

IDENTIFICACIÓN DE VOLÁTILES DEL TLACUACHE *Didelphis marsupialis* COMO ATRAYENTE DE *Triatoma dimidiata* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)

Álvaro J. Campuzano-Granados✉ y Edi A. Malo

Grupo de Ecología de Artrópodos y Manejo de Plagas, Departamento de Agricultura, Sociedad y Ambiente, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR); Carretera antigua aeropuerto Km 2.5, CP 30700; Tapachula, Chiapas, México.

✉ Autor de correspondencia: campuzano1604@hotmail.com

RESUMEN. El objetivo del presente trabajo fue identificar los compuestos liberados por el tlacuache, *Didelphis marsupialis* como atrayente de *Triatoma dimidiata*. Por medio de bioensayos realizados en un olfatómetro de vidrio tipo “Y”, se determinó que los volátiles presentes en hembras de tlacuache atrajeron de forma significativa a ninfas de 5to estadio de *T. dimidiata*; por el contrario, los volátiles de machos no atrajeron a las ninfas. Se identificaron los compuestos volátiles mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM), encontrando la presencia de hidrocarburos, ácidos carboxílico, alcoholes, ésteres y aldehídos. En volátiles de hembras se encontró la presencia de nonanal, cariofileno, curcumeno y de ácido oleico entre otros compuestos que no están presentes en volátiles de machos. Además, se evaluaron de manera individual (p-cresol, nonanal y ácido oleico), y se determinó que las ninfas fueron atraídas solo por el nonanal. Por lo que con este resultados se puede afirmar que este compuesto puede ser un buen candidato a ser evaluado en campo como atrayente de *T. dimidiata*.

Palabras clave: Triatomines, enfermedad de Chagas, *Didelphis marsupialis*, bioensayos, compuestos volátiles

Volatiles of tlacuache *Didelphis marsupialis* as attractant of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae)

ABSTRACT. The objective of this work was to identify the compounds released by the opossum, *Didelphis marsupialis* as attractant of *Triatoma dimidiata*. *T. dimidiata* nymphs of 5th were significantly attracted by volatiles released by opossum females in bioassays performance in a “Y” glass-tube olfactometer, on the contrary, volatile released by males opossum did not attract the nymphs. They were identified the volatile compounds by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS), finding the presence of hydrocarbons, carboxylic acids, alcohols, esters and aldehydes. In volatile females the presence of nonanal, caryophyllene, curcumene and oleic acid was found among other compounds that are not present in volatile males. In addition, we tested individually (p-cresol, nonanal and oleic acid), and we found that the nymphs were attracted only by nonanal. Results from this work, suggest that nonanal is a good candidate to be evaluated in the field as an attractant of *T. dimidiata*.

Key words: Triatomines, Chagas disease, *Didelphis marsupialis*, bioassays, volatile compounds.

INTRODUCCIÓN

Triatoma dimidiata es uno de los vectores más importantes que transmite la enfermedad de Chagas en México, Centroamérica y en algunos países de Sudamérica como Ecuador y Venezuela (OPS, 2002), esta enfermedad puede afectar diversos órganos y llegar a ser mortal. Se distribuye ampliamente en el centro y sur de México (Schofield, 1999). *T. dimidiata* suele estar presente tanto en el ambiente silvestre como en las casas-habitación en donde pueden entrar en contacto con el humano, ya que estas chinches son de hábitos nocturnos y se alimentan principalmente de la sangre de algunos mamíferos, incluido el hombre (Hoare, 1972). En el ambiente silvestre, las chinches viven en las cuevas, troncos o entre las rocas permitiéndoles entrar en contacto con sus reservorios, entre ellos se encuentran: el armadillo (*Dasyus novemcinctus*, L.), tlacuache (*Didelphis*

marsupialis, L.), tejón (*Taxidea taxus*, S.), perro (*Canis lupus familiaris*, L.), rata (*Rattus rattus*, L.), zorrillo (*Mephitidae*, B.), conejo (*Oryctolagus cuniculus*, L.), murciélago (*Eptesicus furinalis*, G.) y algunas aves (Yeo *et al.*, 2005). Por lo que existe la posibilidad que los volátiles de algunos reservorios puedan atraer a *T. dimidiata*. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar los compuestos volátiles liberados por el tlacuache (*D. marsupialis*) y evaluados como atrayente de *T. dimidiata*.

MATERIALES Y MÉTODO

Se capturaron seis ejemplares adultos de tlacuache (tres machos y tres hembras) en condiciones saludables perteneciente a la especie *D. marsupialis*. Las capturas se llevaron a cabo durante la noche debido al hábito nocturno de la especie mediante el uso de las trampas Sherman, en los alrededores de la ciudad de Tapachula, Chiapas. Una vez colectados se mantuvieron en una jaula metálica de 50x50 cm y se le proporciono alimento (atún, sardina o frutas) y agua, durante todo el periodo de investigación. Una vez concluido el tiempo de estudio (una a dos semanas), se liberaron dentro del habitat donde se capturaron previamente.

Las colectas de volátiles se realizaron a una temperatura de 25 ± 1 °C por aeración dinámica abierta (“headspace”). El sistema de extracción consistió en la captura de los volátiles por medio de un adsorbente y la desadsorción de los compuestos por un disolvente (diclorometano). Primero se preparó la muestra (tlacuache) aislándolo en un recipiente de vidrio de 30 x 60 cm con sus juntas esmeriladas, con tres orificios en la tapa, posteriormente se le hizo pasar un flujo de aire previamente filtrado con carbón activado de 3 L/min y dos salidas de extracción de 0.5 L/min, cada una conectada a las trampas colectoras de vidrio rellenas del adsorbente (super Q). La colecta de volátiles se realizó durante 14 horas. Una vez concluido el tiempo de colecta, se extrajeron los volátiles con 400 µL de diclorometano y se concentró a un volumen de 50 µL usando un flujo de nitrógeno. Debido a que el tlacuache liberó pocas cantidades de volátiles, la colecta se repitió cinco veces por cada hospedero (tres hembras y tres machos) y los extractos se combinaron (de cada cinco colectas), teniendo en total tres extractos de hembras y tres de machos. De manera simultánea a cada colecta de volátiles, se corrió un control que consistió en repetir el proceso, haciendo pasar el flujo de aire a través de la cámara vacía.

Los triatominos fueron criados y proporcionados por el laboratorio de cría del Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública (CRISP-INSP) ubicado en la ciudad de Tapachula, Chiapas, México. Las condiciones del medio de las crías fueron de 27 ± 1 °C, con $70 \pm 5\%$ de humedad relativa y un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad. Estos pertenecieron al tipo HG3 costa de 5to estadio. Los triatominos fueron alimentados 30 días antes de los bioensayos con sangre de conejo, con la finalidad de tenerlos activos para obtener una mejor respuesta en la percepción del extracto empleado en los bioensayos, posteriormente se trasladaron al insectario del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR).

La respuesta de *T. dimidiata* a los volátiles obtenidos y compuestos sintéticos comercialmente disponibles, fueron evaluadas en un olfatómetro de vidrio tipo “Y” (la base del tubo “Y” y los dos brazos miden 12 cm de largo por 2 cm de diámetro interno). La muestra y el control se colocaron en los brazos de la Y, haciendo pasar en ambos brazos una corriente de aire purificado (pasándolo previamente a través de un filtro de carbón activado). El flujo de aire empleado fue de 0.5 L/min y fue regulado mediante un flujómetro. Los bioensayos, consistieron en colocar en una de las cámaras de los extremos del olfatómetro 1 µL del extracto o del compuesto sintético, mientras que en el otro extremo se colocó 1 µL de diclorometano como control, ambos estímulos se depositaron en un papel filtro Whatman No. 3, de 2 cm². Las pruebas se realizaron con ninfas de 5to estadio. Las ninfas se colocaron en la base del tubo Y, se registró como respuesta positiva si el insecto cruzaba

la “línea de elección” (7 cm pasada la intersección de los brazos del olfatómetro) y permanecía en ese sitio por 20 segundos. Si después de 5 minutos el insecto no seleccionó ningún estímulo, el bioensayo fue detenido y se tomó como que el insecto no responde al estímulo. Las condiciones de los bioensayos fueron; en un cuarto oscuro iluminado por una luz roja (20 lux) a una distancia de 120 cm. Con la finalidad de no perturbar la actividad del insecto, a una temperatura de 25 ± 1 °C en un horario de 18:00 a 22:00 horas debido al hábito nocturno de la especie. Durante todas las pruebas la muestra y el control fueron intercalados en cada repetición con el propósito de evitar sesgos en la respuesta. Después de cada bioensayo, el olfatómetro se lavó con agua, jabón y acetona y se secó en la estufa a 90°C durante una hora.

El análisis y la identificación de los volátiles se realizaron en un cromatógrafo de gases Varian Star CP-3800 acoplado a un detector selectivo de masas Varian modelo Saturn 2200. Utilizando una columna de metil silicona (DB5-MS) de 30 m de longitud por 0.25 mm de diámetro Interior. Las muestras fueron inyectadas en modo splitless. Se empleó un programa de temperatura inicial de 50°C (2 min) hasta una temperatura final de 280 °C (2 min) con un incremento de temperatura de 15 °C por min. Se utilizó Helio como gas acarreador. El análisis de los volátiles se realizó empleando el software Saturn GC/MS Workstation. La identificación preliminar de los compuestos se efectuó mediante la comparación del tiempo de retención y el espectro de masas de cada pico, comparado con la biblioteca espectral NIST 2002. Posteriormente, se confirmaron con los estándares sintéticos en existencia en almacén de reactivos del laboratorio. Aquellos compuestos presentes en el control fueron descartados de los cromatogramas de la muestra, por que asumimos que eran contaminantes.

Los resultados obtenidos en los bioensayos con los volátiles de macho y hembra de *D. marsupialis* y los compuestos sintéticos, fueron analizados mediante una prueba ji cuadrada excluyéndose del análisis los insectos que no respondieron en el olfatómetro, usando el software R versión 3.3.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos. Los resultados observados en las pruebas comportamentales con ninfas de 5to estadio de *T. dimidiata* (Figura 1) muestran que en los volátiles de machos (a) no se encontró atracción significativa en comparación al control ($p > 0.05$), sin embargo en la evaluación de los volátiles de las hembras (b) resultaron atractivos significativamente ($p < 0.05$). Así también se evaluaron ambos volátiles (hembra y macho) en comparación (c) observando atracción significativa ($p < 0.05$) hacia los volátiles de las hembras contra los volátiles de los machos. Este resultado sugiere que las ninfas fueron atraídas de forma selectiva y posiblemente están alimentándose de un sexo en específico. Este comportamiento puede ser debido a la biología de *D. marsupialis*, debido a que las hembras suelen ser más sedentarias que los machos ya que estas suelen proteger a sus crías de los depredadores en sus madrigueras que usualmente suelen ser en huecos de troncos, dormideros abandonados de otros mamíferos, grietas de rocas y techos de casas, lugares óptimos donde suelen encontrarse estos insectos (Yeo *et al.*, 2005; Antonio *et al.*, 2001).

Identificación. En la identificación por CG-EM de los volátiles de tlacuache (*D. marsupialis*) (Cuadro 1), se encontró una relación de compuestos entre ambos sexos, sin embargo se observan siete compuestos que solo están presentes en los volátiles de las hembras, los cuales pueden ser influyentes en la atracción de *T. dimidiata*. Entre estos compuestos está el nonanal que ya ha sido reportado en volátiles de aves y humanos y es componente de una mezcla atrayente a *Culex quinquefasciatus* (mosquito) (Syed y Leal en 2007).

Además, Guerenstein y Guerin (2001) reportaron al nonanal como compuesto antenalmente activos en *Triatoma infestans*, estos autores señalan al nonanal como uno de los compuestos que

estimulan la actividad o guían a *T. infestans* para la búsqueda de su alimentación. Por ello se asocia el comportamiento selectivo que presenta *T. dimidiata* a la especie *D. marsupialis*, el cual puede ser debido a la presencia del compuesto nonanal encontrado en hembras y ausente en machos.

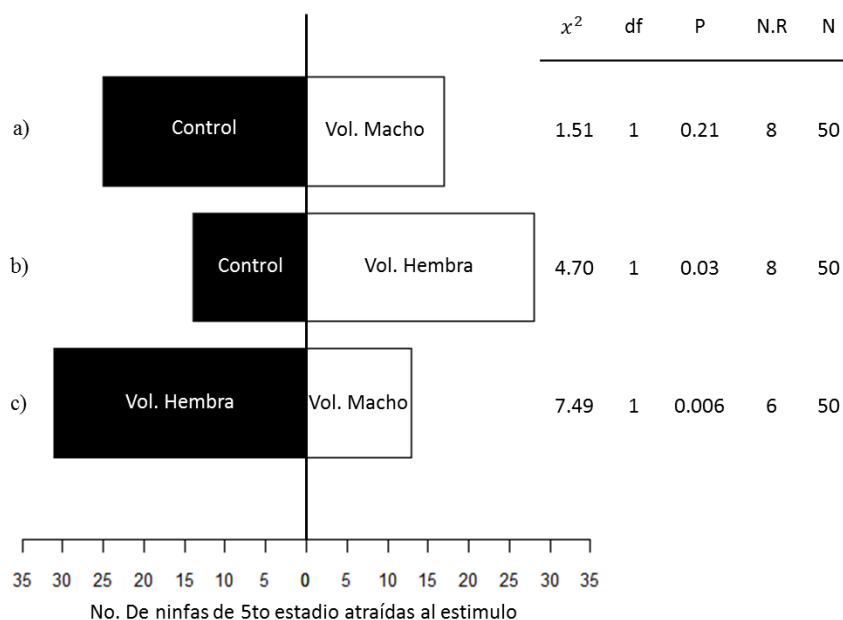


Figura 1 Respuesta de ninfas de 5to estadio de *Triatoma dimidiata* a volátiles de tlacuache (*Didelphis marsupialis*).

Cuadro 1. Proporción de compuestos identificados por CG-EM en volátiles de *Didelphis marsupialis*.

| No. | Nombre del compuesto | IR | Proporción (%) | |
|-----|----------------------|------|----------------|-------|
| | | | M | H |
| 1 | p-Cresol* | 1072 | 27.70 | 25.48 |
| 2 | Nonanal* | 1099 | | 13.35 |
| 3 | Hexanoato de butilo | 1187 | 11.25 | 1.39 |
| 4 | Ciclododecanol | 1195 | | 3.62 |
| 5 | Tetradecano* | 1400 | 3.74 | 1.07 |
| 6 | 1,9-Tetradecadieno | 1411 | 2.42 | |
| 7 | Cariofileno | 1422 | | 1.54 |
| 8 | Curcumeno | 1473 | | 4.09 |
| 9 | Pentadecano* | 1500 | 3.33 | 4.29 |
| 10 | Hexadecano* | 1600 | 4.97 | 3.53 |
| 11 | 8-Hexadecano | 1649 | | 7.02 |
| 12 | Benzoato de fenilo | 1682 | 10.72 | |
| 13 | Heptadecano* | 1700 | 9.67 | 6.99 |
| 14 | Octadecano* | 1800 | 3.19 | 7.19 |
| 15 | Ciclohexadecano | 1885 | 12.64 | |
| 16 | Nonadecano* | 1900 | | 0.91 |
| 17 | Eicosano* | 2000 | 2.19 | 1.00 |
| 18 | 1-Heptadecanol | 2007 | 4.81 | |
| 19 | Alcohol oleico* | 2066 | 3.37 | |
| 20 | Ácido oleico* | 2263 | | 18.5 |

(IR) índice de retención, (M) Macho y (H) Hembra. *Compuestos corroborados mediante estándares sintéticos.

Bioensayos con sintéticos. Una vez identificados los compuestos volátiles y corroborados con los estándares sintéticos existente en el almacén de reactivos del laboratorio, se realizaron los bioensayos correspondientes con los compuestos (p-cresol, nonanal y ácido oleico) que se creyeron que podrían influir en la atracción de *T. dimidiata*. Estos compuestos se evaluaron individualmente en tres concentraciones (10, 100 y 1000 ng/ μ L) y se analizaron mediante una prueba ji cuadrada. Observando que las ninfas de quinto estadio fueron atraídas de manera significativa ($p < 0.05$) al nonanal (Figura 2). Este resultado concuerda con el encontrado por Guerenstein y Guerin en el 2001, donde reportan este compuesto como antenalmente activo en *T. infestans*.

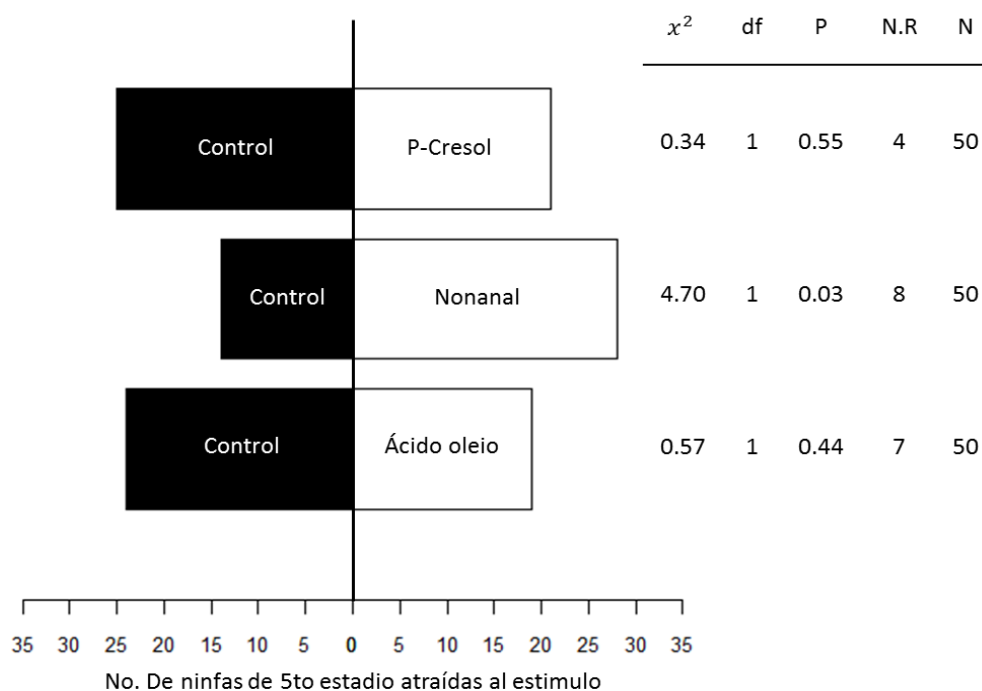


Figura 2. Respuesta de ninfas de 5to estadio de *Triatoma dimidiata* a 10 nanogramos de compuestos sintéticos.

CONCLUSIONES

Se observó que las ninfas de 5to estadio de *T. dimidiata* fueron atraídas significativamente a los volátiles de *D. marsupialis* hembra, sin embargo, los volátiles de machos no fueron atractivos para las ninfas. Se lograron identificar 13 compuestos volátiles pertenecientes a *D. marsupialis* macho y 15 compuestos en hembras de la misma especie por cromatografía y espectrometría de masas. Se encontraron siete compuestos que solo están presentes en volátiles de hembra y se encontró que el nonanal fue atractivo en ninfas de 5to estadio de *T. dimidiata*, por lo que es un buen candidato para ser evaluado en pruebas de campo.

AGRADECIMIENTOS

A El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), por las facilidades otorgadas para el uso del equipo y materiales dentro de los laboratorios del proyecto de Ecología Química del Grupo de Ecología de Artrópodos y Manejo de Plagas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del trabajo de investigación y la beca otorgada, a través del proyecto 167258 titulado "Comunicación química y comportamiento en chinches del complejo *Triatoma dimidiata*, vectores de la enfermedad de Chagas".

LITERATURA CITADA

- Antonio R. y Teixeira P. 2001. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 100-112.
- Guerenstein P. y Guerin P. 2001. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. *Journal of Experimental Biology*, 204: 585-597.
- Hoare C. 1972. The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. Oxford, UK: *Blackwell Scientific Publications*. Cab direct, 17: 540-749.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2002. *Taller para el establecimiento de pautas técnicas en el control de Triatoma dimidiata*. San Salvador, El Salvador, 35-36pp.
- Schofield C. y Dias J. 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Advances in Parasitology*, 42:1-27.
- Syed Z. y Leal W. 2007. Maxillary palps are broad spectrum odorant detectors in *Culex quinquefasciatus*, *Chemical Senses*. 32: 727-738.
- Yeo M., Acosta N., Llewellyn M., Sanchez H., Adamson S. y Miles A. 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal Parasitology*, 35: 225-33.