### 3.2.1.1.2 Exposición a superficies tratadas

Se utilizó el protocolo OMS, 2005 con modificaciones (Figura 2). Se usaron placas petri de vidrio de 6 cm de diámetro, dentro de ellas se colocaron discos de

papel filtro, estas superficies se impregnaron de manera homogénea mediante una micropipeta siguiendo un patrón en forma espiralada del centro hacia fuera, para ello se utilizó un volumen de 437µl de la solución el cual fue calculado según el protocolo OMS, 2005. Se dejaron secar las superficies impregnadas durante 5 minutos y luego se expusieron 12 ninfas por dosis para un total de 48 ninfas por bioensayo, después se cubrieron las placas petri con vinipel perforado. La mortalidad se registró desde 30 min, 1, 2, 12, 24, 48, hasta las 72 horas postratamiento.

**Figura 2.** Protocolo de OMS, 2005 modificado para la exposición a superficies tratadas.



Las condiciones ambientales para todos los bioensayos y tratamientos fueron de 25 - 30°C y 70 a 80% de humedad relativa.

### 3.2.2 Bioensayos Dosis Letales (DL)

En los bioensayos se utilizaron dosis exploratorias para ninfas de I y V estadio, las cuales fueron: para los 12 análogos sintéticos 25, 125, 500 ppm y para los

aceites esenciales 30, 300 y 1000 ppm, escogiéndose la molécula con mejor actividad insecticida. Se realizó una nueva batería de dosis múltiples asimétricas cuyos resultados de mortalidad dosis-respuesta se utilizaron para determinar la  $DL_{50}$  y  $DL_{95}$  mediante el análisis de probit.

### **3.2.3 Análisis estadístico**

Los valores del porcentaje de mortalidad de las dosis-respuestas de los bioensayos, en ninfas I y V estadio, se ordenaron, y se sometieron a “*test*” de normalidad para su posterior análisis. Se realizaron análisis Probit para determinar los parámetros estadísticos, Dosis letales ( $DL_{50}$  y  $DL_{95}$ ) y sus respectivos intervalos de confianza con la molécula que presentó mejor actividad insecticida. Los programas estadísticos que se utilizaron fueron “*Statística v11*” y el Probit (Finney, 1971; Raymond, 1985).

## 4. RESULTADOS

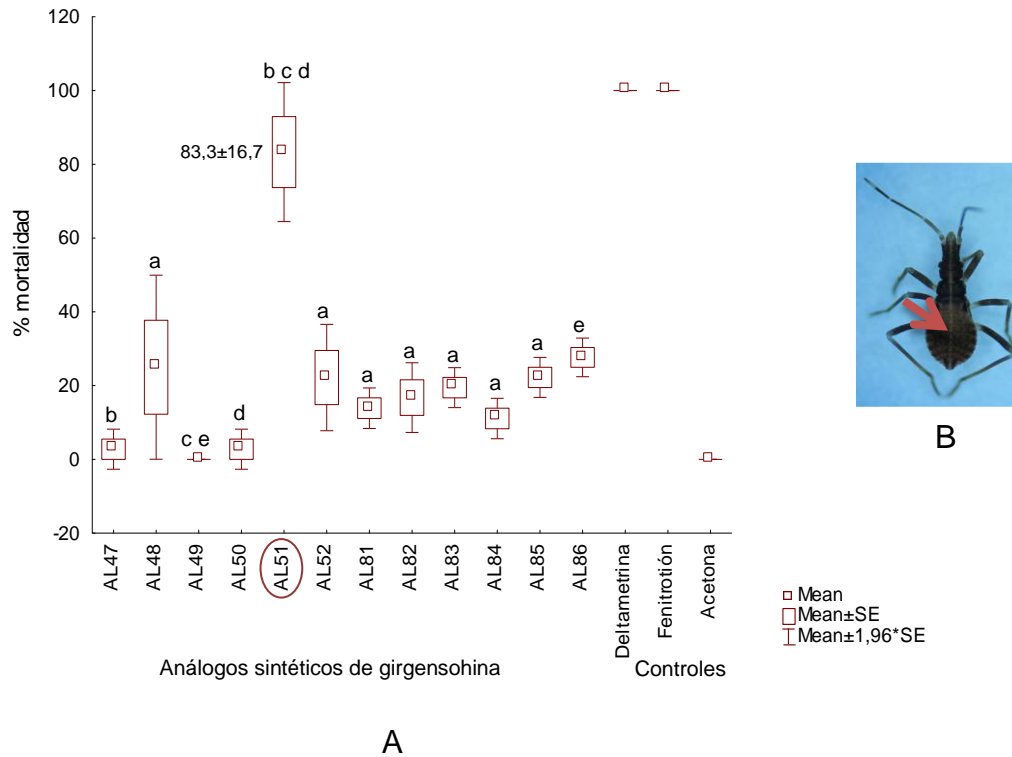
La mayor actividad insecticida se observó a las 72 h a 500 ppm y 1000 ppm para los análogos sintéticos y el aceite esencial *C. flexuosus* tanto en la topicación de tergutitos/esternitos y exposición a superficies tratadas. No hubo mortalidad para los controles con Acetona para los tratamientos utilizados. 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 y U de Mann Whitney.

### 4.1 ANÁLOGOS SINTÉTICOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA, APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS I ESTADIO *R. PROLIXUS*.

Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 12 análogos sintéticos en tergutitos, esternitos y en la exposición a superficies tratadas. Se observó actividad insecticida en 11 análogos en tergutitos, 12 análogos en esternitos y 6 en superficies tratadas. La mejor molécula fue AL51 con una mortalidad a las 72h y 500 ppm de  $83,3 \pm 16,7\%$  en tergutitos (Figura 3),  $38,9 \pm 4,8\%$  en esternitos (Figura 4) y  $16,7 \pm 0\%$  en exposición a superficies tratadas (Figura 5).

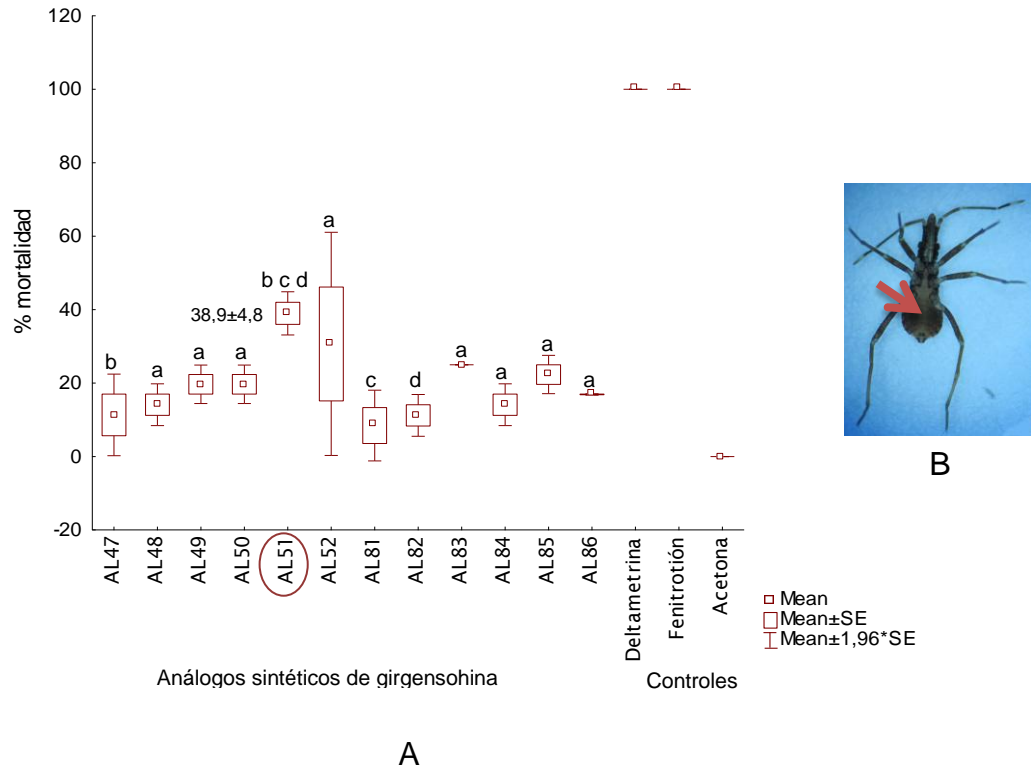
Al comparar los dos tipos de topicación tergutitos y esternitos a las 72 h y 500 ppm, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los análogos sintéticos: AL51 ( $p=0,046302$ ), AL86 ( $p=0,043115$ ) y AL48 ( $p=0,043115$ ) (Tabla 2).

**Figura 3.** Actividad insecticida de cada uno de los 12 análogos sintéticos a las 72 h y 500 ppm en ninfas de I estadio de *R. prolixus* en la topicación de terguitos.



A) Test de Kruskal-Wallis:  $H(14, N=45) = 36,51205$   $p = 0,0009$ . Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas, letras diferentes existen diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis test:  $H(11, N=36) = 25,34536$   $p = ,0081$ ). B) Aplicación tópica de terguitos en ninfas de I estadio.

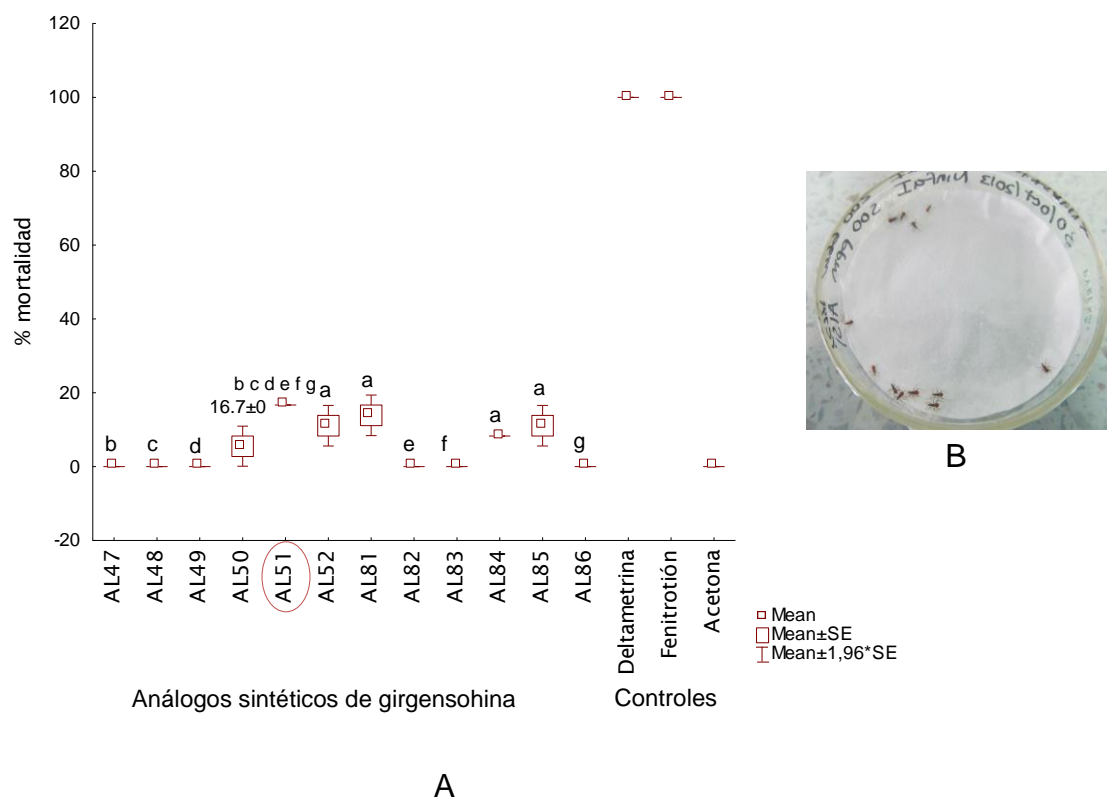
**Figura 4.** Actividad insecticida de cada uno de los 12 análogos sintéticos a las 72 h y 500 ppm en ninfas de I estadio de *R. prolixus* en la topicación de esternitos.



A) Test de Kruskal-Wallis:  $H(14, N=45)=33,98065$   $p=0,0021$ . Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas, letras diferentes existen diferencias estadísticamente significativas  $p<0,05$  (Kruskal-Wallis test:  $H(11, N=36)=19,99018$   $p=,0455$ ). B) Aplicación tópica de esternitos en ninfas de I estadio.

**Figura 5.** Actividad insecticida de cada uno de los 12 análogos sintéticos a las 72 h y 500 ppm en ninfas de I estadio de *R. prolixus* en la exposición a superficies tratadas.

**Figura. 5 (Continuación)**



A) Test de Kruskal-Wallis:  $H(14, N=45)=41,89138$   $p=0,0001$  Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas, letras diferentes existen diferencias estadísticamente significativas  $p<0,05$  (Kruskal-Wallis test:  $H(11, N=36)=31,89083$   $p=,0008$ ). B) Aplicación tópica en exposición a superficies tratadas en ninfas de I estadio.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al confrontar los tres tipos de tratamientos (Figura 6). La comparación entre los 12 análogos sintéticos y los tres tipos de tratamientos mostraron diferencias significativas en: AL51 ( $p=0,0234$ ), AL86 ( $p=0,0226$ ), AL48 ( $p=0,0234$ ), AL82 ( $p=0,0446$ ), AL50 ( $p=0,0498$ ) y AL49 ( $p=0,0457$ ) (Tabla 3). Se determinó por análisis de probit las dosis letales (DL) para AL51 las cuales fueron:  $DL_{50}$  225,60 ppm y  $DL_{95}$  955,90 ppm topicación tergutitos a las 72 h y 500 ppm (Tabla 4).

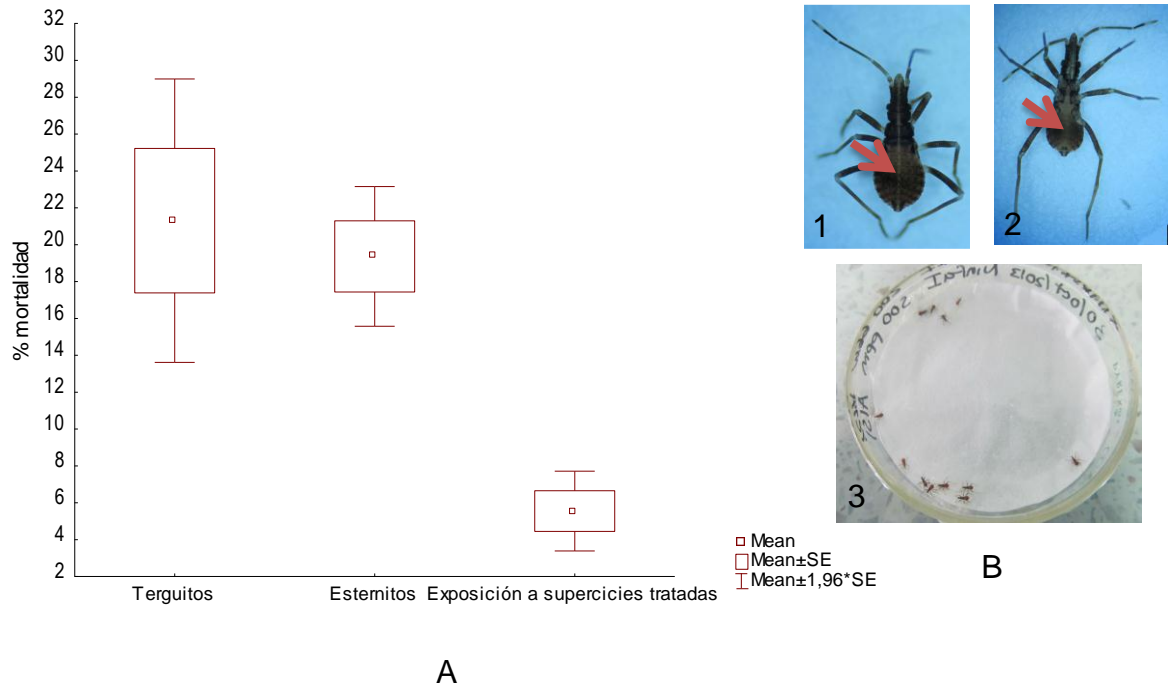
**Tabla 2.** Comparación entre cada uno de los 12 análogos sintéticos con respecto a su aplicación tópica en tergutitos y esternitos en ninfas de I estadio de *R. prolixus* a las 72 h y 500 ppm.

Moléculas	Terguitos Mortalidad (%±DE)	Esternitos Mortalidad (%±DE)	Test probabilidad Mann-Whitney (p<0,05)
AL51	83,3±16,7	38,9±4,8	0,046302*
AL86	27,8±4,8	16,7±0	0,043115*
AL48	25±22	13,9±4,8	0,046302*
AL85	22,2±4,8	22,2±4,8	0,796254
AL52	22,2±12,7	30,6±26,7	0,512691
AL83	19,4±4,8	25±0	0,113847
AL82	16,7±8,3	11,1±4,8	0,345779
AL81	13,9±4,8	8,3±8,3	0,653095
AL84	11,1±4,8	13,9±4,8	0,238594
AL50	2,8±4,8	19,4±4,8	1,000000
AL47	2,8±4,8	11,1±9,6	0,238594
AL49	0	19,4±4,8	1,000000

%±DE: Porcentaje de mortalidad y desviación estándar. \* Valores estadísticamente significativos.

**Figura 6.** Comparación de tergutitos, esternitos y exposición a superficies de los 12 análogos en ninfas de I estadio de *R. prolixus* a las 72 h y 500 ppm.

**Figura. 6** (Continuación)



A) Test de Kruskal-Wallis:  $H(2, N=108) = 31,92304$   $p = 0,0000$ . B) 1. Aplicación tópica de terguitos. 2. Aplicación tópica de esternitos. 3. Exposición a superficies tratadas.

**Tabla 3.** Comparación de cada uno de los 12 análogos sintéticos y los tres tipos de tratamientos en ninfas de I estadio de *R. prolixus* a las 72 h y 500 ppm.

**Tabla. 3** (Continuación)

Moléculas	Terguitos Mortalidad (%±DE)	Esternitos Mortalidad (%±DE)	Exposición a superficies tratadas Mortalidad (%±DE)	Test probabilidad Kruskal-Wallis (p<0,05)
AL51	83,3±16,7	38,9±4,8	16,7±0	0,0234*
AL86	27,8±4,8	16,7±0	0	0,0226*
AL48	25±22	13,9±4,8	0	0,0234*
AL85	22,2±4,8	22,2±4,8	11,1±4,8	0,067
AL52	22,2±12,7	30,6±26,7	11,1±4,8	0,5501
AL83	19,4±4,8	25±0	0	0,0289*
AL82	16,7±8,3	11,1±4,8	0	0,0446*
AL81	13,9±4,8	8,3±8,3	13,9±4,8	0,8599
AL84	11,1±4,8	13,9±4,8	8,3±0	0,195
AL50	2,8±4,8	19,4±4,8	5,6±4,8	0,0498*
AL47	2,8±4,8	11,1±9,6	0	0,195
AL49	0	19,4±4,8	0	0,0457*

%±DE: Porcentaje de mortalidad y desviación. \* Valores estadísticamente significativos.

**Tabla 4.** Dosis letales DL<sub>50</sub> y DL<sub>95</sub> (ppm) de la mejor molécula con actividad insecticida AL51 a las 72 h en ninfas I estadio de *R. prolixus*.

Topicación	DL <sub>50</sub>	DL <sub>95</sub>	X <sup>2</sup>
Terguitos	225,60 (194,38-257,97)	955,9 (729,31-1443,64)	1,88

Intervalos de confianza de 95% (entre paréntesis). DL<sub>50</sub>: dosis letal que causa la mortalidad al 50% de las ninfas expuestas al tratamiento. DL<sub>95</sub>: dosis letal que causa la mortalidad al 95% de las ninfas expuestas al tratamiento. X<sup>2</sup>: Chi-cuadrado.

#### 4.2 ACEITE ESENCIAL *C. FLEXUOSUS*, APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS I ESTADIO *R. PROLIXUS*.

En la tabla 5 se observa la actividad insecticida de *C. flexuosus* en esternitos a las 72 h y 1000 ppm, con una mortalidad de 11,1±4,8% en esternitos y exposición a superficies tratadas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos utilizados para *C. flexuosus*.

**Tabla 5.** Comparación entre los tres tipos de tratamientos y el aceite esencial *C. flexuosus* en ninfas de I estadio de *R. prolixus* a las 72 h y 1000 ppm y sus respectivos controles.

sustancias	Terguitos Mortalidad (%±DE)	Esternitos Mortalidad (%±DE)	Exposición a superficies tratadas Mortalidad (%±DE)	Test probabilidad Kruskal-Wallis (p<0,05)
<i>C. flexuosus</i>	0	11,1±4,8	11,1±4,8	0,0457*
<i>C. sinensis</i>	5,6±4,8	8,3±0	0	0,0608
<i>E. citriodora</i>	0	0	0	-
Acetona	0	0	0	-

%±DE: Porcentaje de mortalidad y desviación estándar. Aceites esenciales *C. sinensis*, *E. citriodora* y Acetona controles.

#### 4.3 ANÁLOGOS SINTÉTICOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA Y ACEITE ESENCIAL *C. FLEXUOSUS*, APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS V ESTADIO *R. PROLIXUS*.

La mortalidad en ninfas de V estadio fue 0% al evaluar las dosis y moléculas propuestas, bajo condiciones de laboratorio.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 ANÁLOGOS SINTÉTICOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA, APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS I ESTADIO *R. PROLIXUS*.

La actividad insecticida en tergutitos y esternitos es debido probablemente a que los análogos sintéticos son moléculas hidrofóbicas y al ser aplicadas tópicamente podría atravesar fácilmente la cutícula de las ninfas de I estadio. Hadaway, (1971) y Germano, (2012) reportaron que las sustancias hidrofóbicas penetran más fácilmente en la cutícula del insecto que las sustancias hidrofílicas debido a que la cutícula está formada en su gran mayoría por lípidos y ceras que son más afines a estas sustancias. Otro factor que pudo haber influenciado la actividad insecticida fue el grado de esclerotización, Alzogaray, (1996) reporta que en las ninfas de 24 a 36 horas de edad presentan una semiesclerotización haciendo que estas ninfas sean más susceptibles a sustancias externas, otros autores reportan la susceptibilidad de estas ninfas de I estadio en sus estudios (Juárez & Fernández, 2007; Reyes *et al.*, 2007; Cáceres *et al.*, 2011; Germano, 2012).

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 los soportes. Algunos autores (Sandoval, 2001; Rojas de Arias *et al.*, 2003; Palomino *et al.*, 2008) reportaron que la falta de persistencia de las sustancias en algunas superficies porosas retienen las partículas, disminuyendo la disponibilidad y la interacción insecto - sustancia. Esto puede haber ocurrido en nuestro estudio bajando la actividad insecticida de los análogos sintéticos en las superficies expuestas. Stampini *et al.*, (2008) sugiere aumentar la dosis del ingrediente activo cuando el tratamiento se lleva a cabo sobre algunas superficies porosas. Otro factor que puede haber influenciado la bioactividad de los análogos sintéticos está en el hecho, de que al exponer las ninfas de I estadio

en las cajas de petri con el papel filtro impregnado se dirigieron hacia los extremos del papel donde permanecieron durante todo el bioensayo lo cual disminuyo su interacción con las moléculas.

A pesar que en la literatura no se encuentra aún reportada la actividad insecticida de los alcaloides sintéticos de girsensohnina frente a triatominos, Carreño *et al.*, (2014) reportó la actividad insecticida de estos análogos contra el vector del dengue en donde AL47 fue la molécula con mayor actividad insecticida lo cual no se observó en este estudio, ya que la AL51 fue la mejor molécula. Sin embargo, su eficacia fue menor al igual que los otros análogos utilizados, en comparación con sus controles insecticidas deltametrina y fenitrotión en cada uno de los tratamientos aplicados, esto también fue observado en estudios de otros autores (Sfara *et al.*, 2009; Sainz *et al.*, 2012; Moretti *et al.*, 2013).

## **5.2 ACEITE ESENCIAL *C. FLEXUOSUS*, APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS I ESTADIO *R. PROLIXUS*.**

La baja actividad insecticida en tergutitos y esternitos para el aceite esencial se debe probablemente a su volatilidad, al evaporarse la acetona cuando se aplica tópicamente arrastra algunos componentes activos del aceite esencial utilizado, bajando así su bioactividad. En la exposición a superficies tratadas, también pudo haber ocurrido lo mismo, disminuyendo la saturación de los compuestos activos dentro de la caja de petri. Algunos autores reportan resultados donde comparan la actividad insecticida de la topicación con respecto a la exposición a superficies expuestas con diferentes aceites esenciales, y presentan también una baja actividad (Fournet *et al.*, 1996; Sfara *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2013).

### **5.3 ANÁLOGOS SINTÉTICOS DEL ALCALOIDE GIRGENSOHNINA Y ACEITE ESENCIAL *C. FLEXUOSUS*, APLICACIÓN TÓPICA DE TERGUITOS/ESTERNITOS Y EXPOSICIÓN A SUPERFICIES TRATADAS EN NINFAS V ESTADIO *R. PROLIXUS*.**

En el caso de las ninfas de V estadio donde no hubo actividad insecticida, es posible que esto se deba, a que estas ninfas son las más tolerantes a sustancias externas debido a su alto grado de esclerotización haciendo que la penetración cuticular sea más lenta, favoreciendo así su metabolismo degradativo. Otro factor importante es que la toxicidad está directamente relacionada con el peso promedio del estadio ninfal, a mayor peso mayor dosis (Alzogaray, 1996). En este estudio nosotros utilizamos las mismas dosis para las ninfas I y V estadio lo que pudo haber afectado nuestros resultados. La baja actividad insecticida en ninfas de V estadio cuando se reporta, se ha observado en algunos estudios (Alzogaray, 1996; Carvajal *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2007; Carneiro *et al.*, 2013).

## 6. CONCLUSIONES

Los análogos sintéticos y *C. flexuosus* presentaron actividad insecticida en ninfas de I estadio de *R. prolixus*.

La actividad insecticida en los análogos varió según el modo de aplicación: topicación en terguitos/esternitos con una alta actividad y exposición de superficies tratadas baja actividad en ninfas de I estadio.

La molécula que presentó mayor actividad insecticida en ninfas de I estadio fue AL51.

Se observó una baja actividad del aceite esencial tanto en la aplicación tópica como en la exposición a superficies tratadas en ninfas de I estadio.

No hubo actividad insecticida en ninfas de V estadio en cada uno de los tratamientos y moléculas evaluadas.

## BIBLIOGRAFÍA

ABUHAB, A.; TRINDADE, E.; AULICINO, G. B.; FUJII, S.; BOCCHI, E. A.; BACAL F. Chagas' cardiomyopathy: the economic burden of an expensive and neglected disease. En: International Journal of Cardiology. Vol. 3, No.168 (oct. 2013); p. 2375-2380.

ALZOGARAY, R. A. Caracterización de la toxicidad de insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* (Klug). Buenos Aires, 1996, 111 p. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires.

BESTETTI, B. R.; CASDINALLI-NETO, A. Dissecting slander and crying for justice: Carlos Chagas and the Nobel Prize of 1921. En: International Journal of Cardiology. Vol. 3, No. 168 (oct. 2013); p. 2328–2334.

BONNEY K. M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat?. En: Parasite. Vol. 21 (feb. 2014); p. 1-10.

CÁCERES, L.; ROVIRA, R. J.; CALZADA, J.; SALDAÑA, A. Evaluación de la actividad tóxica de los insecticidas piretroides deltametrina y lambdacihalotrina en dos poblaciones de campo de *Rhodnius pallescens* (Hemiptera:Reduviidae) de Panamá. En: Biomédica. Vol 1, No. 31( mar 2011); p. 8-14.

CARABARIN-LIMA, A.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, M. C.; RODRÍGUEZ-MORALES, O.; BAYLÓN-PACHECO, L.; ROSALES-ENCINA, J. L.; REYES-LÓPEZ, P. A.; ARCE-FONSECA, M. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. En: Acta Tropica. Vol. 127 No. 2 ( aug. 2013); p.126-135.

CARNEIRO, A. P.; PAREIRA, M. J.; GALBIATI C. Biocide activity of *Annona coriacea* seeds extract on *Rhodnius neglectus* (Hemiptera:Reduviidae). En: Revista de Biología Tropical. Vol. 1 No. 61(mar. 2013); p. 419-427.

CARVAJAL, H. E.; ORJUELA F. Y.; VALLEJO G. A. Evaluación de la actividad insecticida de *Solanum macranthum* (Dunal) sobre ninfas de los estadios IV y V de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius colombiensis*. En: Revista Cubana de Farmacia. Vol. 1 No. 45 (2010); p. 71-78.

CARREÑO, A. L. O; VARGAS, L. Y. M.; DUQUE J. E. L.; KOUZNETSOV, V. V. Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsensohnine analogs on *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). En: European Journal of Medicinal Chemistry. Vol. 78 (mar. 2014); p. 392-400.

FINNEY, D. J. Probit Analysis. Cambridge University Press. 3rd Edition, 1971.

FOURNET, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; CHARLES, B.; BRUNETON, J. Chemical constituents of essential oils of muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. En: Journal Ethnopharmacology. Vol. 5 No. 52 (jul. 1996); p.145-149.

GERMANO, M. D. Herencia y efectos demográficos de la resistència a deltametrina en *Triatoma infestans*. Buenos Aires, 2012, 155 p. Tesis doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos.

GUHL, F. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. En: Revista Biomédica. Vol. 20 No. 3 (Sep - dic. 2009); p. 228-234.

HADAWAY, A. B. Some factors affecting the distribution na rate of action of insecticide. En: Bull. Org. mond. Santé. Vol. 44 (1971); p. 221-224.

Juárez; M. P. & Fernández. Cuticular hydrocarbons of triatomines. En: Comparative Biochemistry and Physiology . Vol. 3 No. 147 (jul. 2007); p. 711–730.

MORETTI, A. N.; ZERBA, E. N.; ALZOGARAY, R. A. Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) to 10 monoterpene alcohols. En: Entomological Society of America. Vol 5 No. 50 (sep. 2013); p. 1046-1054.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - OMS. Protocolo de evaluación de efecto insecticida en *Triatoma infestans*. Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas. CIPEIN Argentina. (2005).

PALOMINO, M.; VILLASECA, P.; CÁRDENAS, F.; ANCCA, J.; PINTO, M. Eficacia y residualidad de dos insecticidas piretroides contra *Triatoma infestans* en tres tipos de vivienda. Evaluación de campo en Arequipa, Perú. En: Revista Peruana de medicina experimental y salud pública. Vol. 24 No. 2 ( abri. – jun. 2008); p. 136-43.

PEREZ, J. C.; LYMBERY A. J.; THOMPSON, R. C. Chagas disease: the challenge of polyparasitism?. En: Trends Parasitology. Vol. 4 No. 30 (apr. 2014); p. 176-182.

RAYMOND, M. Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cahiers ORSTOM, série Entomologie médicale. En: Parasitologie. Vol. 23 (1985); p. 117-121.

REYES, M.; ANGULO V. M.; SANDOVAL, C. M. Efecto tóxico de b-cipermetrina, deltametrina y fenitrotión en cepas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y

*Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). En: Biomédica. Vol. 27 (jun. 2007); p. 75-82.

ROJAS DE ARIAS, A.; LEHANE M. J.; SCHOFIELD C. J.; FOURNET A. (2003). Comparative evaluation of pyrethroid insecticide formulations against *Triatoma infestans* (Klug): residual efficacy on four substrates. En: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 7 No. 98 ( oct. 2003); p. 975-980.

SAINZ, P.; SANZ, J.; BURILLO, J.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; BAILÉN, M.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. Essential oils for the control of reduviid insects. En: Phytochemistry reviews Vol. 11 (2013); p. 361-369.

SANDOVAL, C. M. Actividad insecticida del Malatión y Deltametrina en una cepa Colombia de *Rhodnius prolixus* (Hemíptera:Reduviidae). Monitoreo de la resistencia a insecticidas en Triatominos en América Latina. En: Red Latinoamericana de Control de Triatominos. (2001); p. 27-32.

SCHOFIELD, C. J. & GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups with in the Triatominae. En: Acta Tropica. Vol. 2-3 No. 110 (may-jun 2009); p. 88-100.

SFARA, V.; ZERBA, E. N.; ALZOGARAY, R. A. (2009). Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. En: Journal of medical entomology. Vol. 3 No. 46 (may. 2009); p. 511-515.

STAMPINI, M.; GIRGENTI, P.; LOCATELLI, P. D. Activity of Deltamethrin on different surfaces against *Plodia interpunctella* larvae (Lepidoptera Pyralidae). En: Istituto di Entomologia agraria, Università degli Studi di Milano. (2008); p. 1-6.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis).  
Fact sheet N°340 (mar 2014); p. 1-4.

ZAMBRANO, P. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública Chagas. En: SIVIGILA.  
Vol. 1 (2014); p. 1-29.