



UNIVERSIDAD DE SONORA
UNIDAD REGIONAL NORTE



DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

TESIS PROFESIONAL

Extracción y Cuantificación de Hidrocarburos Cuticulares de *Triatoma
longipennis* por Cromatografía en Columna y de Gases

Que para obtener el título de:

QUIMICO BIOLOGO
ESPECIALIDAD EN ANALISIS CLINICOS

Presenta:

Gabriel Ivan Márquez Rivera

H. Caborca, Sonora

Febrero de 2008

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Particulares.....	3
ANTECEDENTES.....	4
Enfermedad de Chagas.....	5
Infección parasitaria.....	6
Desarrollo de la enfermedad.....	6
Aspectos clínicos.....	7
<i>Triatoma longipennis</i>	9
Morfología.....	9
Ciclo de vida.....	11
Comportamiento.....	11
<i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Morfología.....	13
Ciclo de vida.....	15

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO (continuación)

	Página
Membranas Cuticulares.....	17
Hidrocarburos cuticulares.....	17
Quimiotaxonomía.....	18
Cromatografía en el Análisis Químico.....	20
Separaciones cromatográficas.....	20
Polaridad.....	21
Cromatografía de adsorción.....	21
Técnica de elusión.....	22
Cromatografía Líquida en Columna.....	23
Cromatografía de Gases.....	24
Instrumental para cromatografía de gases.....	24
MATERIALES Y METODOS.....	27
Lugar de Investigación.....	27
Material de Laboratorio Instrumental.....	27
Reactivos Químicos.....	28
Material Biológico.....	29
Procedimiento Experimental.....	29
Sacrificio y desprendimiento de alas.....	31
Extracción de hidrocarburos cuticulares.....	31
Separación de la muestra por cromatografía en columna.....	33

CONTENIDO (continuación)

	Página
Análisis por Cromatografía de Gases.....	35
Análisis cualitativo.....	35
Análisis cuantitativo.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	39
Manejo de Muestra en la Obtención del Extracto.....	39
Separación de los Hidrocarburos Cuticulares.....	40
Identificación Cualitativa de Hidrocarburos Cuticulares.....	42
Identificación Cuantitativa de Hidrocarburos Cuticulares.....	46
Composición de Hidrocarburos Cuticulares.....	49
Comparación de Hidrocarburos Entre los Géneros.....	50
CONCLUSIONES.....	53
RECOMENDACIONES.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Imagen de <i>Triatoma longipennis</i> aumentado 2 X.....	10
2	Estadíos de <i>Triatomas</i> en el transcurso de su vida.....	12
3	Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
4	Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
5	Foto del sistema evaporador de nitrógeno con 4 salidas.....	32
6	Foto de la columna cromatográfica.....	34
7	Foto del cromatógrafo de gases (VARIAN cp-3800).....	38
8	Cromatograma de las fracciones eluidas de hidrocarburos.....	41
9	Cromatograma característico de <i>T. longipennis</i> macho.....	44
10	Cromatograma característico de <i>T. longipennis</i> hembra.....	45
11	Gráfica de comparación de HC lineales predominantes entre géneros.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Lista de estándares utilizados para la cuantificación de HC.....	30
2	Tiempo de retención de los estándares en el cromatograma inyectados individualmente.....	43
3	Identificación de hidrocarburos presentes en alas primarias y secundarias de <i>Triatoma longipennis</i> macho.....	47
4	Identificación de hidrocarburos presentes en alas primarias y secundarias de <i>Triatoma longipennis</i> hembra.....	48
5	Composición de HC y desviación estándar en alas primarias y secundarias de <i>Triatoma longipennis</i>	52

RESUMEN

Triatoma longipennis, es uno de los insectos que participa como vector de la enfermedad denominada “Enfermedad de Chagas”, la cual es causada por un parásito flagelado llamado *Trypanosoma cruzi*, el cual es desalojado en el huésped por las heces del insecto del género *Triatoma* después de alimentarse de sangre por una picadura indolora. Esta enfermedad se distribuye por toda América, desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina, mayormente en áreas rurales de mayor pobreza en Centro y Sudamérica, incluyendo algunos de los estados de México, con una fuerte incidencia en nuestro país. Por tal motivo, es importante desarrollar metodologías que ayuden a identificar los principales vectores que se encuentran dentro de nuestra región, y que pueden ser indicadores de riesgo para la proliferación de dicha enfermedad. En este trabajo se identificaron y cuantificaron los hidrocarburos cuticulares (HC) de las alas primarias y secundarias de *T. longipennis* por medio de cromatografía.

Los insectos fueron sometidos a un choque térmico (-4°C/15min) para su sacrificio, para posteriormente quitarle las alas y realizar la extracción de compuestos grasos e hidrocarburos con 1.5 mL de hexano, bajo condiciones ambientales. Los HC fueron purificados de la muestra por medio de cromatografía en columna la cual fue empacada con 1.5 gr de sílica gel (70-230 mesh), para ser previamente eluidos con 2.0 mL de hexano HPLC. Las muestras eluidas fueron concentradas evaporando el solvente a sequedad con una corriente de nitrógeno y resuspendidas en 5 µL de hexano, la cual fue inyectada al cromatógrafo de gases. La identificación y cuantificación de los hidrocarburos cuticulares se realizó con estándares certificados (ALDRICH), los cuales van desde el C19 (nonadecano) hasta el C40 (tetracontano). Las muestras se inyectaron (300 °C) a un equipo de cromatografía de gases (VARIAN cp-3800), provisto con una columna Factor Four (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm) y los componentes fueron separados por un programa de temperatura (iniciando a 50 °C por 1 min y después fue aumentando gradualmente 15 °C/min hasta 300 °C, manteniéndose a esa temperatura por 10 min). La detección se realizó por medio de ionización de flama (FID, 300 °C), utilizando helio de alta pureza como gas acarreador.

Se obtuvieron los cromatogramas característicos de *Triatoma longipennis*, con excelente resolución de los picos, los cuales fueron identificados con el análisis del Índice de Kovats (IK) encontrándose un total de 40 HC (14 lineales y 26 ramificados) en machos, y 38 HC (14 lineales y 24 ramificados) en hembras. El HC27 mostró mayor diferencia significativa entre ambos sexos (5.74 % en machos y 11.97 % en hembras), lo cual crea la característica en las hembras de formar una campana de gauss, en el cromatograma con los hidrocarburos característicos lineales. La mayoría de los HC encontrados en machos fueron similares a las hembras, excepto por 2 hidrocarburos ramificados los cuales no se encontraron en hembras, con longitud de cadena de 24 carbonos (IK: 2467, 2472). Los hidrocarburos característicos, que representan los marcadores taxonómicos de la especie *Triatoma longipennis* son los hidrocarburos lineales, HC23 (1.78%), HC25 (5.31%), HC27 (8.86%), HC29 (16.30%), HC31 (13.70%), HC33 (5.03%). El HC que presentó mayor concentración fue el HC29 (17.04% en machos y 15.55% en hembras), mientras el que presentó menor concentración fue el HC23 (2.43% en machos y un 1.11% en hembras), el hidrocarburo ramificado de mayor concentración fue uno de 37 carbonos (IK: 3778).

Los resultados de este trabajo demuestran o concluyen que existe un perfil característico de hidrocarburos cuticulares para la especie *Triatoma longipennis*, y que existe una diferencia significativa entre géneros, con lo cual nos puede ayudar a una mejor comparación entre especies y a identificar quimiotaxonómicamente este importante vector de la enfermedad de Chagas. Se concluyó que las alas del insecto contienen los mismos hidrocarburos cuticulares que el cuerpo, y son una fuente de hidrocarburos más confiable, ya que al utilizar el cuerpo se corre el riesgo de extraer hidrocarburos de la linfa. También se demostró que se pueden desarrollar o modificar técnicas de identificación que nos permitan dar un seguimiento químico a estas especies vectoriales en nuestra región.

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas o “Tripanosomiasis Americana” se encuentra ampliamente distribuida en el Continente Americano, es endémica en 21 países, con reportes a principio de los años noventa de 16-18 millones de personas infectadas y 100 millones (25 % de la población de América Latina) en riesgo de contraerla. La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, que es transmitido al hombre por medio de las heces de insectos del género *Triatoma*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a este padecimiento como la enfermedad parasitaria mas grave de América (Schofield, 1985).

En México, se estima que 70 millones de personas viven en riesgo constante para la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas y otros 20 millones de individuos están en riesgo por su presencia ocasional en zonas infestadas. Por lo cual, es necesario contar con herramientas nuevas que nos permitan identificar a las especies vectoras y así definir zonas de riesgo (Goldsmith y Heyneman, 1995). En México se estima una incidencia anual de 44,000 nuevos casos con una prevalencia actual de 2.5 – 3.0 millones de personas infectadas (López y col., 2002).

En base a estudios que se han realizado particularmente sobre 9 especies de triatomíneos del género *Triatoma*, se ha visto que los hidrocarburos cuticulares (HC) son alcanos lineales de 25 a 33 átomos de carbono y cadenas de alcanos ramificados de uno o tres grupos metilos insertados a lo largo de un esqueleto carbonado de 29 a 41 átomos de carbono (Juárez y Fernández, 2007).

Por lo tanto, se pueden utilizar la composición de los HC triatomeos como criterio taxonómico para separar poblaciones, especímenes individuales con base en la comparación gráfica de sus correspondientes perfiles (huellas dactilares), o el cálculo cuantitativo de indicadores numéricos como la determinación de los HC. Debido a que por el momento no existe alguna vacuna o droga eficiente para controlar la enfermedad de Chagas, una alternativa es controlar los vectores (Juárez y col., 2002).

La identificación y cuantificación de hidrocarburos que contienen los especímenes de estudio es demasiado pequeña. Por tal motivo, se requiere establecer una metodología para la concentración de los HC capaz de ser reproducible y que pueda manejar un gran número de muestras. Esto nos lleva a utilizar técnicas para la separación diferencial de los compuestos en una muestra como son, la cromatografía en columna y técnicas de análisis altamente sensibles como la cromatografía de gases, los cuales nos ayudan a identificar los HC de los triatomeos y mediante análisis estadísticos lograr la cuantificación.

OBJETIVOS

Objetivo General

Extraer y cuantificar la composición de hidrocarburos cuticulares en *Triatomas longipennis*.

Objetivos Particulares

Establecer las condiciones para el manejo de muestras en la obtención del extracto crudo.

Definir las condiciones para el aislamiento de los hidrocarburos cuticulares por cromatografía de adsorción en columna.

Identificar cualitativamente el tipo de hidrocarburos por el análisis de Índice de Kovats.

Comparar cualitativamente y cuantitativamente la composición de hidrocarburos cuticulares entre los géneros masculino y femenino de la especie *Triatoma longipennis*.

ANTECEDENTES

La parasitología es una rama de la biología la cual esta encargada de estudiar la relación que se establece entre dos especies. En esta relación se distinguen dos factores biológicos: el parásito y el huésped, siendo el parásito el que vive a expensas de la otra especie a la que se denomina huésped (Harold y Franklin, 1995). La parasitosis sucede cuando los parásitos encuentran en el huésped las condiciones favorables para su anidamiento, desarrollo, multiplicación y virulencia, de modo que pueda ocasionar una enfermedad. Debido a que los parásitos están bien adaptados a sus modos de vida, son difíciles de destruir, ya que han ido evolucionando al desarrollar estrategias para evitar los mecanismos de defensa del huésped y muchos han conseguido ser resistentes a los medicamentos e insecticidas que se aplican para su control (Chester y col., 1990).

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria frecuente en Sudamérica y toda América Central. Las detecciones serológicas masivas revelan que, en regiones endémicas, se encuentra infectado del 15 – 50 % de la población. En este mismo informe, se reporta que en México hay aproximadamente 3.8 millones de casos, el Centro Nacional de Transfusión Sanguínea en México reporta hasta un 3.5% de bolsas contaminadas con el parásito. Hoy en día, la enfermedad de Chagas es la parasitosis más importante en México. Según el Banco Mundial, la enfermedad de Chagas es económicamente hablando, más importante que todas las enfermedades parasitarias juntas, incluyendo paludismo, leishmaniasis y oncocercosis. (Shofield, 1985; Imbert y col., 2004).

Enfermedad de Chagas

Esta enfermedad parasitaria fue nombrada en reconocimiento al médico e infectólogo brasileño Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879-1934), quien en 1909 un 23 de abril la describió por primera vez. Pero no fue hasta 1960 donde fue considerada un problema de salud público. Chagas descubrió que en los intestinos de los triatomíneos albergaba un protozoo flagelado, el cual podía transmitirse a monos típicos del género *Callithrix* y a monos ardilla, Chagas llamo a este protozoo *Trypanosoma cruzi* y luego *Schizotrypanum cruzi* honrando en ambos casos a Oswaldo Cruz famoso médico y epidemiólogo brasileño, el cual fue su maestro. Luego de que otros investigadores describieran a la *Pneumocystis* como un género independiente, Chagas volvió al uso del nombre *Trypanosoma cruzi*. Chagas creía erróneamente que la vía de infección principal era la picadura del insecto y no las heces de este (Chagas, 1993).

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una clara infección zoonótica parasitaria del *Trypanosoma cruzi*, teniendo como principal vector chinches reduvidas del género *Triatoma*, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en América central y Sudamérica. Los principales huéspedes vertebrados son el hombre, animales silvestres y domésticos (Hulsebos, 1989). Las chinches reduvidas permanecen infectadas al pasar por diferentes etapas de su vida. Después de la multiplicación del parásito en el intestino del vector, algunos parásitos se desarrollan a *pomastigotes* infectantes, los cuales son transmitidos a los vertebrados por contaminación fecal (Chester y col., 1990).

Infección parasitaria

La contaminación de *T. cruzi*, se lleva a cabo después de que el vector se alimenta de sangre por medio de una picadura indolora, puesto que es frecuente que defequen durante o después de haber picado, el sitio de la picadura se infecta fácilmente, ya que el parásito se encuentra en las heces de los triatomas. La víctima puede rascar o frotar la zona lesionada sin darse cuenta, provocando el transporte del parásito a mucosas de los ojos u otros sitios. Siendo esta la transmisión mas importante de *T. cruzi* hacia los humanos y otros mamíferos. Los parásitos se pueden transmitir por transfusiones sanguíneas, transmisión transplacentaria, transmisión accidental, transmisión oral y transmisión por trasplante de órganos. Generalmente los mas afectados por la transmisión vectorial son jóvenes y niños, aunque las condiciones ambientales juegan un papel importante, debido a que los casos agudos humanos se detectan la mayoría en verano (Wendel y col., 1992).

Desarrollo de la enfermedad

Al principio, el parásito se multiplica en las células del tejido subcutáneo en el sitio de la inoculación, dando lugar a una lesión local llamada *Chagoma*, las células infectadas permanecen en buen estado hasta que el parásito las rompe al multiplicarse, ocurriendo una importante reacción inflamatoria afectando a todos los tipos de células, produciendo edema local. En la etapa inicial de la infección, se detecta la enfermedad observando tripanosomas en la sangre por el método Giemsa (Brown y Neva, 1995).

Al volverse mas crónica la infección, los parásitos intracelulares disminuyen en cantidad y ya no se descubren tripanosomas en la sangre periférica, hasta en aquellos individuos que mueren con las manifestaciones típicas de la enfermedad de Chagas crónica (Chester y col., 1990).

Aspectos clínicos

Las manifestaciones clínicas pueden presentarse en tres formas, etapa aguda, con parásitos en la sangre, la cual es de poca duración y suele afectar a los niños pero a menudo es leve y pasa inadvertida, etapa crónica son mucho mas comunes y duraderas cuando hay lesiones cardiacas o gastrointestinales, lo que se presenta en adultos en etapa tardía, ambas están separadas por una etapa clínicamente asintomática, la cual se le denomina etapa indeterminada. A lo largo de la enfermedad se pueden presentar daños en cualquier órgano en cualquier etapa, pudiendo causar la muerte 95% de las veces, la infección no produce síntomas, o son tan leves, que no se perciben (Mujica, 1998).

Etapa aguda. Esta etapa de la enfermedad puede o no manifestarse clínicamente, los casos agudos por vía vectorial se observan en niños independientemente del sexo. En la transmisión por transfusiones la incidencia es mayor en adultos. El signo clínico mas importante en esta etapa es la fiebre, con una duración de 2 – 4 semanas después del contacto inicial con el parásito, generalmente se acompaña de cefalea. El edema subcutáneo se presenta en más del 50 % de los casos, iniciando en la cara y

desplazándose hacia el tronco y extremidades. La cardiopatía parece ser la lesión más constante, la hepatoesplenomegalia se presenta del 30 – 40% de los casos, especialmente en lactantes. La detección de esta etapa es primordial ya que aquí la enfermedad puede ser curable.

Etapa indeterminada. La caracterización de esta etapa se debe a la presencia de infección y ausencia de síntomas y anormalidades electrográficas y radiológicas, por lo cual se considera que el paciente está sano. La evolución a esta etapa clínica es debido al descuido de la etapa aguda. Esta etapa puede persistir por el resto de la vida en un 40% de pacientes infectados, y gran parte de ellos podrán presentar síntomas cardíacos y digestivos después de 15 – 25 años. En estos pacientes, la infección puede ser rápidamente activada durante una enfermedad severa o en condiciones de inmunosupresión severa.

Etapa crónica. Esta etapa se manifiesta de forma cardíaca, siendo esta la más estudiada, los síntomas más frecuentes son palpitaciones, mareos, disnea, edema y dolor de pecho, teniendo como complicaciones más importantes embolismo pulmonar y la muerte repentina. El tracto digestivo también se ve involucrado en la etapa crónica, siendo más afectados el esófago y el colon. También se involucra el sistema nervioso central, siendo estos los síntomas más desconocidos de la etapa crónica, pero se han observado daño al cerebro y convulsiones. En aproximadamente un 30% de los casos se presentan complicaciones en el corazón y en el tracto digestivo, 10 a 30 años después de la infección inicial (Wendel y col., 1992).

Triatoma longipennis

El insecto *Triatoma longipennis* es uno de los más importantes vectores de la enfermedad de Chagas en México, acorde a su distribución, alto grado de domesticación y altos indicadores entomológicos. Pertenece al orden Hemípteros (latín Hemiptera), los cuales son un grupo de insectos que se caracterizan por tener un aparato bucal chupador con el cual se alimentan de sangre. Sus microhábitats domiciliarios son muy diversos; se le ha encontrado asociado con gallinas, cerdos, roedores y humanos, así como con diversos animales en microhábitats silvestres (Goldsmith y Heyneman, 1995).

Morfología

Este insecto pertenece a la subfamilia *Triatominae*, tribu *Triatomini*, género *Triatoma*, especie *longipennis*. El insecto es de los de mayor tamaño en el género *Triatoma*, debido a su tamaño es mayor la cantidad de hidrocarburos que se pueden extraer de su cutícula, por lo cual es un buen espécimen para trabajos de investigación. Este triatoma cuenta con un aparato succionador en la parte frontal (probóscide), con la cual se alimenta de sangre (hematófagos). Las hembras contienen un ovopositor en la parte posterior del cuerpo, el cual los machos no poseen, la cabeza es mas larga que ancha, donde contienen 2 antenas las cuales les permiten detectar el calor para poder alimentarse, cuentan con un par de alas primarias y un par de alas secundarias, siendo estas mas pequeñas. Poseen 2 patas delanteras, 2 patas medias y 2 patas posteriores (Fig. 1) (Vidal y col., 2002).



Figura 1. Imagen de *Triatoma longipennis* aumentado 2 X.

Tomado de: Magallon y col., 2006.

Ciclo de vida

El insecto se reproduce por huevos, que miden de 2 – 3 mm, de color blanco, que cambian a rosado cuando se completa la evolución del embrión. Desde que sale del huevo hasta que alcanza el estado adulto (formas aladas), el *Triatoma* pasa por cinco etapas de crecimiento (estadios ninfales), con cambios graduales de tamaño y sin alas. En cada cambio pierde su pelecho. Desde el estado de huevo hasta la etapa adulta, el ciclo evolutivo del *Triatoma* puede variar de ocho meses hasta un año. A partir del estadio adulto la vida de este insecto se prolonga entre uno y dos años (Fig. 2) (IPCA, 2002).

Comportamiento

El *Triatoma* puede desarrollarse en zonas de temperaturas frías. No obstante tratarse de un insecto de climas cálidos y debido a sus hábitos domiciliarios, el ambiente más propicio para su desarrollo es la vivienda. Por lo tanto, la tibieza de las habitaciones favorece su supervivencia. No es común verlos durante las horas del día, ya que se trata de un animal de hábitos nocturnos, para lo cual tiene una vista especializada. Durante las horas diurnas el *Triatoma* permanece escondido. La resistencia al ayuno de este insecto es muy grande, la ninfa de quinto estadio (estado previo al adulto) soporta más de seis meses de ayuno (Bastien, 1998). Los estados evolutivos dotados de alas, las emplean en vuelos lentos y pesados, que sin embargo en condiciones apropiadas de viento, los pueden llevar a kilómetros de distancia (Maldonado, 2002).

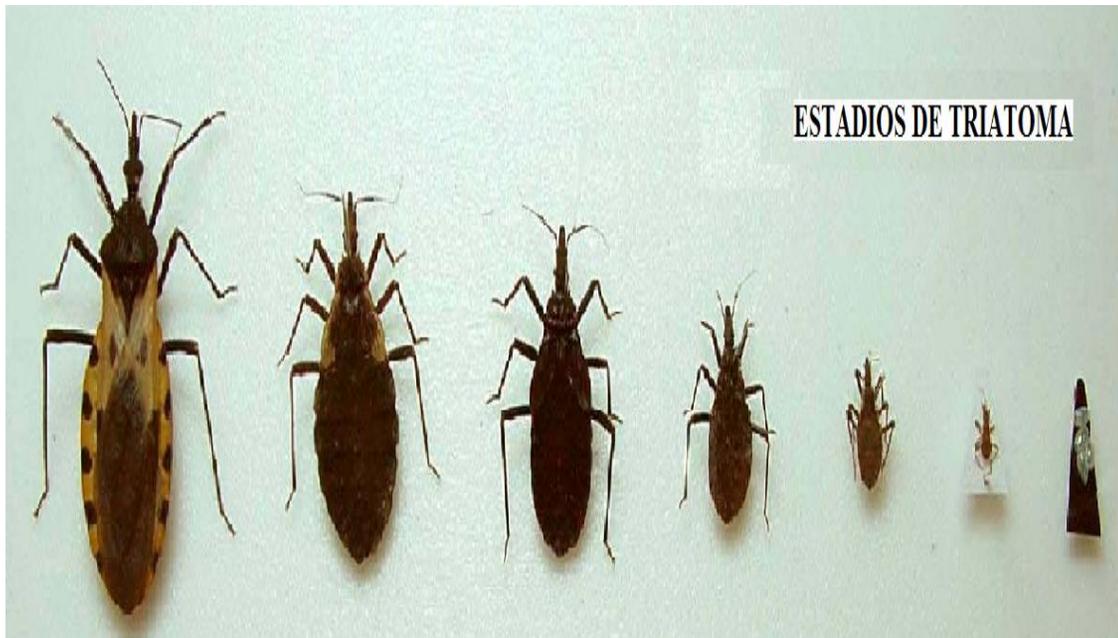


Figura 2. Estadios de *Triatomas* en el transcurso de su vida.

Tomado de: IPCA, 2000.

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado del reino *Protista*, filo *Euglenozoa*, clase *Kinetoplastida*, orden *Tripanosomatidae*, género *Trypanosoma*, especie *T. cruzi*. Es caracterizado por la presencia de un flagelo y una sola mitocondria, dentro de la cual su genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta red denominada *cinetoplasto*. Es un parásito intracelular con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados, siendo el agente etiológico de la enfermedad de Chagas.

Morfología

El *T. cruzi* es muy pequeño (mide aproximadamente 20 μ), posee un cuerpo alargado provisto de un flagelo y una membrana ondulante, estructuras que, agitándose y vibrando, permiten su movilización dentro de la masa de sangre. Las poblaciones de *T. cruzi* circulan en la naturaleza entre el hombre, el vector y los reservorios. A lo largo de su ciclo evolutivo sufren profundas alteraciones de forma que, de modo general, reflejan su adaptación al medio en que se localizan. Esas formas reciben nombres diferentes en función de su aspecto general, de la manera como el flagelo emerge del cuerpo celular y de la posición relativa de dos importantes estructuras intracelulares: el núcleo y el *cinetoplasto* (órgano de movimiento). Este parásito presenta tres morfologías distintas: *amastigote* (esférico u ovalado, se reproduce en las células), *epimastigote* (alargado, forma reproductiva en el tracto digestivo) y *tripomastigote* (alargado y se encuentra en la sangre, siendo esta la forma infectante) (fig. 3) (Cevallos y Hernandez, 2004).

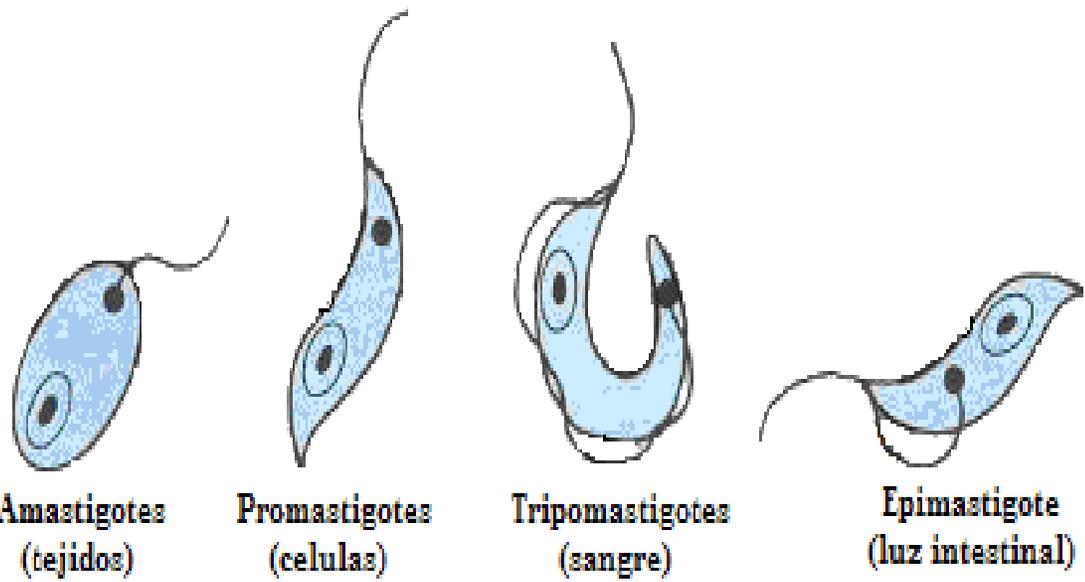


Figura 3. Morfología de *Trypanosoma cruzi*.

Tomado de: Vidal y col., 2002.

Ciclo de vida

El parásito transmitido al hospedador vertebrado en las heces de la vinchuca es llamado en esta etapa *tripomastigote metacíclico*. Los tripomastigotes pueden invadir inmediatamente las células en la puerta de entrada o pueden ser transportados en la sangre a otros sitios antes de invadir las células del hospedador. Dentro de estas células se transforman en formas *amastigotes* que se multiplican rápidamente. Los amastigotes son redondeados con un flagelo externo muy corto o inexistente. El desarrollo de amastigotes a tripomastigotes se iniciaría después de cumplirse un número preprogramado de divisiones intracelulares, al cabo de las cuales la célula hospedera se destruye y los tripomastigotes entran en el torrente sanguíneo (tripomastigotes sanguíneos). Los tripomastigotes encontrados en la sangre circulante, de un tamaño total que varía entre 15 y 20 μ tienen flagelo libre, un cinetoplasto voluminoso, terminal o subterminal que contiene el 30% del ADN del parásito, y un núcleo oval. Estos tripomastigotes pueden infectar células, y no son capaces de multiplicarse en la sangre (Goldsmith y Heyneman, 1995).

El insecto nace libre de la infección, hasta que se infecta alimentándose de sangre de vertebrados infectados. Los tripomastigotes migran al intestino medio del insecto donde se transforman en epimastigotes. Ahí se divide un gran número de veces. Los *Triatomas* quedan infectados de por vida. Los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos y migran al intestino posterior donde son excretados con las heces en el momento de la picadura (Fig. 4).

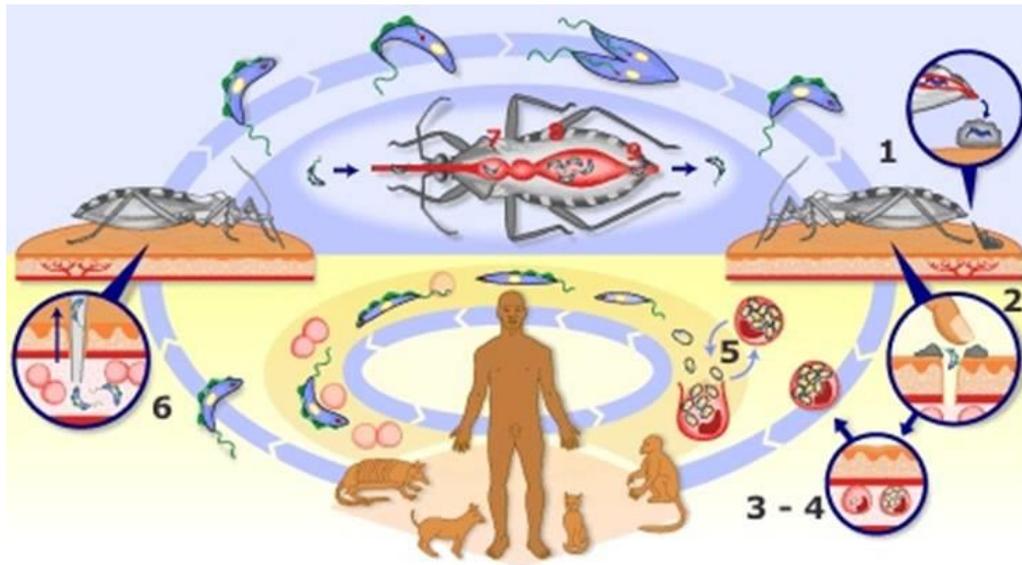


Figura 4. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*.

Tomado de: Maldonado, 2002.

1.- Picadura del triatoma 2.- Infección parasitaria a través de la herida 3.- Alojamiento del parásito en las células 4.- Reproducción del parásito dentro de las células 5.- Rompimiento de células y liberación del parásito al torrente sanguíneo 6.- Infección del Triatoma a través de la picadura hematófaga.

Membranas Cuticulares

La superficie cuticular de los insectos, están cubiertas por una gran variedad de compuestos grasos, dentro de los cuales se encuentran mezclados los hidrocarburos. Los lípidos cuticulares juegan un papel importante dentro de la protección del insecto, ya que previenen la desecación del mismo reduciendo la transpiración, y dándole permeabilidad a la cutícula sobre los vapores de agua. Además, los lípidos cuticulares constituyen una barrera contra la penetración de insecticidas (Juárez y Blomquist, 1993).

Los lípidos que se encuentran en la membrana del insecto pueden ser, fosfolípidos, triacilgliceroles, colesterol, ceras. En la membrana también se puede o no encontrar quitina, el cual es un compuesto formado por la degradación de glicoproteínas, quedando constituido por polisacáridos. Los hidrocarburos también pueden tener varias funciones en el comportamiento (ej. Feromónas) y en la fisiología de los insectos (Nation, 2002).

Hidrocarburos cuticulares

El sitio de biosíntesis de HC en el insecto, se encuentra en las células asociadas a la capa epidérmica o al cuerpo periférico graso. Los HC son biosintetizados por los oenocitos, siendo estas células ectodérmicas. Los hidrocarburos son transportados a la superficie cuticular del insecto por la hemolinfa, para ser almacenados en la glándula post faríngeal.

Se han realizado estudios sobre biosíntesis de lípidos, sin embargo para fines de quimiotaxonomía se ha dado mayor importancia a los hidrocarburos cuticulares, y a la facilidad con la que se extraen y se cuantifican. Las alas de los insectos, contienen los mismos hidrocarburos cuticulares que en la superficie cuticular. Los hidrocarburos que generalmente se encuentran en la cutícula del insecto, son alcanos lineales de 25 a 33 átomos de carbono, y cadenas de alcanos ramificados de uno o tres grupos metilos insertados a lo largo de un esqueleto carbonado de 29 a 41 átomos de carbono (Juárez, y col., 2001).

Quimiotaxonomía

La quimiotaxonomía es la ciencia que estudia las sustancias químicas de los grupos taxonómicos. El uso de hidrocarburos cuticulares de insectos para determinar si están en el mismo o diferente taxón es un área de investigación muy interesante. La realización de estudios con el fin de analizar e identificar compuestos químicos presentes en la cutícula del insecto, es para poder lograr una comparación por medio de la composición de hidrocarburos cuticulares en diferentes especies de triatomíneos, logrando así definir poblaciones dentro de una misma especie, con el fin de poder controlar este importante vector de la enfermedad de Chagas (Howard, 1993). Una diversidad de grupos de insectos han sido estudiados en los últimos años en lo que respecta a sus hidrocarburos cuticulares como posible semioquímicos (Dhabi y col., 1996). Los semioquímicos se definen como sustancias químicas usadas en la comunicación entre individuos de la misma especie o diferente especie (Norlund y Lewis, 1976).

En la actualidad la quimiotaxonomía vegetal hace uso de muy diversas metodologías analíticas, con las que se ha llegado a determinar la época de recolección del material o aun hasta su distribución geográfica. Entre los estudios quimiotaxonómicos más recientes efectuados se puede mencionar en el que se emplea la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para analizar los flavonoides presentes en diferentes especies vegetales autóctonas (Zalochi y col., 1990). Se han estudiado recientemente los componentes volátiles de las hojas de especies de *Ilex paraguariensis* por cromatografía de gases, utilizando una columna capilar con metilfenilsilicona como fase estacionaria, con el fin de contribuir a su caracterización taxonómica. La yerba mate (te del Paraguay) es producida en Argentina mediante un proceso tradicional, con algunas renovaciones en su maduración empleando una mezcla de *Ilex paraguariensis* y a veces con trozos de ramas jóvenes y pedículos florales, lo que favorece a su adulteración o sustitución con otras especies de *Ilex*. Esta investigación optimizó un método analítico para clasificar quimiotaxonómicamente a la especie *Ilex paraguariensis* mediante el análisis de sus componentes volátiles, permitiendo el seguimiento mas preciso del proceso tecnológico de elaboración de la yerba mate, con el fin de garantizar la calidad del producto para su consumo (Romero y col., 1990).

Se han realizado estudios con diversas especies de *Triatomas* con el fin de analizar e identificar compuestos químicos presentes en cutícula como con *Rhodnius prolixus* (Juárez y col., 2001), *Triatoma mazzottii* (Juárez y Blomquist, 1993). También se han realizado comparaciones por medio de la composición de los hidrocarburos cuticulares como con diversos *Triatomas* (Juárez, 2000).

Cromatografía en el Análisis Químico

La palabra cromatografía, se deriva de los vocablos griegos *khromatos*, que significa color y *graphos*, que significa escritura. La cromatografía se basa en la separación de los compuestos en relación a la afinidad diferencial de los compuestos entre el adsorbente y la fase móvil. La cromatografía tiene como principal función, la separación de una mezcla en sus constituyentes individuales, para lo cual son utilizadas técnicas de separaciones cromatográficas (Joseph, 1975). La cromatografía no solo permite la separación de los componentes de una mezcla, sino también su identificación y cuantificación. El análisis cualitativo está basado en la medida de parámetros cromatográficos (tiempos y volúmenes de retención) mientras que el análisis cuantitativo está basado en la medida de alturas o áreas de picos cromatográficos que se relacionan con la concentración (Skoog, 2005).

Separaciones cromatográficas

Todas las separaciones cromatográficas se logran mediante la distribución de los constituyentes de una mezcla entre dos fases, de los cuales una es fija, llamada fase estacionaria y la otra que se desplaza, llamada fase móvil. La separación de los compuestos se logra debido a que algunas sustancias son retenidas mas fuertemente en la fase estacionaria que otras, por lo tanto, tienen menor tendencia a desplazarse en la fase móvil. La polaridad de un compuesto, influye en una buena o mala separación cromatográfica de dicho compuesto (Joseph, 1975).

Polaridad

La palabra polaridad en cromatografía, es aplicada a los compuestos por separar y a los disolventes empleados en la separación. Se le llama *polar* al compuesto que es adsorbido fuertemente por la fase estacionaria en una separación, y *no polar* cuando no es retenido. Por otra parte un disolvente no polar, es el que casi no desplaza a los compuestos adsorbidos y es polar cuando es muy eficiente desplazando compuestos en retención.

Cromatografía de adsorción

El fenómeno de adsorción a diferencia de la cromatografía de absorción, es un fenómeno de superficie, en donde los compuestos son adheridos a la fase estacionaria y no absorbidos por ella (Tejeda y col., 1995). La fase estacionaria que se utiliza en cromatografía de adsorción, es un sólido como la sílice, en tanto que la fase móvil generalmente es un líquido o aunque también puede ser un gas. En este tipo de cromatografía, la separación se logra debido a la adsorción selectiva de los constituyentes por separar, el grado de separación depende notablemente de la superficie activa del sólido y por otra parte, el tamaño de la partícula sólida que se utiliza debe ser lo menor posible para tener mayor superficie activa. En el caso de adsorción física o simple, las fuerzas de atracción entre el soluto y el adsorbente son de tipo van der Waals. En la adsorción física el adsorbente mas utilizado en bioseparaciones es el carbón activado y la sílica gel.

Los lípidos pueden ser separados fácilmente de otras biomoléculas por extracción con solventes orgánicos y pueden ser separados por técnicas experimentales como son cromatografía de adsorción, cromatografía de placa fina y cromatografía de fase reversa.

En investigaciones recientes sobre la “Composición en Acidos Grasos de Larvas D de Almeja Fina (*Ruditapes decussatus*)” se realizó la separación de dos familias de lípidos neutros y lípidos polares mediante una cromatografía de adsorción empleando como fase estacionaria gel de sílice hidrato al 6% y como fases móviles cloroformo/metanol (98:2) y metanol. Obtenidas las dos fracciones se procede a la transesterificación empleando trifluoruro de boro. Para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos se emplea en la cromatografía de gases (Novoa y col., 2002). En este tipo de cromatografía una vez adheridas las partículas a la fase estacionaria, es utilizada la técnica de elusión, para una mejor separación cromatográfica (Skoog, 1991).

Técnicas de elusión

Esta técnica es la más empleada en las separaciones cromatograficas y representa el fenómeno básico de las separaciones. Esta técnica consiste en utilizar un disolvente como eluyente, el cual al aplicarlo a la columna donde se encuentra la fase estacionaria, favorezca la desorción del compuesto de interés, permitiendo así ir separando las zonas entre compuestos, hasta que el compuesto más móvil salga por la parte inferior de la columna. En la técnica de purificación de hidrocarburos cuticulares se utiliza la elusión por gravedad.

Cromatografía Líquida en Columna

Este método cromatográfico es uno de los más empleados para fines preparativos en laboratorios de química orgánica, la función de este método es ir logrando hacer la separación de los constituyentes de una mezcla dada. La columna es generalmente un tubo de vidrio en forma cilíndrica, cuya altura es de 10-20 veces mayor al diámetro, las dimensiones pueden variar de acuerdo a la cantidad de substancia que se desee separar, algunas columna en el fondo pueden llegar a tener una llave que nos permita regular el goteo. Como criterio, puede considerarse que por cada gramo de mezcla que se desee separar, se usan entre 20 y 100 gramos de adsorbente, considerando fundamentalmente la diferencia de polaridad de los constituyentes de la mezcla. La cromatografía en columna se logra aprovechando la atracción de la gravedad para que el líquido gotee (Joseph, 1975).

Un factor importante que influye en una buena o mala separación cromatográfica, es la preparación de la columna, la cual se refiere al procedimiento en el que se coloca el adsorbente en el interior de la columna, ya que una columna bien empacada permitirá al disolvente fluir con velocidad uniforme en toda una sección transversal de la columna, por lo tanto, también a lo largo de esta, obteniendo mejores separaciones. En las cromatografías en columna, es importante que los disolventes que se empleen sean muy puros, ya que los contaminantes de los disolventes alteran el curso completo de los desarrollos cromatográficos (Tejeda y col., 1995).

Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases, es empleada para el análisis y la separación de mezclas gaseosas, también se emplea para compuestos volátiles y para sólidos que se puedan pasar al estado gaseoso. Al inyectar una pequeña cantidad de muestra que se desea separar, esta es agregada al flujo de la corriente de un gas inerte, el cual pasa por una columna en la que se efectúa la separación cromatográfica, logrando salir los componentes ya separados (Skoog, 1991). Las grandes ventajas de este método cromatográfico, es que se realizan separaciones cuantitativas de mezclas muy complejas, además de que en este método los tiempos requeridos para efectuar un análisis dado, son generalmente cortos comparados a otros métodos (Tejeda y col., 1995). La cromatografía de gases (CG) se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector.

Instrumental para cromatografía de gases

Puerto de inyección. Este es provisto de un orificio tapado con un septum de hule, de tal manera que la aguja pasa por el hule y al volver a sacarla, el hule sella nuevamente. Para la inyección de sólidos en solución y de líquidos, ya sea con o sin disolvente, son utilizadas jeringas calibradas a 10 μL . La cantidad de muestra a inyectar, depende de la complejidad de la muestra, de la similitud de la muestra por separar, del tamaño y tipo de columna que se este empleando.

Gas acarreador. Este es contenido en un cilindro de alta presión, el cual es conectado al cromatógrafo, empleando un regulador para asegurar una presión constante a la entrada de la columna, la función principal de este es acarrear la muestra a través de la columna, logrando así la salida de los componentes en forma individual. Es importante que el gas sea inerte para evitar reacciones químicas, que su difusión gaseosa sea pequeña para evitar que los componentes individuales de la mezcla se extiendan mucho, que se pueda obtener con mayor pureza y que sea adecuado para el detector que se emplee. Además, el flujo del gas acarreador debe de ser escogido adecuadamente, ya que la eficiencia de la columna depende de este parámetro (Joseph, 1975).

Columna cromatográfica. En la columna es donde se separan los compuestos en base a temperatura y a la polaridad del compuesto, utilizando el método de elusión, teniendo como eluyente al gas acarreador. El grosor depende de la volatilidad del analito. Así, un analito muy volátil requerirá una capa gruesa para aumentar el tiempo de interacción y separar más efectivamente los diferentes componentes de la mezcla.

Detectores. Son dispositivos que por medio de señales eléctricas indican la presencia de un compuesto y miden la cantidad del mismo, cuando este sale de la columna cromatográfica con la ayuda del gas acarreador. Para una buena detección de compuestos es necesario, que el detector tenga alta sensibilidad, el nivel de ruido electrónico que genere debe ser mínimo, que sea poco sensible a cambios de temperatura y a los cambios de flujo del gas acarreador.

Cromatogramas. Estos nos muestran el perfil de concentración de cada compuesto, simbolizándolo en picos, obteniendo dos parámetros importantes, el área del pico y el tiempo de retención. El área del pico nos permite determinar la concentración de cada compuesto en el Cromatograma, y el tiempo de retención, es el tiempo que transcurre al salir un pico después de haber inyectado la muestra, utilizándolo para identificar compuestos (Skoog, 1991).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de la Investigación

Este trabajo se llevó a cabo en el “Laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado” del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, ubicado en la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte campus Caborca.

Materiales de Laboratorio

Al material de vidrio utilizado en la investigación, se le dio un tratamiento de purificación, eliminando así contaminantes de cualquier tipo, los cuales pudieran afectar los resultados. Fue lavado previamente con agua de la llave y jabón, eliminando así partículas de polvo. Se dejó reposar en una solución de 20 mL de extran por cada litro de agua destilada (extran 2%), durante 20 minutos, con el fin de eliminar residuos de grasas. Se enjuagó con agua destilada y agua tridestilada según el orden, para después llevarlo a sequedad en una incubadora a 40 °C. El material limpio y seco se guardó en bolsas de polietileno hasta su uso. Los viales para utilizar las muestras extraídas y concentradas, se compraron con especificaciones de volumen 4 mL, transparentes, con tapón de plástico firme con rosca. Se utilizaron pinzas entomológicas en la extracción de las alas del insecto, las cuales fueron previamente lavadas con metanol, eliminando así contaminantes, fueron lavadas antes de cada extracción de alas de los diferentes especímenes.

Para la separación cromatográfica en columna se utilizó una columna fabricada por “Comercial Argentina”, la cual fue diseñada según las condiciones adecuadas al método de “Extracción de Hidrocarburos Cuticulares” adquirida en el “Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Argentina”. A la columna se le adicionó un tapón de algodón en el fondo, el cual evitó la fuga de sílica al ser empacada. Se le agregó 2 mL de hexano grado HPLC a la columna para poder empacarla con 1.5 gr de sílica gel, la cual fue agregada golpeando suavemente las paredes de la columna, logrando así acomodar la sílica en el fondo evitando grietas, de este modo quedó empacada y activada la columna para proceder a la purificación de la muestra.

El cromatógrafo de gases utilizado fue un equipo VARIAN CP-3800 con detector de flama de ionización (FID), utilizando helio como gas acarreador y una mezcla de aire-hidrógeno para crear la flama de detección. La columna capilar utilizada para la separación de compuestos fue la columna Factor Four VF5ms, (CP8955, Supelco) con dimensiones, 30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m

Reactivos Químicos

Para la extracción de los hidrocarburos cuticulares, la elusión en la cromatografía en columna y para la inyección de la muestra en el cromatógrafo de gases, se utilizó hexano grado HPLC con 99 % de pureza (Sigma-Aldrich). Para la extracción por cromatografía en columna se utilizó sílica gel (Sigma-Aldrich) con un tamaño de partícula de 70 – 230 mesh.

Para la identificación y cuantificación de los hidrocarburos cuticulares se utilizaron 18 estándares certificados (C19-C40) los cuales se listan en la Tabla 1 (ALDRICH).

Material Biológico

Los insectos fueron proporcionados por el M.C. Edgar A. Paredes González, responsable del Bioterio de la Universidad de Sonora-Unidad Regional Norte campus Caborca. En total se utilizaron 20 insectos adultos de la especie *Triatoma longipennis*, (10 machos y 10 hembras). Después de su captura, los insectos se mantuvieron a una temperatura controlada de 28 °C, alimentados con sangre de gallina hasta su sacrificio.

Procedimiento Experimental

Primeramente, se procede a sacrificar por congelación a los insectos, para después desprender las alas de donde se extrajeron los HC, dando un tratamiento especial libre de contaminación. El extracto fue pasado a través de una columna empacada con sílica gel para la separación de lípidos de los HC. Los HC fueron colectados en un vial, después fue evaporado el solvente con una corriente de nitrógeno para lograr la concentración de la muestra en el vial. Las muestras conteniendo los HC fueron recuperadas en 5 µL de hexano caliente, para lograr inyectar 2 - 5 µL directamente al cromatógrafo de gases donde se identificó y cuantificó la composición de HC.

Tabla 1. Lista de estándares utilizados para la cuantificación de HC.

ESTANDARES	PUREZA	MARCA
C19-Nonadecano	99%	ALDRICH
C20-Eicosano	99%	ALDRICH
C21-Heneicosano	99%	ALDRICH
C22-Docosano	98%	ALDRICH
C23-Tricosano	100%	ALDRICH
C24-Tetracosano	96%	ALDRICH
C25-Pentacosano	100%	ALDRICH
C26-Hexacosano	98%	ALDRICH
C27-Heptacosano	99%	ALDRICH
C28-Octacosano	99%	ALDRICH
C29-Nonacosano	99%	ALDRICH
C30-Triacontano	100%	ALDRICH
C31-Heneitriacontano	99%	ALDRICH
C32-Dotriacontano	98%	ALDRICH
C33-Tritriacontano	99%	ALDRICH
C36-Hexatriacontano	95%	ALDRICH
C38-Octatriacontano	98%	ALDRICH
C40-Tetracontano	96%	ALDRICH

Sacrificio y desprendimiento de alas

Para lograr el sacrificio por congelación, los insectos vivos fueron sometidos a una temperatura de 4°C durante un tiempo de 15 min dentro de un congelador. Una vez muertos los insectos, las alas fueron desprendidas cuidadosamente con pinzas entomológicas, para evitar el desgarre de las mismas. Se utilizaron las alas primarias y secundarias de los *Triatomas*, ya que, aquí se encuentran los mismos hidrocarburos cuticulares que en la cutícula del insecto (Chester y col., 1990). Las muestras fueron transportadas y conservadas cubriéndolas con papel aluminio (previamente rotulado) a temperatura ambiente hasta su posterior tratamiento.

Extracción de hidrocarburos cuticulares

Primeramente, las alas fueron lavadas con agua tridestilada para eliminar contaminantes solubles en agua. Una vez que se secaron a temperatura ambiente, las alas se colocaron dentro de los viales de 4 mL previamente rotulados. Posteriormente se agregaron 1.5 mL de hexano grado HPLC para lograr la extracción de los compuestos grasos y los hidrocarburos, dejándolo reposar un día. Al concluir la extracción, las alas se retiraron de los viales con las pinzas entomológicas, y se les agregó unas gotas de hexano caliente, con el fin de obtener la mayor cantidad de hidrocarburos. Finalmente, para lograr la concentración de la mezcla de hidrocarburos y lípidos en el vial, el solvente fue evaporado utilizando una corriente de nitrógeno (Fig. 5). Las alas fueron guardadas en papel aluminio para futuras investigaciones morfológicas.



Figura 5. Foto del sistema evaporador de nitrógeno con 4 salidas.

Tomado de: Paredes, 2008.

Separación de la muestra por cromatografía en columna.

Una vez concentrados los hidrocarburos y lípidos en el vial, se agregan por las paredes 0.5 mL de hexano caliente, procurando lavar completamente las paredes para lograr bajar y obtener la mezcla de hidrocarburos y compuestos grasos en el fondo del vial. La muestra es tomada con una pipeta Pasteur de vidrio con una capacidad de 2 mL e inyectada a la columna de líquidos, la cual fue previamente empacada con 1.5 gr. de sílica gel y activada con 2.5 mL de hexano. Para la elusión de los compuestos no adsorbidos se utilizaron 2.0 mL de hexano como eluyente por gravedad, la columna cuenta con una llave en la parte inferior, con la cual se controla el flujo de goteo en la columna (fig.6). Los hidrocarburos fueron recolectados en un vial a la salida de la columna, mientras que los lípidos fueron adsorbidos fuertemente por la sílice. La columna empacada fue reutilizada para purificación de dos muestras más sin recambio de adsorbente. Para el cambio de sílica se utilizó una bomba de vacío con la cual se extrajo la sílica utilizada y se lavó la columna con hexano para nuevamente empacarla.

Una vez obtenida la muestra con los hidrocarburos purificados, es evaporado el solvente nuevamente con una corriente de nitrógeno y reconstituida con hexano, repitiéndose este procedimiento 2 veces más, con disminución gradual en la cantidad de hexano utilizado en la redisolución de la muestra, con el fin de lograr la concentración de hidrocarburos en el fondo del vial antes de ser inyectada al cromatógrafo de gases, la razón por la cual los hidrocarburos se concentran en el fondo del vial, es que se requiere inyectar la mayor cantidad de hidrocarburos posibles para un resultado más confiable.

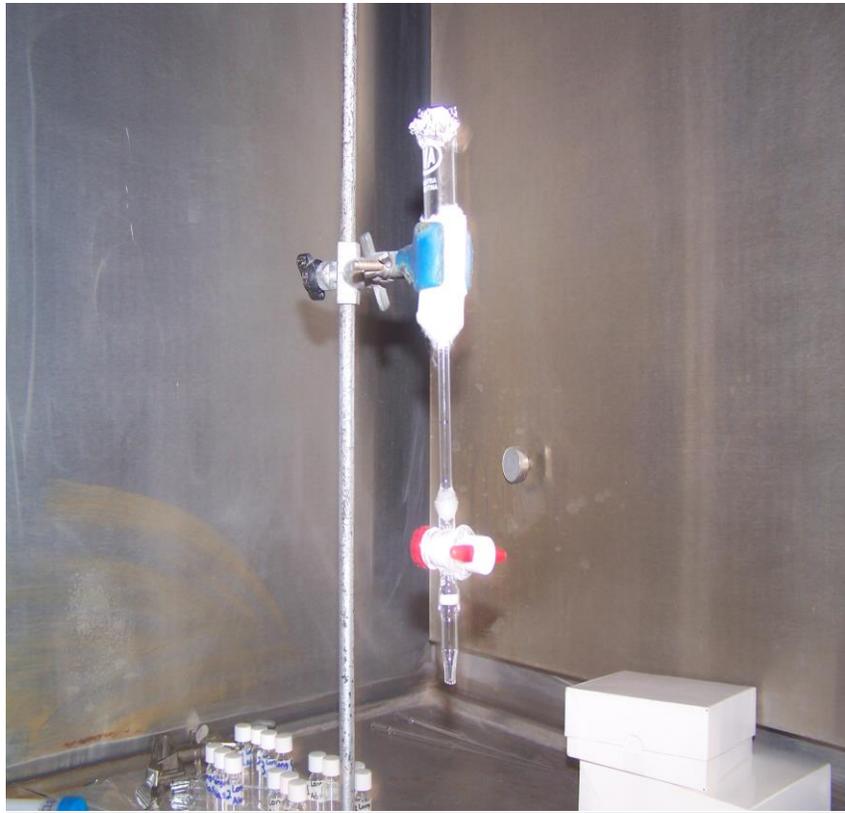


Figura 6. Foto de la columna cromatográfica.

Tomado de: Paredes, 2008.

Análisis por Cromatografía de Gases

Previo a la inyección de las muestras, fue inyectada una cantidad de 2 μl de hexano al cromatógrafo de gases, obteniendo una línea base con el pico del hexano y libre de impurezas en la columna. El análisis de los hidrocarburos se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (VARIAN cp-3800) (Fig.7). Se utilizó una columna capilar Factor Four 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm , a la cual se le inyectaron 2 - 5 μl de cada muestra de hidrocarburos. La temperatura programada del inyector es de 300 °C, el flujo del gas acarreador (helio) es de 2.5 mL/min, con un make up de 27 mL/min, la rampa de temperaturas de la columna fue programada a 50 °C durante 1 min y después aumentó 15 °C/min hasta alcanzar 300 °C, manteniéndose a esa temperatura por 10 min, la temperatura a la que se programó el detector (FID) fue de 300°C.

Análisis cualitativo

Los tiempos de retención no son información suficiente para asegurar una identificación positiva en el caso de mezclas complejas, por tal motivo en esta investigación se utilizó el análisis cualitativo Índice de Kovats. El Índice de Kovats (IK) relaciona el tiempo de retención (T_r) de un compuesto desconocido con otro que contiene n -carbonos, el cual eluye antes y después que el. Los índices de retención de Kovats, se definen de tal modo de asignar un valor de 100 veces el número de carbonos de cada uno de los hidrocarburos lineales. En este sistema el hexano tiene un valor de 600 y el heptano de 700. De esta forma, cuando se cromatografía una serie homóloga de

n-hidrocarburos, las fuerzas intermoleculares son relativamente constantes y la separación está controlada fundamentalmente por las diferencias en la presión de vapor (relacionada con los puntos de ebullición). El cromatograma que se obtiene muestra una relación logarítmica entre el número de carbonos y los tiempos de retención, reflejando la tendencia en los puntos de ebullición entre los miembros de una serie homóloga (Marques y col., 2000).

En condiciones cromatográficas isotermas, los tiempos de retención crecen en forma logarítmica con el número de carbonos. Por esta razón, para mezclas con un rango amplio de puntos de ebullición, se prefiere trabajar en condiciones de temperatura programada. En estas condiciones, los tiempos de retención de una serie homóloga aumentan en forma lineal con el número de carbonos y la ecuación que los relaciona tiene la siguiente expresión:

$$IK = 100 A + 100 (B-A) \left[\frac{Tr (x) - Tr (A)}{Tr (B) - Tr (A)} \right]$$

Donde:

A = No. de carbonos antes del carbono de interés

B = No. de carbonos después del carbono de interés

x = Carbono de interés

Tr = Tiempo de retención

Análisis cuantitativo

Artículos publicados recientemente sobre cuantificación de hidrocarburos cuticulares en insectos, se han reportado el por ciento en área de cada hidrocarburo, logrando así una mejor comparación química entre las especies (Juárez y col., 2002).

La CG cuantitativa se basa en la comparación de la altura o el área del pico de un analito frente al de uno o más patrones. Si las condiciones se controlan de manera adecuada, ambos parámetros varían linealmente con la concentración. El área del pico es independiente de los efectos de ensanchamiento antes mencionados. Por tanto, desde este punto de vista el área es un parámetro analítico más satisfactorio que la altura del pico. Muchos instrumentos cromatográficos modernos están equipados con computadores que brindan medidas de áreas de pico relativas. Si no se cuenta con tales equipos, se requiere que la estimación sea manual. Un método sencillo que funciona satisfactoriamente con picos simétricos de altura razonable, consiste en multiplicar la altura del pico por la anchura de este, siendo divididos por la mitad de la altura del pico (Skoog, 2005).

$$\% \text{ Área} = \text{Área pico} / \text{Área total} \times 100$$



Figura 7. Foto del cromatógrafo de gases (VARIAN cp-3800).

Tomado de: Laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Manejo de Muestras en la Obtención del Extracto

La extracción de hidrocarburos de las alas del insecto, es un proceso sencillo donde se requiere tener una debida precaución, debido a la facilidad con la que se contaminan las muestras y lo sensible que son. Logrando manejar las muestras con cuidado, no se extrae la linfa del cuerpo, lo cual nos lleva a ocasionar errores en la determinación de la composición de los HC. Algunas investigaciones han reportado el uso del cuerpo del insecto, Sin embargo, se ha observado que al morir el insecto, el cuerpo se endurece y puede llegar a quebrarse fácilmente lo que ocasiona que se corra el riesgo de extraer hidrocarburos de la linfa, provocando errores en el cálculo de la concentración en el análisis (Chester y col., 1990). Se debe de tener un mayor cuidado respecto a la concentración de los hidrocarburos, debido a que es una cantidad muy pequeña de estos y se requiere la mayor cantidad posible para el análisis. Un factor importante para la cuantificación de los hidrocarburos cuticulares o cualquier elemento cuantificable en las alas o cutícula del insecto, es el peso, ya que con este dato podemos cuantificar por unidad de peso de organismos, obteniendo resultados más confiables.

Es importante mencionar que tanto el insecto como las alas, son guardados bajo condiciones ambientales y libres de impurezas para estudios próximos de morfología y morfometría.

Separación de los Hidrocarburos Cuticulares

La purificación de los hidrocarburos cuticulares de los componentes grasos de la muestra, se llevó a cabo en cromatografía en columna. Para una mejor separación cromatográfica de los hidrocarburos, se realizó una prueba, en la cual se eluye una mezcla de estándares de hidrocarburos, con el fin de identificar la mayor concentración de hidrocarburos presentes en un determinado volumen de elusión. Se preparó una mezcla con 3 mL de hexano y 2 mL de una combinación de hidrocarburos (C14, C15, C16), una vez empacada y activada la columna, se inyectaron los 5.0 mL de la mezcla, la cual fue eluida por gravedad con 2.0 mL de hexano. Por la parte inferior de la columna fue tomada la elusión de la muestra en viales, obteniendo fracciones de 0.5 mL, de las cuales se obtuvieron 5 fracciones en total (2.5 mL), para previamente inyectar 2 μ L de cada fracción en el CG, con el fin de determinar, a que volumen existe la mayor cantidad de hidrocarburos cuticulares en la elusión cromatográfica. Debido a que los hidrocarburos no presentan afinidad por la sílice no se adsorben y eluyen fácilmente, a diferencia de los compuestos grasos de la muestra, los cuales presentan un fuerte fenómeno de atracción por la sílice.

Los cromatogramas de las fracciones inyectadas, mostraron que la segunda fracción (1.0 mL) contiene la mayor cantidad de hidrocarburos presentes en la muestra con respecto a las demás fracciones (Fig. 8). Las siguientes fracciones fueron disminuyendo respecto a la concentración de hidrocarburos, pero siguiendo un orden gradual.

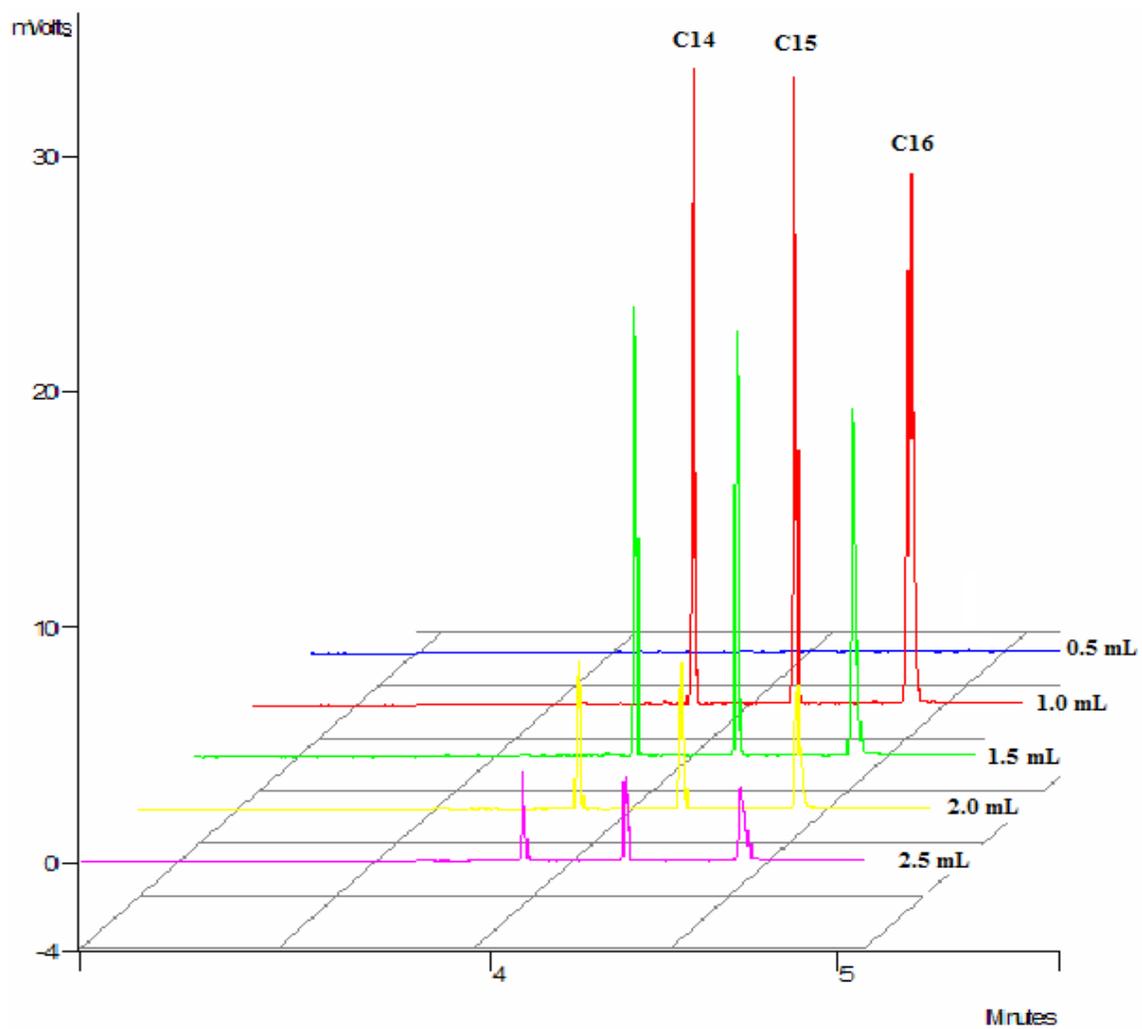


Figura 8. Cromatograma de las fracciones eluidas de hidrocarburos.

Identificación Cualitativa de Hidrocarburos Cuticulares

Para la identificación cualitativa de los hidrocarburos, es necesario tener previamente inyectados los estándares, para corroborar así su tiempo de retención y poder identificar a que hidrocarburo pertenece cada pico del cromatograma. En la Tabla 2 se muestran los tiempos de retención de cada uno de los estándares inyectados individualmente en el equipo de cromatografía de gases. Para los hidrocarburos ramificados es necesario utilizar el Índice de Kovats, ya que no se cuenta con los estándares necesarios.

En las Figuras 9 y 10 se muestra un Cromatograma característico de *Triatoma longipennis* macho y hembra. Bajo las condiciones de análisis utilizadas se puede observar una separación correcta de los picos en el Cromatograma. Los picos fueron identificados por los tiempos de retención correspondientes a los estándares certificados comerciales (Tabla 2) y por el resultado del cálculo del Índice de Kovats. Se puede observar que los picos mayoritarios correspondieron a hidrocarburos lineales, siendo predominantes los HC23, HC25, HC27, HC29, HC31 y HC33, también se observa que se encuentran dentro de los lineales HC24, HC26, HC28, HC30, HC32, HC37, HC38, HC39 pero en menor intensidad. Los picos con menor intensidad de áreas fueron identificados como ramificados con la ayuda cualitativa del Índice de Kovats, siendo hidrocarburos ramificados desde 24 carbonos hasta 39 carbonos.

Tabla 2. Tiempo de retención de los estándares en el Cromatograma inyectados individualmente.

<i>Estándar</i>	<i>Nombre</i>	<i>Tiempo de retención</i>
C19	Nonadecano	6.31 min.
C20	Eicosano	7.18 min.
C21	Heneicosano	8.23 min.
C22	Docosano	9.51 min.
C23	Tricosano	10.99 min.
C24	Tetracosano	12.67 min.
C25	Pentacosano	14.49 min.
C26	Hexacosano	16.44 min.
C27	Heptacosano	18.40 min.
C28	Octacosano	20.45 min.
C29	Nonacosano	22.40 min.
C30	Triacotano	24.46 min.
C31	Heneitriacotano	26.40 min.
C32	Dotriacotano	28.33 min.
C33	Tritriacotano	30.20 min.
C36	Hexatriacotano	35.71 min.
C38	Octatriacotano	38.65 min.
C40	Tetracontano	42.17 min.

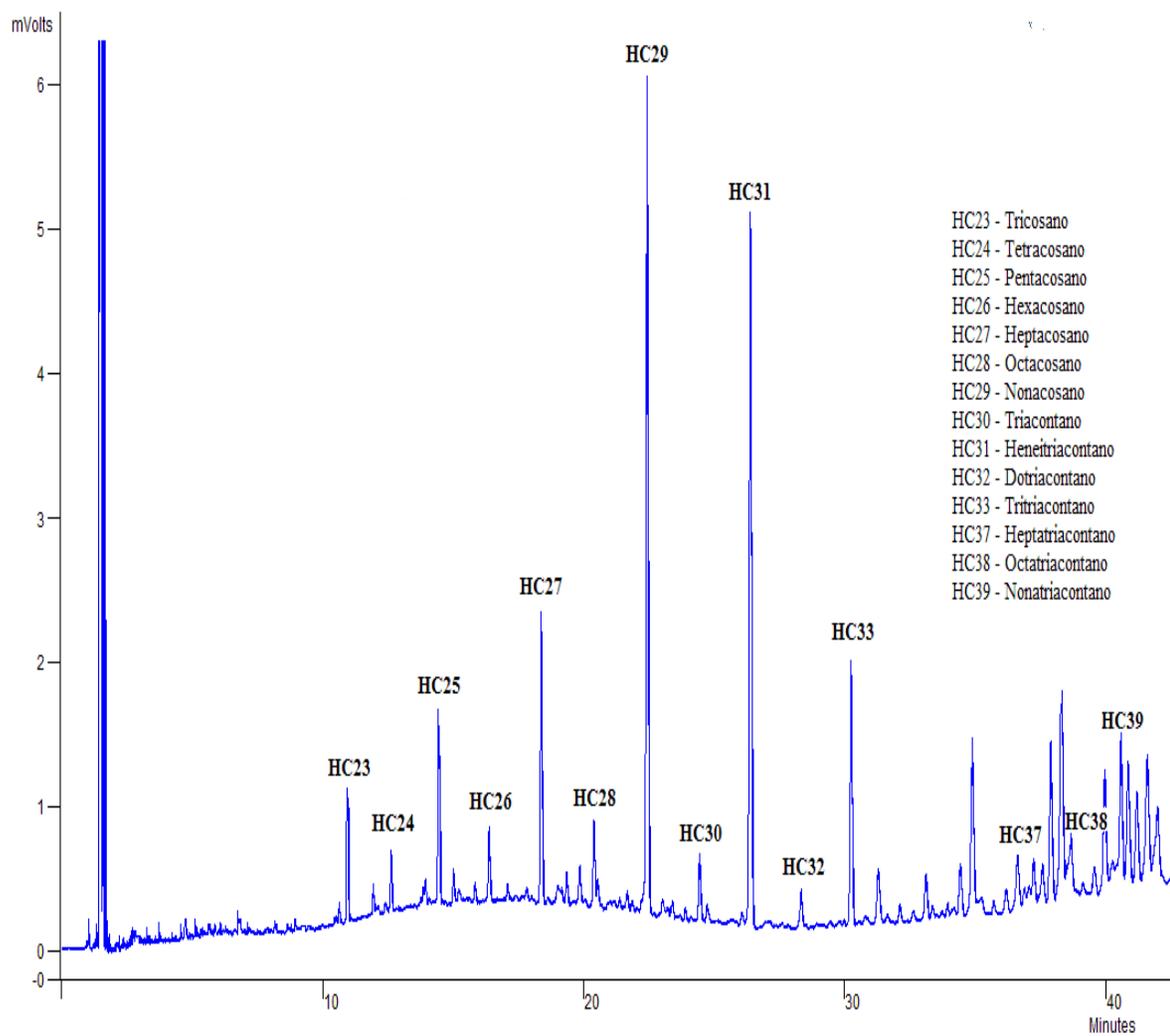


Figura 9. Cromatograma característico de *T. longipennis* macho.

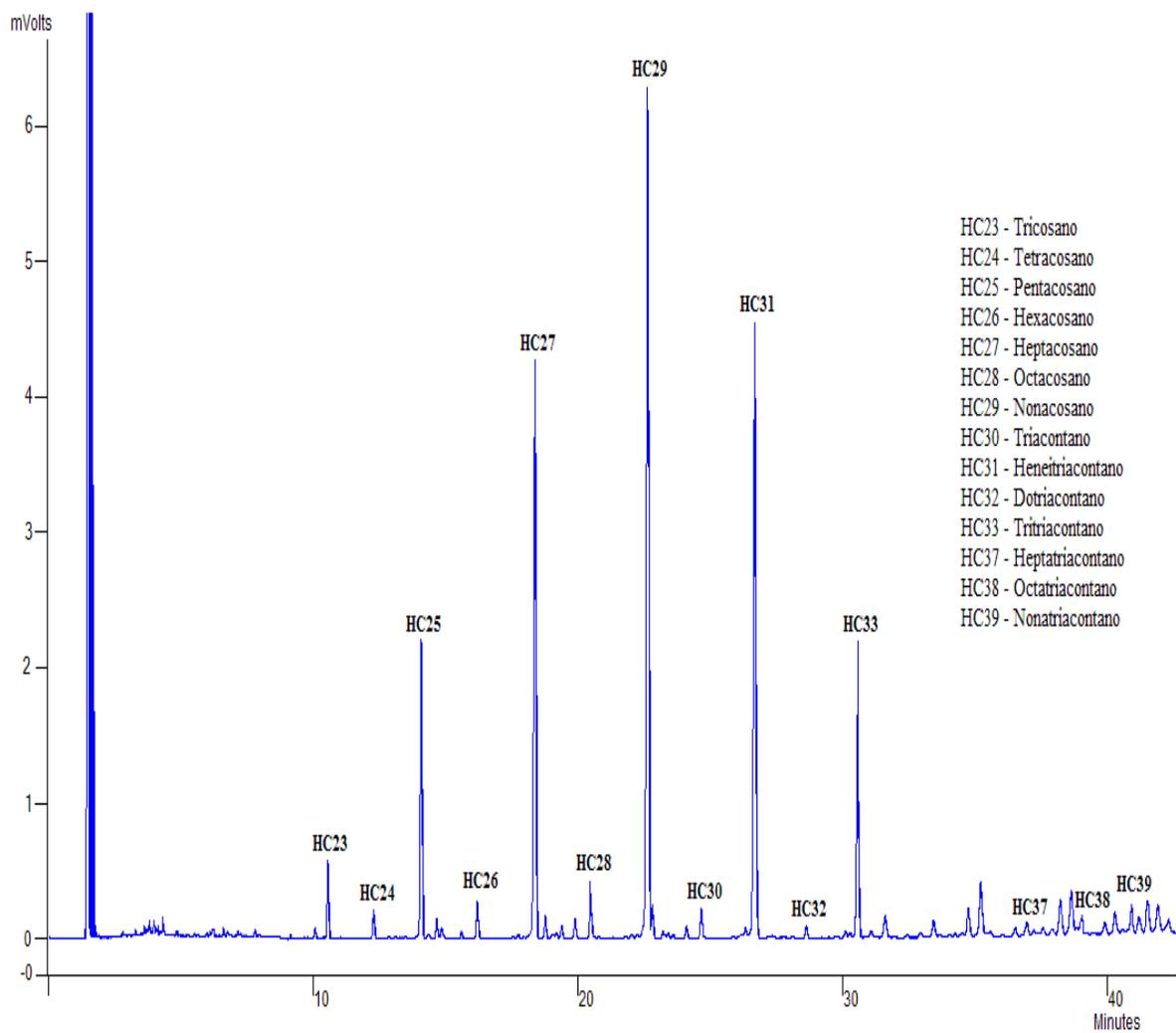


Figura 10. Cromatograma característico de *T. longipennis* hembra.

Identificación Cuantitativa de Hidrocarburos Cuticulares

En la Tablas 3 y 4 se presentan los datos característicos de *Triatoma longipennis* macho y hembra obtenidos de la alas, mostrando el nombre de los hidrocarburos tanto lineales como ramificados que se identificaron, el tiempo de retención, el por ciento del área total para cada hidrocarburo presente en la muestra y el Índice de Kovats. Los hidrocarburos ramificados fueron identificados utilizando los valores correspondientes del Índice de Kovats al no contar con sus respectivos estándares. Trabajos anteriores han reportado esta metodología en la identificación de este tipo de hidrocarburos (Juárez y col., 2002). Se encontraron los mismos hidrocarburos cuticulares en machos y hembras, sin embargo las áreas de los picos correspondientes fueron distintas.

En la especie de *Triatoma longipennis* machos se identificaron 40 HC de los cuales 14 HC (57.93%) pertenecieron a hidrocarburos lineales y 26 HC (42.07%) pertenecieron a hidrocarburos ramificados. En hembras se encontraron 38 HC de los cuales 14 HC (61.93%) correspondieron a hidrocarburos lineales y 24 HC (38.07%) correspondieron a hidrocarburos ramificados. Los hidrocarburos cuticulares lineales van desde el tricosano (HC23) hasta el nonatriacontano (HC39), contando con la inexistencia de algunos (HC34, HC35, HC36), en hembra y macho se encontraron los mismos HC lineales. Los HC ramificados que se identificaron cualitativamente, fueron nombrados debido, a la comparación de los IK obtenidos en esta investigación, en relación al IK de otras especies de *Triatomas*, los cuales fueron publicados por Juárez y colaboradores en el año 2002, obteniendo una gran similitud en los resultados.

Tabla 3. Identificación de hidrocarburos presentes en alas primarias y secundarias de *Triatoma longipennis* macho.

Pico	Hidrocarburo	Nombre	T.R.	% Área	I.K.
1	C23	n- C23	10.951	2.437	2300
2	C24	n- C24	12.633	0.575	2400
3	r24	Desconocido	13.841	0.188	2467
4	r24	Desconocido	13.930	0.238	2472
5	C25	n- C25	14.450	4.048	2500
6	r25	Monómero C25	15.015	1.826	2529
7	C26	n- C26	16.376	0.833	2600
8	C27	n- C27	18.368	5.745	2700
9	r27	5-me C27	19.324	0.603	2748
10	r27	x,x-dime C27	19.791	0.648	2771
11	C28	n- C28	20.387	1.106	2800
12	C29	n- C29	22.414	17.045	2900
13	r29	Monómero C29	22.963	0.131	2929
14	C30	n- C30	24.422	0.913	3000
15	C31	n- C31	26.407	14.021	3100
16	C32	n- C32	28.345	0.503	3200
17	C33	n- C33	30.254	4.228	3300
18	r33	5-me C33	31.297	1.320	3362
19	r34	x,x-dime C34	33.111	1.176	3470
20	r34	4,4-dime + x,x,x-trime C34	33.329	0.214	3484
21	r35	5-me C35	34.420	1.138	3548
22	r35	3-me + x,x-dime C35	34.883	3.528	3575
23	r36	x-me C36	36.164	0.529	3652
24	r36	x,x,x-trime C36	36.612	1.223	3678
25	r36	Desconocido	36.852	0.386	3693
26	C37	n- C37	37.030	0.520	3700
27	r37	Desconocido	37.230	0.975	3715
28	r37	Monómero C37	37.563	1.022	3735
29	r37	5-me C37	37.885	3.249	3754
30	r37	x,x-dime C37	38.294	5.877	3778
31	C38	n- C38	38.650	2.247	3800
32	r38	Monómero C38	39.097	1.132	3824
33	r38	5-me C38	39.538	0.924	3846
34	r38	3-me + x,x-dime C38	39.946	2.904	3867
35	r38	x,x,x-trime C38	40.219	1.063	3882
36	C39	n- C39	40.576	3.708	3900
37	r39	Desconocido	40.843	2.972	3917
38	r39	Monómero C39	41.179	2.516	3938
39	r39	5-me C39	41.569	3.620	3962
40	r39	x,x-dime + x,x,x-trime C39	41.945	2.667	3987

r = ramificado.

T.R. = tiempo de retención.

I.K. = Índice de Kovats.

Tabla 4. Identificación de hidrocarburos presentes en alas primarias y secundarias de *Triatoma longipennis* hembra.

Pico	Hidrocarburo	Nombre	T.R.	% Área	I.K.
1	C23	n- C23	10.969	1.119	2300
2	C24	n- C24	12.614	0.441	2400
3	r24	ND	ND	ND	ND
4	r24	ND	ND	ND	ND
5	C25	n- C25	14.474	6.569	2500
6	r25	Monómero C25	15.032	1.476	2529
7	C26	n- C26	16.401	1.098	2600
8	C27	n- C27	18.397	11.974	2700
9	r27	5-me C27	19.352	0.500	2748
10	r27	x,x-dime C27	19.844	1.785	2772
11	C28	n- C28	20.413	1.248	2800
12	C29	n- C29	22.444	15.557	2900
13	r29	Monómero C29	23.012	0.339	2929
14	C30	n- C30	24.449	0.829	3000
15	C31	n- C31	26.436	13.386	3100
16	C32	n- C32	28.373	0.489	3200
17	C33	n- C33	30.284	5.829	3300
18	r33	5-me C33	31.327	0.909	3362
19	r34	x,x-dime C34	33.149	0.919	3470
20	r34	4,4-dime + x,x,x-trime C34	33.329	0.508	3484
21	r35	5-me C35	34.448	1.449	3547
22	r35	3-me + x,x-dime C35	34.911	4.430	3575
23	r36	x-me C36	36.211	0.386	3652
24	r36	x,x,x-trime C36	36.650	1.009	3678
25	r36	Desconocido	36.888	0.236	3694
26	C37	n- C37	37.067	0.290	3700
27	r37	Desconocido	37.247	0.576	3715
28	r37	Monómero C37	37.490	0.519	3728
29	r37	5-me C37	37.922	2.837	3755
30	r37	x,x-dime C37	38.323	4.789	3778
31	C38	n- C38	38.667	1.466	3800
32	r38	Monómero C38	39.131	0.223	3824
33	r38	5-me C38	39.592	0.893	3847
34	r38	3-me + x,x-dime C38	39.981	2.018	3868
35	r38	x,x,x-trime C38	40.246	0.568	3882
36	C39	n- C39	40.594	1.634	3900
37	r39	Desconocido	40.886	1.371	3918
38	r39	Monómero C39	41.206	3.639	3938
39	r39	5-me C39	41.609	4.770	3964
40	r39	x,x-dime + x,x,x-trime C39	41.963	1.921	3986

r = ramificado

T.R. = tiempo de retención

I.K. = Índice de Kovats.

ND = no detectado.

Composición de Hidrocarburos Cuticulares

Para el análisis de cromatografía de gases se utilizó el método de cuantificación por ciento en área, debido a que este es el método establecido para una mejor comparación de la composición de hidrocarburos cuticulares entre los insectos. La Tabla 2 muestra los tiempos de retención de los estándares inyectados individualmente, los cuales sirvieron para la determinación de la composición de hidrocarburos en las muestras. En la especie *Triatoma longipennis* los hidrocarburos con mayor concentración correspondieron a los lineales, predominando los HC23 (1.78%), HC25 (5.31%), HC27 (8.86%), HC29 (16.30%), HC31 (13.70%), HC33 (5.03%), de los cuales el de menor concentración fue el HC23 y teniendo como al de mayor concentración al HC29, siendo este el predominante de esta especie. Los hidrocarburos ramificados en base a los lineales, siempre se encontraron en menor concentración, pero no necesariamente todos estuvieron en menor cantidad con respecto a algunos lineales, siendo el hidrocarburo HCr37 (IK: 3778) el de mayor concentración con un 5.33 % dentro de los ramificados.

En investigaciones recientes, se han reportado en otras especies de *Triatomas*, hidrocarburos lineales mayoritarios diferentes o iguales a *Triatoma longipennis*, como son: *Triatoma pallidipennis* HC31, *Triatoma mazzottii* HC27 (Gálvez, 2002), *Triatoma dimidiata* HC31, *Triatoma barberi* HC29 (Juárez y col., 2002), *Triatoma rubida* HC27 (Paredes, 2008), siendo comúnmente los hidrocarburos cuticulares impares los de mayor concentración.

Comparación de Hidrocarburos Entre los Géneros

Los hidrocarburos cuticulares encontrados en machos fueron los mismos encontrados en hembras, excepto por dos hidrocarburos ramificados (IK: 2467, 2472) los cuales no se encontraron en hembras. Los hidrocarburos lineales predominantes fueron los mismos (HC 23, HC 25, HC 27, HC 29, HC 31, HC 33), siendo esta la huella digital característica de *Triatoma longipennis*. Se encontró una diferencia notable de porcentajes entre géneros en el HC 27, el cual en machos se encuentra en un 5.745 % y en hembras en un 11.974 %, en las hembras representándose en el Cromatograma una perfecta campana de Gauss de los hidrocarburos lineales característicos, mientras que en los machos se forma una incompleta campana de Gauss (Fig. 11). En ambos géneros el hidrocarburo mayoritario ramificado fue un HC de una cadena de 37 carbonos con un IK de 3778.

En la especie *Triatoma longipennis*, los géneros no difieren en la huella digital característica, sin embargo existe un perfil característico para hembra y macho, siguiendo un patrón de abundancia en el HC29 y una diferencia notable en el HC27 entre géneros, permitiendo esto un perfil característico entre géneros.

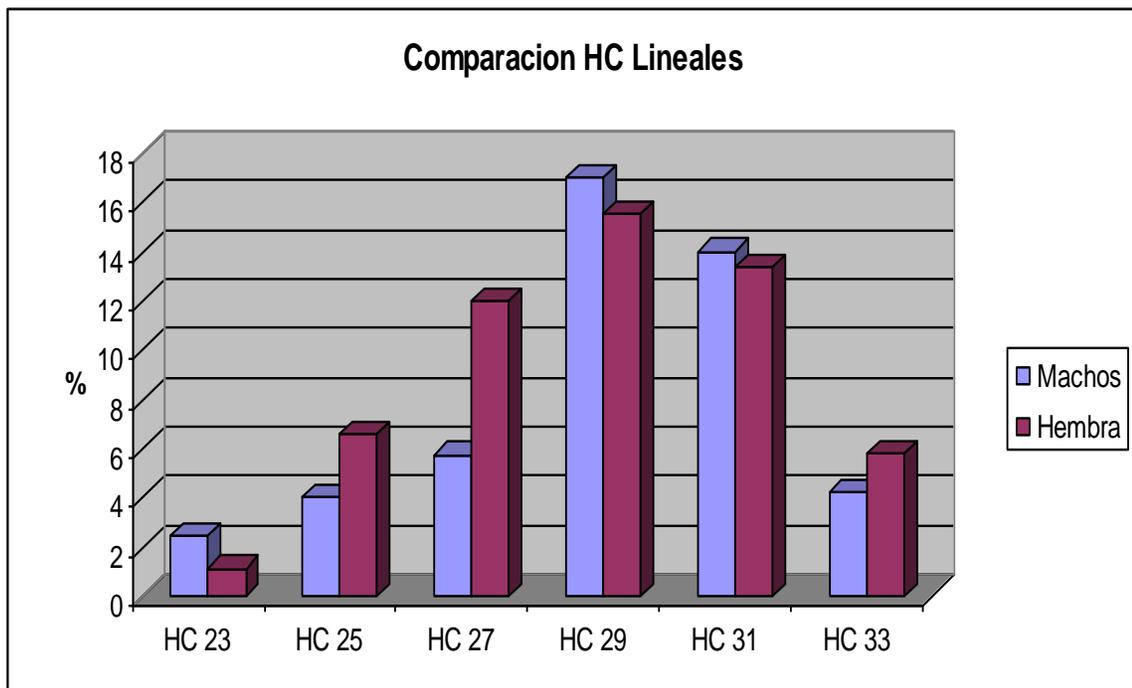


Figura 11. Gráfica de comparación de HC lineales predominantes entre géneros.

Tabla 5. Composición de HC y desviación estándar en alas primarias y secundarias de *Triatoma longipennis*.

HIDROCARBURO	IK	MACHO		HEMBRA	
		%	S.E.	%	S.E.
n- C23	2300	2.4	0.2	1.1	0.4
n- C24	2400	0.6	0.2	0.4	0.4
Desconocido	2467	0.2	0.1	-	-
Desconocido	2472	0.2	0.1	-	-
n- C25	2500	4	0.4	6.6	0.4
Monómero C25	2529	1.8	0.2	1.5	0.1
n- C26	2600	0.8	0.3	1.1	0.2
n- C27	2700	5.7	0.4	12	0.4
5-me C27	2748	0.6	0.4	0.5	0.3
x,x-dime C27	2771	0.6	0.5	1.8	0.6
n- C28	2800	1.1	0.4	1.2	0.4
n- C29	2900	17	0.6	15.6	0.5
Monómero C29	2929	0.1	0.1	0.3	0.3
n- C30	3000	0.9	0.2	0.8	0.2
n- C31	3100	14	0.6	13.4	0.5
n- C32	3200	0.5	0.2	0.5	0.2
n- C33	3300	4.2	0.3	5.8	0.2
5-me C33	3362	1.3	0.1	0.9	0.2
x,x-dime C34	3470	1.2	0.2	0.9	0.3
4,4-dime + x,x,x-trime C34	3484	0.2	0.1	0.5	0.2
5-me C35	3548	1.1	0.3	1.4	0.4
3-me + x,x-dime C35	3575	3.5	0.4	4.4	0.5
x-me C36	3652	0.5	0.3	0.4	0.2
x,x,x-trime C36	3678	1.2	0.5	1	0.4
Desconocido	3693	0.4	0.1	0.2	0.1
n- C37	3700	0.5	0.2	0.3	0.1
Desconocido	3715	1	0.4	0.6	0.2
Monómero C37	3735	1	0.4	0.5	0.3
5-me C37	3754	3.2	0.2	2.8	0.4
x,x-dime C37	3778	5.9	0.4	4.8	0.4
n- C38	3800	2.2	0.6	1.5	0.4
Monómero C38	3824	1.1	0.2	0.2	0.1
5-me 38	3846	0.9	0.4	0.9	0.4
3-me + x,x-dime C38	3867	2.9	0.2	2	0.1
x,x,x-trime C38	3882	1.1	0.2	0.6	0.2
n- C39	3900	3.7	0.4	1.6	0.3
Desconocido	3917	3	0.4	1.4	0.2
Monómero C39	3938	2.5	0.3	3.6	0.2
5-me C39	3962	3.6	0.1	4.8	0.1
x,x-dime + x,x,x-trime C39	3987	2.7	0.1	1.9	0.1

CONCLUSIONES

Extraer y cuantificar la composición de hidrocarburos cuticulares en *Triatoma longipennis*, es una técnica cualitativa y cuantitativa que nos permite poder identificar la composición de HC de este importante vector de la enfermedad de Chagas, logrando manejar técnicas de instrumental avanzado para una mejor comparación del insecto entre especies y géneros por medio de la quimiotaxonomía, con el fin de evitar una posible proliferación de la enfermedad en nuestra región.

Para lograr obtener las condiciones sobre el manejo de muestras en la obtención del extracto crudo, se debe tener en cuenta el mínimo manejo de la muestra, con el fin de evitar el mayor error posible y una posible contaminación. El utilizar las alas del insecto y no el cuerpo, es una técnica que nos brinda seguridad de extraer hidrocarburos de la cutícula y no de la linfa.

La separación de los hidrocarburos cuticulares por cromatografía de adsorción en columna, es sumamente práctica, ya que para empacar y eluir la columna solo se utiliza un solvente (hexano), debido a que la sílice que se utilizó, no presenta afinidad hacia los hidrocarburos y sí hacia los componentes grasos, obteniendo así una cromatografía negativa, logrando así una rápida purificación y fraccionamiento de la muestra, con respecto a las cromatografías normales en columna. La sílice se puede reutilizar para 2 purificaciones más sin necesidad de cambio.

El identificar cualitativamente los hidrocarburos cuticulares por el método Índice de Kovats, es muy efectivo, debido al no contar con algunos estándares tenemos la seguridad de identificar correctamente cualquier hidrocarburo, especialmente en el caso de los ramificados, ya que no son común estos estándares. El análisis cualitativo IK permitió identificar hasta 35 HC en la investigación. Este método permite comparar los IK de los hidrocarburos en diferentes especies, por lo que es un método cualitativo universal.

La cuantificación de la composición de hidrocarburos en la especie *T. longipennis*, nos permite poder comparar entre los hidrocarburos del mismo o diferente género, es una técnica sencilla que utiliza el área de los picos del Cromatograma para poder representarlos en por ciento, algunos aparatos cromatográficos avanzados lo poseen. Esto nos ayuda a poder comparar diferentes especies de *Triatomas* y definir un perfil característico de hidrocarburos para cada especie.

La composición de hidrocarburos cuticulares entre machos y hembras es muy parecida, salvo por 2 hidrocarburos ramificados que no se encuentran en la hembra, la variación notoria entre géneros es debido al HC27, el cual se encuentra en menor cantidad en el macho, y esto permite que en la hembra se muestre un cromatograma característico de una perfecta campana de Gauss, formada por los hidrocarburos lineales característicos.

RECOMENDACIONES

Realizar un estudio de identificación sobre los componentes lipídicos que conforman las cutículas de los insectos, ya que junto con los hidrocarburos tienen la función de proteger al insecto.

Se recomienda considerar los estudios morfométricos a las alas para una mejor comparación entre las especies.

Estudiar la posibilidad de rehusar mayor número de veces el adsorbente, con el fin de manejar una cantidad mayor de muestras a las utilizadas en la investigación.

BIBLIOGRAFIA

- Bastien W.J. 1998. The Kiss of Death. Chagas Disease in the Americas. The University of Utah Press. Salt Lake City. vol 58 num 17. pp. 65-78.
- Brown, Harold W., y Franklin A. Neva, 1995. Enfermedad de Chagas. Parasitología Clínica. 5a edición Nueva Editorial Interamericana. México. pp. 574-595.
- Cevallos Ana María, Hernández Roberto. 2004. *Trypanosoma cruzi* y la Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). Departamento Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 102-127.
- Chagas Carlos Filho. 1993. Carlos Chagas. Rio de Janeiro. Casa de Oswaldo Cruz, Fundacion Oswaldo Cruz. vol 1 num 2. pp. 104-107.
- Chester Beaver Paul, Clifton Rodney, Eddie Cupp. 1990. Enfermedad de Chagas. Parasitología Clínica. 2a edición Salvat Editors. México. pp. 235-260.
- Dhabi A., Cerda X., Hefetz A. 1996. Social Closure, Agressive Behaviour and Cutucular Hydrocarbon Profiles in the Polydomus ant *Cataglyphis iberica*. Chem. Ecol. vol 22. pp. 2173-2186.
- Gálvez Cruz José Antonio. 2002. Identificación Química de Hidrocarburos Cuticulares en Triatomineos Para Fines Quimiotaxonomicos. Instituto Tecnológico de Tapachula. Chiapas. Tesis de Licenciatura. pp. 10-30.
- Goldsmith Robert, Heyneman Donald. 1995. Mal de Chagas. Parasitología y Medicina Tropical. 2ª edición El Manual Moderno. México. pp. 315-345.
- Howard R. W. 1993. Cuticular Hydrocarbons and Chemical Communication. In Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology. University of Nebraska Press. pp. 179.
- Hulsebos L. H. 1989. "The Effect of Interleukin-2 on Parasitemia and Myocarditis in Experimental Chagas' Disease". *Journal of Protozoology*. vol 36 num 6. pp 293-298.
- Imbert Palafox José Luís, Figueroa Gutierrez Ana Hilda, Gómez Gómez Juan Vicente. 2004. Tripanosomiasis Americana o Mal de Chagas Otra Enfermedad de la Pobreza. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Elementos: Ciencia y Cultura vol. 10, num 049. pp 13-21.

- IPCA. 2000. La Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centroamérica para la Interrupción de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas. pp. 218-239.
- Joseph Nathan Pedro. 1975. Cromatografía de Gases. Separaciones Cromatográficas. 1a edición EDICOL S.A. Impreso en México. pp. 48-66.
- Juárez M. P., Fernandez G. Cuticular Hydrocarbons of Triatomines. 2007. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de la Plata, Facultad de Ciencias Médicas. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 147. pp. 711-730.
- Juárez P., Blomquist G. J. 1993. Cuticular Hydrocarbons of *Triatoma mazzoti*. Comparative Biochemistry and Physiology Vol. 106. pp. 667-674.
- Juarez P., Blomquist G. J., Shofield. 2001. Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B 129. pp. 233-239.
- Juárez Patricia, David A. Carlson, Paz Maria Salazar Schettino, Sergio Mijailovsky, Gloria Rojas. 2002. Cuticular Hydrocarbons of Chagas Disease Vector in México. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Argentina. Vol. 97 num 6. pp. 819-827.
- Licon Trillo Angel. 2002. Infección de *Triatoma recurva* por *Trypanosoma cruzi* en un Campamento Minero de Urique, Chihuahua (México). Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México. Tesis de Licenciatura. pp. 65-92.
- López Cárdenas Jorge, Gonzáles Bravo Francisco, Salazar Shettino paz. 2002. Distribución Espacial de Vectores de la Enfermedad de Chagas en el estado de Guanajuato. Universidad de Guanajuato. vol 2 num 003. pp 64-69.
- Magallon Gastelum Ezequiel, Lozano kasten Felipe, Soto Gutiérrez Margarita, Flores Pérez Angélica. 2006. Epidemiological Risk for *Trypanosoma cruzi* Transmission by Species of *Phyllosoma Complex* in the Occidental Part of Mexico. Universidad Nacional Autónoma de México. Acta Tropica 97. pp 331-338.
- Maldonado Rodríguez Arcadio. 2002. Identificación Molecular de *Trypanosoma cruzi* en Triatominos de Tres Ecotopos del Estado de Colima. Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Colima. vol 3. pp. 45-60.
- Marques F. de A., McElfresh, J. S. & Millar, J. G. 2000. Kovats Retention Indexes of Monounsaturated C12, C14 and C16 Alcohols, Acetates and Aldehydes Commonly Found in Lepidopteran Pheromone Blends. J. Braz. Chem. Soc. vol 11. pp. 59-99.

- Morrison Robert Thornton, Boyd Robert Neilson. 1998. Metano, Energía de Activación. Química Orgánica. Quinta edición. Impreso en México. pp. 39-72.
- Mújica Luis. 1998. Trabajo de revisión, enfermedad de Chagas", rev UNNE, vol 2, num 001. pp 23-37.
- Nation, J. L. 2002. Insect Physiology and Biochemistry. CRP press, Boca Raton. pp. 485-496
- Nelson D.R. 1969. Hydrocarbon Synthesis in the American Cockroach. Nature. vol 22 num 23. pp. 854-855.
- Nordlund D. A., Lewis W. J., 1976. Terminology of Chemical releasing Stimuli in Transpecific and Interspecific Interactions. Chem. Ecol. vol 14. pp. 220-223.
- Nóvoa, S., Martínez D., Ojea J., Rodríguez J. L. 2002. Composición en Acidos Grasos de Larvas D de Almeja Fina (*ruditapes decussatus*), Obtenidas a partir de Progenitores Acondicionados en Distintos Regímenes de Temperatura y Progenitores del Medio Natural. Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo de Bioquímica y Biología Molecular. España. vol 26 numero 35. pp. 87-114.
- Paredes González Edgar A., 2008. Comparación del Perfil de Hidrocarburos Cuticulares de Tres Poblaciones de *Triatoma rubida*: Domestica, Peridomestica y Silvestre. Insecto Transmisor de la Enfermedad de Chagas en Sonora. Universidad de Sonora. Tesis de Postgrado. pp. 50-69.
- Rojas Julio, Valle Mora Javier, Virgen Armando, Brindis Yolanda, Cruz López Leopoldo. 2004. Variación Espacial y Temporal del Perfil de Hidrocarburos Cuticulares de Colonias de *Solenopsis geminata*. Folia Entomología Mexicana vol. 43, num 003. pp 271-278.
- Romero Carlos R., Nelly L. Jorge y Gómez Manuel E. 1990. Caracterización de la Especie *Ilex Paraguariensis* Mediante Análisis por Cromatografía Gaseosa de sus Componentes Volátiles. Universidad Nacional de Argentina, Área de Química-Física. Tesis de Postgrado. pp. 58-89.
- Schofield C. J. 1985. Control of Chagas Disease Vector. British Med. Bull. 41. pp. 187-194.
- Skoog Douglas A. 2005. Aplicaciones de la cromatografía gas-liquido. Fundamentos de química analítica. ed Thomson Learning Ibero. pp. 979.
- Skoog Douglas A., Leary James J. 1991. Análisis Instrumental. 4a edición Mac GRAW-HILL. Impreso en México. pp. 115-130.

- Tejeda A., Montesinos R. M., Guzmán R. 1995. Bioseparaciones. Editorial UNISON. Impreso en México. pp. 56-90.
- Vidal Acosta Vianey, Ibáñez Bernal Sergio, Martínez Campos Carmen. 2002. Infección Natural de Chinchas Triatominae con *Trypanosoma cruzi* Asociadas a la Vivienda Humana en México. Instituto Nacional de Salud Pública. Vol. 42 numero 6. pp 496-503.
- Wendel S., Brener Z. Camargo. 1992. et al. Chagas Disease (American Tripanosomiasis): Its Impacto in Transfusión and Clinical Medicine. ISBT BRAZIL92, SAO PAULO, BRAZIL. pp. 210-246.
- Zalocchi E., A. Pomilio, R. Palacios. 1990. Botánica Sociedad Argentina. Bot. 26 num 35. pp.163-172.
- Zarate L. G. 1985. A Checklist of the Triatominae (*Hemiptera:Reduviidae*) of Mexico. Int. J. Entomol. vol. 27 num 2. pp. 146-168.