

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/01/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias
Aplicadas à Farmácia

Fábio Regis Garcia

**Estudo do conexivo de *Panstrongylus megistus*, *Triatoma*
dimidiata, *Triatoma lenti* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera,
Reduviidae, Triatominae)**

Araraquara
2018

Fábio Regis Garcia

Estudo do conexivo de *Panstrongylus megistus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma lenti* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F216e Garcia, Fábio Regis
Estudo do conexivo de *Panstrongylus megistus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma lenti* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) / Fábio Regis Garcia. – Araraquara, 2017.
77 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Parasitologia.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

1. Conexivo. 2. Pigmentos. 3. Nanopartículas. 4. Triatominae. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

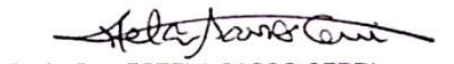
TÍTULO DA TESE: ESTUDO DO CONEXIVO DE *Panstrongylus Megistus*, *triatoma lenti* e *triatoma rubrovaria* (hemiptera, reduviidae)

AUTOR: FABIO REGIS GARCIA

ORIENTADOR: JOAO ARISTEU DA ROSA

COORIENTADORA: PATRICIA BENTO DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: ANÁLISES CLÍNICAS pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAO ARISTEU DA ROSA
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP
Profa. Dra. LÍVIA MARIA FUSARI
Departamento de Hidrobiologia / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR
Pós-Doutoranda Dra. CAMILA CRISTINA DE FOGGI
Departamento de Química / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR
Profa. Dra. ESTELA SASSO CERRI
Departamento de Morfologia / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
Prof. Dr. LUIS VITOR SILVA DO SACRAMENTO
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 25 de janeiro de 2018

Dedicatória

***Dedico esse trabalho a meus pais,
Ildaci e Antonio,
pelo carinho e força.
E a Deus por ter me dado sabedoria,
para lidar com as adversidades e soluções
no decorrer dessa jornada.***

AGRADECIMENTOS

De modo especial ao meu orientador João Aristeu da Rosa, pela ajuda em todas as etapas dessa pesquisa e por ser solidário, educado e profissional totalmente engajado na árdua tarefa de educar e orientar.

Ao meu coorientador Marcelo Orlandi – IQ/UNESP, por abrir as portas de seus laboratórios e dar todo subsídio para que o estudo fosse executado e concluído com êxito.

A FAPEAM, por conceder minha bolsa, que possibilitou me manter em Araraquara – SP, durante todo meu doutoramento, por meio do edital 2014/001.

Ao colaborador Juan Guerreiro, que me auxiliou em muitas tomadas de decisões com sua experiência e que ao longo dos trabalhos se tornou um amigo.

A minha mãe Ildaci Regis que deu todo seu amor e apoio nessa jornada seja ela em forma de conselhos, carinho e dinheiro. Sempre de forma incondicional e nunca exigindo nada em troca a não ser meu amor e respeito eterno. E que ao longo de toda a minha carreira na docência sempre me indagava: “Quando você vai começar o doutorado? ”

Às minhas irmãs Fabiana e Franciele, que me demonstram seu amor incondicional, principalmente nas adversidades da vida.

***Meus cunhados Gilmar e Mikael e meu pai Antonio Garcia, por
fazerem parte da minha vida.***

***Aos meus sobrinhos amados Joaquim, Emanuel, Samuel e a
minha lindinha Rebeca.***

***Ao meu querido Hércules Dias, que esteve sempre ao meu lado
durante todo meu caminho acadêmico, mesmo antes do começo
dessa jornada árdua. Pessoa que segurou minha mão nos
momentos mais difíceis e fez com que tudo passasse mais
suavemente, me alegrando e ajudando a levantar a cada queda, e
se alegrando comigo a cada conquista.***

***Aos amigos do Laboratório de Parasitologia pela força.
Principalmente a Aline, que desde o meu primeiro dia, antes de
ser aceito na pós-graduação, mesmo toda atarefada com o
término do seu doutorado e início do seu pós-doutorado, foi
totalmente atenciosa comigo, sem pedir nada em troca.
Agradeço também pela amizade sincera dos amigos: Juliana,
Rossana, Éder, Lucas, Flávia e Vicente.***

***Aos professores Alexandra, Mara, Luís Vítor e Taís, que
indiretamente foram responsáveis pelo êxito desse trabalho,
auxiliando com sua amizade, exemplos de trabalho e incentivo, à
perseverança, com conversas que me ajudaram a fazer o melhor
para trilhar esse caminho.***

***Aos meus amigos dos demais laboratórios do DCB que ajudaram
a tornar essa jornada mais alegre: Luciana, Matheus, Felipinho,***

***Larissa, Arianne, Anderson, Bruna, Gustavo e Patrícia.
Principalmente à Karen, que mesmo com tanto trabalho em seu doutorado sanduiche nos EUA, sempre esteve aberta a me ouvir em nossas longas chamadas por telefone, dando-me força e doando um pouquinho da sua grande inteligência e amizade sincera.***

Ao meu querido amigo Mateus, que nos últimos dias foi um grande suporte, indo parar até na UPA de madrugada para me auxiliar quando necessário. E que me disse uma frase que ficará para toda minha vida: “ Amigos sinceros e verdadeiros, são os que ficam.”

***Aos meus queridos amigos docentes da Rede Laureat Universit, principalmente a minha amiga Livia e Universidade do Estado do Amazonas por me darem o apoio necessário para tentar seguir essa jornada de sonhos e dores que é a pós-graduação.
A minha querida amiga, Karime Bentes da UFAM, por ter me estendido a mão quando necessário demonstrando amizade sincera.***

Aos amigos “Piticas” como carinhosamente nos identificamos. Que muitas vezes me tiravam desse mundo da ciência e me ajudavam a relaxar entre uma e outra conversa sobre a vida, amizade, futuro, família e todo o cotidiano em que os amigos de verdade estão incluídos. Camila, Luis, Mariana, Gabriel, Thiago e Vinícius.

***Aos técnicos do Instituto de Química da UNESP pela ajuda.
Principalmente ao Diego que me passou muitos ensinamentos
de química e de física ao longo dos experimentos nos
equipamentos.***

***Aos técnicos do Departamento de Ciências Biológicas da FCFAR
da UNESP, principalmente a Joelma mais conhecida como “JÔ”
que mesmo não tendo me auxiliado nessa pesquisa, muitas
vezes orou pelo meu êxito.***

***A todo o corpo docente da FCFAR/UNESP por seus
ensinamentos e demonstração de amor pelo que fazem.***

***Agradeço a muitas pessoas não citadas aqui, pois tiveram sua
importância também ajudando quando necessárias, ou
atrapalhando quando não necessárias. Tudo de bom e de mal
que acomete nossa vida, nos ajuda a crescer tornando-nos cada
dia mais fortes.***

***Ao longo dessa jornada pesada e insana, muitas vezes pensei
em sucumbir, mas muito desses momentos me ajudaram a
fortalecer como pessoa e como profissional. Nada disso não
teria sido possível se não fosse Deus agindo de várias formas e
usando diversas pessoas para que eu sempre soubesse que Ele
está sempre ao meu lado.***

***“ Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo. ”***

Martin Luther King

Lista de Siglas e Abreviaturas

CTA: Colônia de Triatominae de Araraquara

EDRX: Energia Dispersiva de raio-x

FEI: Marca de fabricante de Microscópios Eletrônico de Varredura de Duplo Feixe

FIB: Microscópios Eletrônico de Varredura de Duplo Feixe

MO: Microscopia Óptica

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

Lista de Figuras

Figura 1. Ocorrência relativa de 16 espécies de triatomíneos em diferentes biomas (Gonçalves et al., 2011).....	3
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>T. rubrovaria</i> (a) e <i>P. megistus</i> (b) (adaptado de Gonçalves et al., 2011) no Brasil.	4
Figura 3. Conformação molecular de quitina.....	6
Figura 4. Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara – SP.	11
Figura 5. Microscópio eletrônico de varredura de feixe duplo, FEI - modelo Helios Nanolab 600i, do laboratório de Microscopia Avançada do Instituto de Química/UNESP/Araraquara.....	13
Figura 6. Microscópio eletrônico de transmissão Philips CM200 - Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Química/UNESP/Araraquara.	15
Figura 7. Imagem de porção vermelha do conexivo de <i>P. megistus</i> por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumentos de 650, 3500, 10000 e 65000 vezes, respectivamente. a) Localização dos aglomerados. b,c e d) Estruturas esféricas.....	16
Figura 8. Imagem da porção preta do conexivo de <i>P. megistus</i> por meio de microscopia de varredura, com aumentos de 650, 3500 e 10000 vezes respectivamente. a) Localização dos aglomerados. b e c) Estruturas esféricas ou aglomerados.	17
Figura 9. Imagem da porção externa da porção vermelha do conexivo de <i>P. megistus</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de 100 e 10000 vezes respectivamente.....	18
Figura 10. Imagem da porção externa preta do conexivo de <i>P. megistus</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de 650 e 10000 vezes respectivamente.	18
Figura 11. Imagem da porção interna vermelha do conexivo de <i>T. rubrovaria</i> por meio de microscopia eletrônica de varredura por FIB, com aumentos de 100, 650, 10000 e 65000 vezes respectivamente. a e b) Localização dos aglomerados. c , d) estruturas esféricas.	19

Figura 12. Imagem da porção interna preta do conexivo de <i>T. rubrovaria</i> por meio de microscopia eletrônica de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 10000, d) 65000 vezes.....	19
Figura 13. Imagem da porção externa vermelha do conexivo de <i>T. rubrovaria</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com magnificações de a) 650, b) 3500, c) 10000, d) 65000 vezes.....	20
Figura 14. Imagem da porção externa preta do conexivo de <i>T. rubrovaria</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.....	20
Figura 15. Imagem da porção interna amarela do conexivo de <i>T. lent</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.....	21
Figura 16. Imagem da porção interna preta do conexivo de <i>T. lenti</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.....	22
Figura 17. Imagem da porção externa amarela do conexivo de <i>T. lenti</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.....	22
Figura 18. Imagem da porção externa preta do conexivo de <i>T. lenti</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.....	23
Figura 19. Imagem da porção interna amarela do conexivo de <i>T. dimidiata</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.....	23
Figura 20. Imagem da porção interna preta do conexivo de <i>T. dimidiata</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.....	24
Figura 21. Imagem da porção externa amarela do conexivo de <i>T. dimidiata</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.....	25
Figura 22. Imagem da porção externa preta do conexivo de <i>T. dimidiata</i> por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes respectivamente.....	25

Figura 23. Imagem de orifício feito por íons de gálio, 30x37 µm, com profundidade de 10 µm da porção vermelha do conexivo de <i>T. rubrovaria</i> por meio de Microscopia de duplo feixe (FIB) (1000X, 10 KV e 43pA).	26
Figura 24. Imagem de orifício feito por íons de gálio, 30x37 µm, com profundidade de 10 µm da porção escura do conexivo de <i>P. megistus</i> por meio de Microscopia de duplo feixe (FIB) (1000X, 10 KV e 43pA).	27
Figura 25. Histograma do diâmetro (µm) de esferas/aglomerados de nanopartículas observadas em <i>P. megistus</i>	29
Figura 26. Histograma do diâmetro (µm) de esferas/aglomerados de nanopartículas observadas em <i>T. dimidiata</i>	29
Figura 27. Histograma do diâmetro (µm) de esferas/aglomerados de nanopartículas observadas em <i>T. lenti</i>	29
Figura 28. Histograma do diâmetro (µm) de esferas/aglomerados de nanopartículas observadas em <i>T. rubrovaria</i>	30
Figura 29. Imagens obtidas por MET da porção pigmentada de <i>P. megistus</i> . a, b) possíveis nanopartículas. c, d) nanopartículas com aproximadamente 50 nm.	31
Figura 30. Imagens por MET da porção pigmentada de <i>T. dimidiata</i> . a), b) Possíveis nanopartículas. c) Estruturas disformes com aproximadamente 600 nm. d) Estrutura octagonal com 750nm.	32
Figura 31. Imagens por microscopia eletrônica de transmissão da porção pigmentada de <i>T. lenti</i> . a, b) Possíveis nanopartículas c) Estruturas disformes com aproximadamente 350 nm, d) Planos atômicos.	33
Figura 32. Imagens obtidas por MET da porção pigmentada de <i>T. rubrovaria</i> . a), b) Possíveis nanopartículas e nano tubos. c), d) nanopartículas ocas hexagonais e nano tubos com aproximadamente 40 nm.	34
Figura 33. Imagens obtidas por MET de precipitado extraído da porção pigmentada de <i>P. megistus</i>	35
Figura 34. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de <i>P. megistus</i> por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.	35
Figura 35. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de <i>P. megistus</i> por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.	36
Figura 36. Imagens obtidas por MET de precipitado extraído da porção pigmentada de <i>T. dimidiata</i>	37

Figura 37. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de <i>T. dimidiata</i> por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.	37
Figura 38. Imagens obtidas por MET de precipitado de nanopartículas extraído da porção pigmentada de <i>T. Dimidiata</i>	38
Figura 39. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de <i>T. dimidiata</i> por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.	38
Figura 40. Imagens de precipitado da porção pigmentada de <i>T.lenti</i> obtidas por MET mostrando nanopartículas na extremidade esquerda e ao centro.	39
Figura 41. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de <i>T. lenti</i> por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.	39
Figura 42. Imagens obtidas por MET de nano partícula extraída da porção pigmentada de <i>T. lenti</i>	40
Figura 43. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de <i>T. lenti</i> por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.	41
Figura 44. Imagens obtidas por MET de precipitado extraído da porção pigmentada de <i>T. rubrovaria</i>	41
Figura 45. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de <i>T. rubrovaria</i> por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.	42
Figura 46. Imagens obtidas por MET de nanopartícula extraída da porção pigmentada de <i>T. rubrovaria</i>	43
Figura 47. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de <i>T. rubrovaria</i> por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.	43
Figura 48. Imagens obtidas por MET de nanopartícula extraída da porção pigmentada de <i>P. megistus</i> , que mostram planos atômicos e as distâncias interplanares.	44
Figura 49. Imagens obtidas por MET dos planos atômicos e distância Interplanares de nano partícula extraída da porção pigmentada de <i>T. dimidiata</i>	45
Figura 50. Imagens obtidas por MET dos planos atômicos e distância interplanares de nano partícula extraída da porção pigmentada de <i>T. lenti</i> . .	46
Figura 51. Imagens obtidas por MET dos planos atômicos e distância Interplanares de nano partícula extraída da porção pigmentada de <i>T. rubrovaria</i>	47

Lista de Tabelas

Tabela 1. Elementos químicos encontrados no conexivo de quatro espécies de Triatominae por meio de EDS/FIB.	28
Tabela 2. Valores de distância interplanares e substâncias encontradas a partir desses valores na ficha cristalográfica de nanopartículas encontradas na porção pigmentada de <i>P. megistus</i>	44
Tabela 3. Valores de distância Interplanares e substâncias encontradas a partir desses valores na ficha cristalográfica de nanopartículas encontradas na porção pigmentada de <i>T. dimidiata</i>	45
Tabela 4. Valores de distância Interplanares e substâncias encontradas a partir desses valores na ficha cristalográfica de nanopartículas encontradas na porção pigmentada de <i>T. lenti</i>	46
Tabela 5. Valores de distância Interplanares e substâncias encontradas a partir desses valores na ficha cristalográfica de nanopartículas encontradas na porção pigmentada de <i>T. rubrovaria</i>	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. Revisão da Literatura	5
2.1. A importância do estudo do conexivo nos Triatominae.	5
2.2. Constituição da hemolinfa dos Triatominae.	6
2.3. Constituintes do sangue humano.	6
2.4. Microscopia Eletrônica.	7
2.5. Espectroscopia por Dispersão em Energia de raio-x (EDS).	8
3. OBJETIVOS	10
3.1. OBJETIVO GERAL	10
3.2. Objetivos Específicos	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Obtenção dos exemplares de triatomíneos.	11
4.2. Manutenção e uso de colônias de triatomíneos.	12
4.3. Caracterização de substâncias e estruturas encontradas no conexivo dos triatomíneos.	12
4.3.1. Preparação e separação do conexivo de <i>P. megistus</i> , <i>T. dimidiata</i> , <i>T. lenti</i> e <i>T. rubrovaria</i> .	12
4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).	12
4.3.3. Extração do pigmento do conexivo de <i>P. megistus</i> , <i>T. dimidiata</i> , <i>T. lenti</i> e <i>T. rubrovaria</i> .	13
4.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).	14
5. RESULTADOS	16

5.1. Microscopia eletrônica de varredura.	16
5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET.	31
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

RESUMO

A doença de Chagas apresenta em sua cadeia epidemiológica hospedeiros invertebrados, que são os triatomíneos, insetos hematófagos que veiculam *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico dessa zoonose. Devido à importância epidemiológica dos triatomíneos faz-se necessário um estudo detalhado sobre caracteres morfológicos e bioquímicos, buscando uma possível relação entre fatores endógenos, exógenos e sua capacidade vetorial. Nesta tese foi desenvolvido o estudo de metabólitos produzidos pelos triatomíneos, dentre esses os constituintes responsáveis pela coloração do conexivo de adultos de *Panstrongylus megistus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma lenti* e *Triatoma rubrovaria*. Justifica-se a utilização dessas espécies, pois *P. megistus* e *T. rubrovaria* embora de gêneros distintos, apresentam a coloração vermelha no conexivo enquanto *T. dimidiata* e *T. lenti* contém em seus conexivos, manchas amarelas. Assim, a identificação das substâncias responsáveis pela coloração do conexivo dessas espécies será útil para determinações de novos marcadores taxonômicos e também para análises filogenéticas. Dessa forma, foram utilizadas várias metodologias experimentais para elucidar e caracterizar a constituição dos componentes pigmentados do conexivo. As análises feitas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão acopladas com EDS permitiram a visualização e identificação de nanopartículas e elementos químicos. A identificação das nanopartículas foi feita por determinação e mensuração dos planos atômicos a partir das imagens geradas pela análise de MET em alta resolução. Foram identificadas por essas técnicas a existência de elementos químicos constituintes de nanopartículas, de sangue humano e de β -quitina. Os resultados obtidos permitem concluir que a coloração do conexivo se dá pelo fato de existir nessa estrutura substâncias distintas ou em concentrações diversas, entre as quais as nanopartículas e os elementos químicos que as constituem. As nanopartículas encontradas em *P. megistus* foram identificadas como Ti, em *T. dimidiata* como Ti_2O_3 , em *T. lenti* como Fe_2O_3 e em *T. rubrovaria* como $FeVO_4$.

Palavras-chave: Conexivo. Pigmentos. Nanopartículas. Triatominae.

ABSTRACT

Chagas disease presents in its epidemiological chain invertebrate hosts, which are the triatomines, hematophagous insects that carry *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of this zoonosis. Due to the epidemiological importance of triatomines, a detailed study of morphological and biochemical characteristics is necessary, seeking a possible relationship between endogenous and exogenous factors and their vector capacity. In this thesis developed was the study of metabolites produced by triatomines, among them the constituents responsible for the coloring of the adult connexive of *Panstrongylus megistus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma lenti* and *Triatoma rubrovaria*. The use of these species is justified because *P. megistus* and *T. rubrovaria*, although of different genera, have a red color in the connexive while *T. dimidiata* and *T. lenti* contain yellow spots on their connective tissue. The identification of the substances responsible for the coloring of the connective of these species will be useful for determinations of new taxonomic markers and for phylogenetic analyzes. In this way, several experimental methodologies were used to elucidate and characterize the constitution of the pigmented components of the connective tissue. The analyzes made by scanning electron microscopy and transmission electron microscopy coupled with EDS allowed the visualization and identification of nanoparticles and chemical elements. The identification of the nanoparticles was made by determination and measurement of the atomic planes from the images generated by the high resolution MET analysis. These techniques have identified the existence of chemical elements consisting of nanoparticles, human blood and β -chitin. The results obtained allow us to conclude that the color of the connective is because of different substances or in different concentrations, among them the nanoparticles and the chemical elements that constitute them. The nanoparticles found in *P. megistus* were identified as Ti, in *T. dimidiata* as Ti_2O_3 , in *T. lenti* as Fe_2O_3 and in *T. rubrovaria* as $FeVO_4$.

Keywords: Connexive. Pigments. Nanoparticles. Triatominae.

1. Introdução

A doença de Chagas é uma das doenças parasitárias mais importantes com graves impactos sociais e econômicos, principalmente na América Latina e no Brasil (Ramalho et al., 2012). Em países não endêmicos como os Estados Unidos, Japão, Austrália e no continente europeu também há registros de infecção por *Trypanosoma cruzi*, porém nesses países a via de transmissão não se faz por meio do vetor, mas pela emigração e deficiência de triagem em bancos de doação de sangue. A ausência de controle em bancos de sangue, assim como a insuficiência de profissionais treinados, faz com que a transfusão sanguínea seja considerada a segunda via de transmissão da doença de Chagas, representando de 12% a 20% das infecções (Schmunis & Dias, 2000). Desde 1984, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem recomendado o uso de cristal violeta em bancos de sangue em áreas endêmicas para prevenir a transmissão por transfusão de sangue (Ramalho et al., 2012).

A fase aguda da doença de Chagas geralmente é assintomática, em que por volta de 10% dos pacientes apresentam quadro febril por 6 a 10 dias após a infecção e que desaparece espontaneamente entre 4 e 8 semanas. Após a fase aguda a doença progride para a fase crônica (Rassi et al., 2000), que dependendo da região geográfica cerca de 20% a 35% dos indivíduos infectados acabam por desenvolver lesões no sistema nervoso, coração, esôfago e cólon (Steindel et al., 2008). Outra forma de contágio é por meio da ingestão do vetor ou de seus dejetos, com notificações nos estados da Bahia, Ceará, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e principalmente no Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará e Tocantins. Estados esses onde há o maior número de surtos registrados, evidenciando o mau preparo de alimentos e os problemas associados à higiene e saúde pública (Dias, 2006; OMS, 2009).

A transmissão vetorial de *T. cruzi* é a forma mais importante de transmissão da doença de Chagas, fazendo-se de grande importância o controle populacional de triatomíneos infectados (Rabinovich et al., 1979; Litvoc, 1985; Dias & Coura, 1997), principalmente nas áreas peri e intradomiciliares, uma vez feita a observação de que o combate sistemático a esses vetores reduz drasticamente a expansão da doença (Dias, 2000).

Estima-se que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas (WHO, 2016) estejam infectadas apenas no mundo, dentre elas 30% apresentam problemas cardíacos na fase crônica da doença, 10% desenvolvem problemas digestivos, alterações neurológicas ou ambos e mais de 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco (WHO, 2013; WHO 2016). Essas ocorrências estão relacionadas principalmente à invasão humana aos ecótopos silvestres, o que facilita o contato entre os triatomíneos parasitados por *T. cruzi* e o homem, proporcionando desse modo o ambiente ideal para o seu desenvolvimento e proliferação vetorial (Vinhaes & Dias, 2000).

Em 1907, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas foi designado pelo seu diretor Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz a desenvolver em Minas Gerais uma campanha contra a malária, devido à contaminação de trabalhadores que participavam da construção da Estrada de Ferro Central do Brasil. Carlos Chagas obteve então relatos de nativos sobre um inseto conhecido por eles como barbeiro, que possuía hábito noturno e se alimentava do homem. O pesquisador brasileiro percebeu tratar-se de um hematófago, hemíptero heteróptero, gênero *Conorhinus*, que atualmente é denominado *Panstrongylus megistus* (Chagas, 1909).

Atualmente são descritas 152 espécies distribuídas em 18 gêneros de triatomíneos, dentre esses três, *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* possuem maior importância epidemiológica por conterem a maior parte de espécies relativas à transmissão da doença de Chagas ao homem (Rosa, et al., 2012, Galvão, 2015; Mendonça et al., 2016).

No Brasil apesar de serem encontradas 66 espécies, o maior número de incidência peri ou intradomiciliar referem-se às espécies: *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*, por oferecerem maior risco epidemiológico (Coura & Dias, 2009; Galvão, 2015; Rosa et al. 2017). As regiões de maior incidência do gênero *Triatoma* encontram-se nos Estados do Rio Grande do Sul, parte de Santa Catarina e região noroeste do Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Estados do Nordeste, do mesmo modo que foram registrados focos de transmissão por meio de *Rhodnius* no Pará, Amapá e no Alto do Rio Negro (Silveira & Rezende, 1994; Dias, 2009).

As ações decorrentes da Iniciativa Cone Sul em 1991 controlaram não só o vetor, mas também o contágio por meio de transfusão sanguínea, fazendo com que a doença de Chagas no Brasil decrescesse significativamente (Vinhaes & Dias,

2000). Entretanto, outras espécies também podem habitar áreas próximas a domicílios, como *T. rubrovaria*, que após o controle de *T. infestans* no Rio Grande do Sul, apresentou crescente captura intradomiciliar, porém sem a comprovação da domiciliação (Almeida et al., 2000; Silveira & Dias, 2011). A ocorrência de diferentes espécies de triatomíneos e suas distribuições geográficas em função dos biomas que ocupam, é retratado no gráfico a seguir (Gonçalves et al., 2011) (Figura 1).

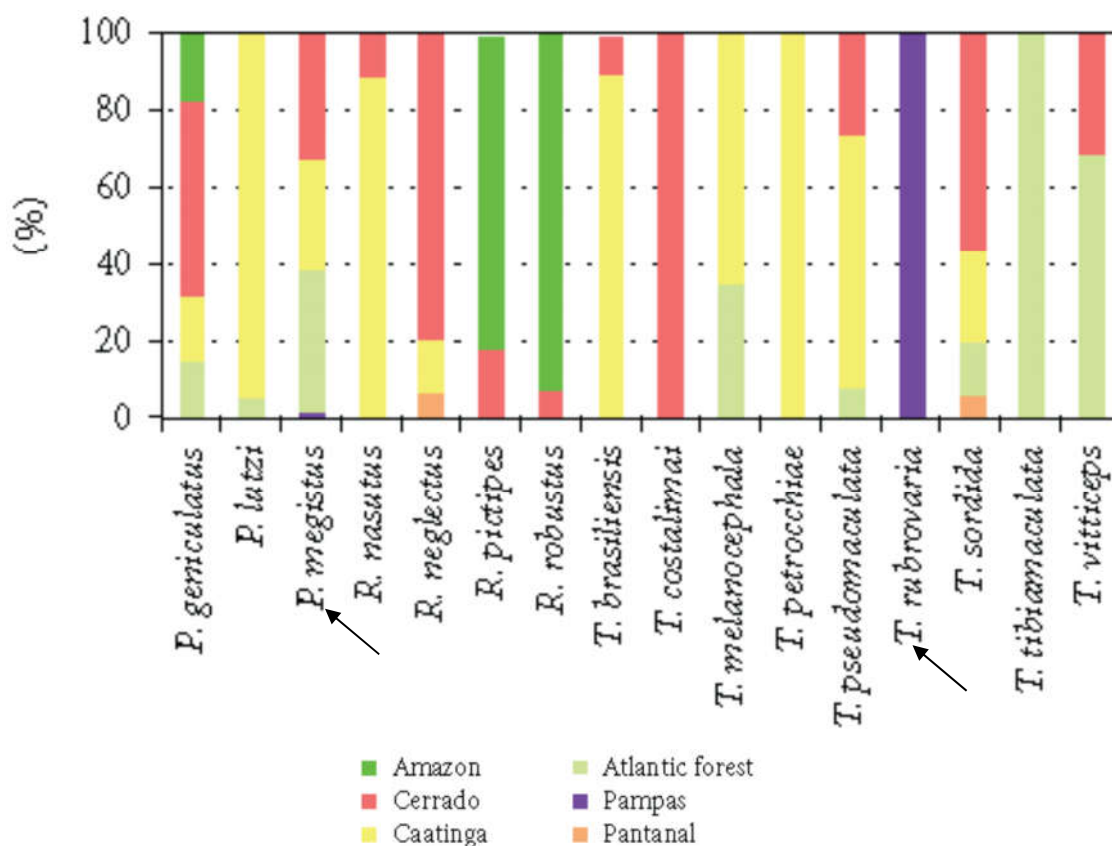


Figura 1. Ocorrência relativa de 16 espécies de triatomíneos em diferentes biomas (Gonçalves et al., 2011).

O controle de *T. infestans* favoreceu a disseminação de *T. rubrovaria* e *P. megistus*, que passaram a assumir maior relevância epidemiológica devido à sua capacidade de colonizar áreas peridomiciliares (Almeida et al., 2000; Silveira & Dias, 2011). Ao transportar lenha os próprios moradores acabam carregando os triatomíneos para áreas peri ou intradomiciliares, facilitando a invasão residencial pelos mesmos, ou por intermédio da cobertura vegetal (Dias, 2000).

Triatoma rubrovaria encontra-se em uma área restrita ao bioma Pampa, na região Sul do Brasil abrigoando-se em rochas localizadas em áreas peridomiciliares, podendo se alimentar de vários animais e insetos além do homem (Salvatella, 1995).

Outro fator de importância epidemiológica é a grande distribuição geográfica de *P. megistus*, sendo a espécie mais amplamente distribuída pelo Brasil (Silveira, 2011), podendo ser encontrado em diversos biomas como cerrado, caatinga, floresta Atlântica e, assim como *T. rubrovaria*, nos pampas, como mostrado no mapa abaixo de distribuição geográfica de triatomíneos das espécies *T. rubrovaria* e *P. megistus* (Gonçalves et al., 2011) (Figura 2).

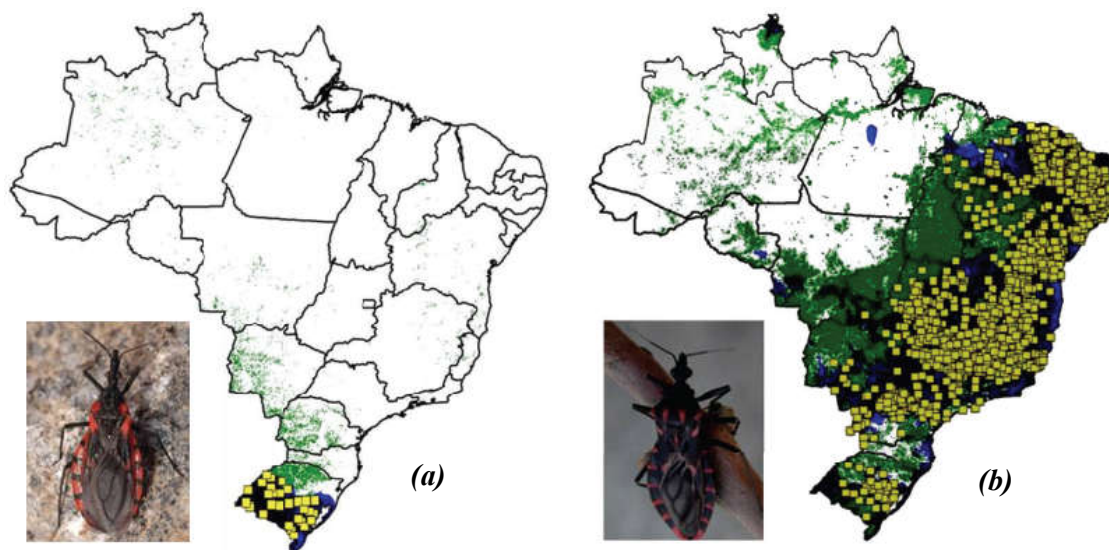


Figura 2. Distribuição geográfica de *T. rubrovaria* (a) e *P. megistus* (b) (adaptado de Gonçalves et al., 2011) no Brasil.

Exemplares de *Triatoma lenti* são encontrados apenas no Brasil (Alevi et al., 2013, Galvão, 2015), nos Estados da Bahia e Goiás e assim como *P. megistus*, habitam biomas como caatinga e cerrado (Gonçalves et al., 2011), podendo ser encontrados também em locas de pedras (Sherlock & Serafim, 1967), mais distantes de áreas peridomiciliares.

Situado nas partes laterais do abdômen, o conexivo pode apresentar de duas a três manchas por segmento, variando entre as espécies. Nas formas adultas de triatomíneos cada metâmero é separado por linhas intersegmentares, havendo diferenciação entre as espécies quanto à disposição, tamanho e coloração. Machos

apresentam estrutura contínua e fêmeas apresentam uma pequena interrupção na altura do ovipositor (Rosa & Barata, 1997).

O estudo do conexivo tem contribuído para a determinação de espécies da subfamília *Triatominae*. Assim no gênero *Panstrongylus* oito espécies foram identificadas por meio do conexivo, bem como 24 de *Triatoma* e seis de *Rhodnius* (Lent & Wygodzinky, 1979).

7. Conclusões

- Os constituintes elementares do conexivo comuns a *P. megistus*, *T. dimidiata*, *T. lenti* e *T. rubrovaria*, são: Mg, N, C, O, Ca, K, e Na, resultantes do habito alimentar hematófago dessas espécies.
- Em *P. megistus* e em *T. lenti* foi observado a presença de Ti, proveniente de elementos ultra-traços ou micronutrientes que são constituintes do sangue.
- Em *T. dimidiata* e *T. rubrovaria* foi identificado Fe, que faz parte dos oligoelementos encontrados no sangue.
- A análise dos conexivos a partir de MEV e MET, mostram estruturas esféricas que foram denominadas aglomerados onde estão inseridas as nanopartículas.
- Os gráficos obtidos por EDS e a medidas interplanares, mostram que as nanopartículas observadas foram sintetizadas a partir do sangue ingerido pelos triatomíneos.
- Nas quatro espécies estudadas foram identificados elementos químicos que constituem a eritropterina ($C_9H_7N_5O_5$) e a xantopterina ($C_6H_5N_5O_2$).
- *Panstrongylus megistus* apresenta em seu conexivo nanopartículas de Ti, *T. dimidiata* nanopartículas de Ti_2O_3 , *T. lenti* nanopartículas de Fe_2O_3 e *T. rubrovaria* nanopartículas de $FeVO_4$.

REFERÊNCIAS

ALEVI, K.C.C.; MENDONÇA, P.P.; SUCCI, M.; PEREIRA, N.P.; ROSA J.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Karyotype and spermatogenesis in *Triatoma lenti* (Hemiptera: Triatominae), a potential Chagas vector. **Genetics and Molecular Research**.v.12, p.838-851, 2013.

ALMEIDA, C. E; VINHAES, M. C; ALMEIDA, J. R; SILVEIRA, A. C; COSTA, J. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 95, p. 761–768, 2000.

CAMPANA-FILHO, S.P. et all. EXTRAÇÃO, Estruturas e propriedades de α e β -quitina. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 3, 644-650, 2007.

CHAGAS C, Nova Tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.1: p. 159 – 218, 1909

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química nova**, v. 32, n. 9, p. 2444 – 2457, 2009

DIAS, J. C. P; COURA J. R., Epidemiologia. In: Dias, J. C. P.; Coura, J. R. Org. **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem para o Clínico Geral**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997. p. 33 – 66.

DIAS, J. C. P. Epidemiological surveillance of Chagas disease. **Caderno de Saúde Pública**, v. 16, p. 43 – 59, 2000.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p. 370 – 375, 2006

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química nova**, v. 32, n. 9, p. 2444 – 2457, 2009

GALETTI, S.R. Introdução à microscopia eletrônica. **Biológico**, v.65, n. ½, p. 33-35, 2003.

GALVÃO, C., org. **Vetores da doença de Chagas no Brasil Zoologia: guias de identificação series**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2015, 289p. ISBN 978-85-98203-09-6.

GOMES, A. C. Vigilância Entomológica. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 11, n. 2, p. 79-90, 2002

GONÇALVES, R.G.; GALVÃO, C.; COSTA, J. et al. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. **Journal of Tropical Medicine**. Volume 2012, doi:10.1155/2012/70532615 pags, 2011.

HAMILTON, D. G.; WHITING, M. J.; PRYKE, S. R. Fiery frills: carotenoid-based coloration predicts contest success in frillneck lizards. **ISBE - The Official Journal of the International Society for Behavioral Ecology**. v.24, n. 5, p.1138-1149, 2013.

HAMMES, G. G.; **Spectroscopy for the Biological Sciences**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2005. p.1-17.

HASEGAWA, T., INAGAKI, K. HARAGUCHI, H. Multielement Correlation Analysis of Major-to-Trace Elements in Human Blood Serum for Medical Diagnosis as Studied by ICP-AES and ICP-MS. **The Japan Society for Analytical Chemistry , Analytical Sciences**, v.17, Supplement, p. i979-i982, 2001.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, 57, n.2, p. 229–240, 2010.

LACOMRE, D. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (*HETEROPTERA REDUVIIDAE*) parte XXI, Estudo comparado do sistema traqueal em triatoma *Panstrongylus* e *Rhodnius*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 63, n. único, p.75-105, 1965.

IMBERT, P. J. L. et all. β -Chitin, β -Chitosan and Chitosan Binding Protein in Triatomines Transmitters of Chagas Disease. **Journal of Chitin and Chitosan Science**, v. 1, n.3, p. 228-234, December 2013.
Doi: <https://doi.org/10.1166/jcc.2013.1034>.

JURBERG, J. et al.. **Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas)**. Rio de Janeiro: Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos Instituto Oswaldo Cruz, 2014. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/Atlas_triatominio_jurberg.pdf.

KIKUCHI, D. W.; PFENNING, D. W. A Batesian mimic and its model shore color production mechanisms. Department of Biology, University of North at Chaple Hill. **Current Zoology**, v. 58, n.4, p. 658-667, 2012.

LEI, Z.; HUHMANN, D. V.; SUMMER, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. **The Journal of biological Chemistry**, v. 286, n. 29, 25435-25442, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.238691>.

LENT, H; WYGODZINSKY, P. Revision of The Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), And Their Significance As Vectors of Chagas' Disease. **Bulletin of The American Museum of Natural History**, v. 163, p. 487–499, 1979.

LITVOC, J. **Doença de Chagas e Estrutura Social: Infestação Domiciliar e Infecção Humana em Áreas Submetidas a Ações de Controle**. Tese (Doutorado em Medicina), São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1985.

MACGRAW, K. J.; HUDON, J. H.; HILL, G. E.; PARKER, R. S. A simple and inexpensive chemical test for behavioral ecologists to determine the presence of carotenoid pigments in animal tissues. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Springer, v. 57, p.391-397, 2005.

MANTUANO, A. et al. Elemental changes in hemolymph and urine of *Rhodnius prolixus* induced by in-vivo exposure to mercury: A study using synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 71-72, p. 127–130, 2012.

MARTINS, L.P; CASTANHO, R.E; CASANOVA, C; CARAVELAS, D.T; FRIAS, G.T; RUAS-NETO, A.L; ROSA, J.A. Rupestrian triatomines infected by Trypanosomatidae, collected in Quaraí, Rio Grande do Sul, 2003. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39: p. 198–202, 2006.

MENDONÇA, J. V.; Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. **Zootaxa**, v.4107, n.2, p. 239–254, 2016. ISSN 1175-5326 (Print edition). DOI: <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4107.2.6>.

OLIVEIRA, J.P. et all. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro por técnicas de microscopia e tomografia eletrônica. V Encontro Científico de Física Aplicada. **Blucher Physics Proceedings**, v.1, n. 2, p. 25-26, September, 2014. DOI: <http://doi.org/10.5151/phypro-ecfa-013>.

OMS. **Doenças de Chagas**: Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. Rio de Janeiro: PANAFTOSA – VP/OPAS/OMS, 2009. 92p. (Série de Manuais técnicos, 12, PAHO/HSD/CD/539.09).

PÊSSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 143 – 177.

RABINOVICH, J. E.; LEAL, J. A.; FELICIANGELI, D. P. Domiciliary biting frequency and blood ingestion of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera, Reduviidae). in Venezuela. **Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73 p. 272 – 283, 1979.

RAMALHO, T.C, FREITAS, M.P; CUNHA, E.F.F. **Chemoinformatics**: directions toward combating neglected diseases. Amsterdam: Bentham ebooks, 2012. 199p.

RASSI, A.; RASSI, A. J.; LITTLE, W.C. Chagas heart disease. **Clinical Cardiology**, v.23, p.883 – 889, 2000.

ROSA, J.A. Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de 1ºe de 5º estádios de *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) e de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Parasitologia)- São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1995.

ROSA, J.A.; BARATA, J.M.S. Aspectos morfológicos de abdômen de ninfas de 5º estágio de seis espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) por microscopia óptica. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v.18 n. 2 p. 249 – 270, 1997.

ROSA, J. A. et al. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3478 p. 62– 76, 2012.

SALVATELLA, R. et al. Ecology of *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae) in wild and peridomestic environments of Uruguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.90, n. 3 p. 325–328, 1995.

SCHMUNIS G. A; DIAS J.C. Health care reform, decentralization, prevention and control of vector-borne diseases. **Caderno de Saúde Pública**, v.16, Supl. 2, p.117-23, 2000.

SHERLOCK, I. A., SERAFIM, E. M., *Triatoma lenti* sp. N., *Triatoma pessoai* sp. N. e *Triatoma bahiensis* sn. N. do Estado da Bahia, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 67 sup. 2 p. 75–92, 1967.

SILVA, R. A.; BARBOSA, G. L.; RODRIGUES, V. L. C. C. Epidemiological Surveillance of Chagas disease in the State of São Paulo, Brazil, 2010-2012. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em São Paulo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde [Internet]**. Brasília, v.23, n. 2, p. 259-267, abr-jun 2014.

SILVEIRA A. C; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, pp. 52–63, 2011.

SILVEIRA, A. C. “O inquérito triatomínico (1975–1983),” **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, supl. 2, p. 26–32, 2011.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle de transmissão vetorial da doença de Chagas. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 5 – 28, 1994.

SOLAYMAN, M. D. Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins. Comprehensive Review. Institute of Food Technologists®, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.15, p. 219-233, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12182>.

STENDEL, M. et al. Characterization of Trypanosoma cruzi isolated from humans, vectores, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.60, n.1, p.25–32, 2008.

TSAI, W. T.; HASSAN, A.; SARKAR, P.; CORREA, J.; METLAGEL, Z.; JORGENS, D. M. et al. From Voxels to Knowledge: A Practical Guide to the Segmentation of Complex Electron Microscopy 3D-Data. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, v.90, e51673, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3791/51673>.

VILLELA, G.; MAGALHÃES, M. R. Pigmentos de Triatomídeos Brasileiros. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.73, n. 1/2, p. 135-137, 1975.

VINHAES, M.C, DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.16, supl.. 2, p.7 – 12, 2000.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet Updated March 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 29 abr. 2013.

WHO. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet Updated March 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 30 maio 2016.