

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:



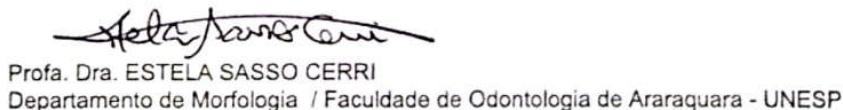
Prof. Dr. JOAO ARISTEU DA ROSA
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



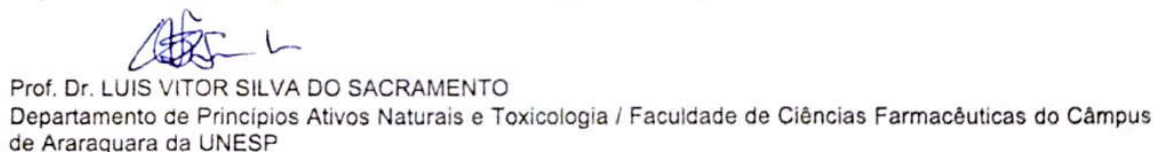
Profa. Dra. LÍVIA MARIA FUSARI
Departamento de Hidrobiologia / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR



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).

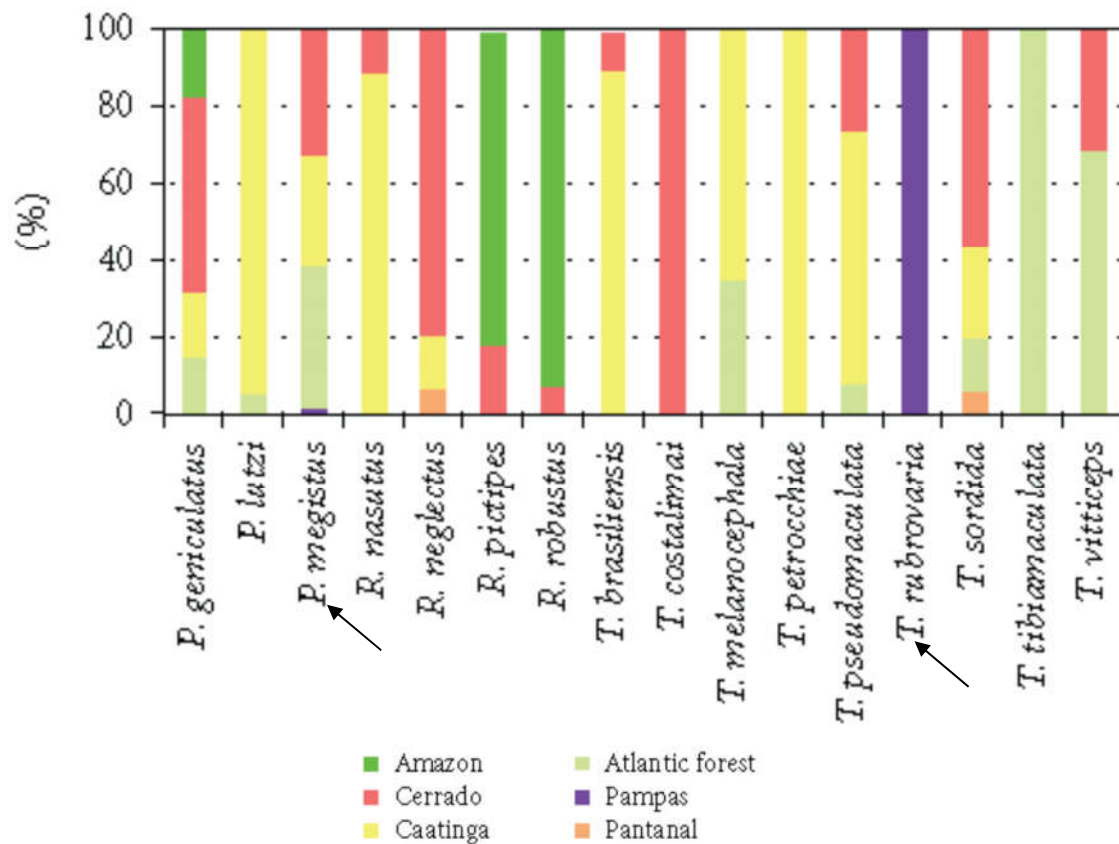


Figura 1. Ocorrência relativa de 16 espécies de triatomíneos em diferentes biomas (Gonçalves et al., 2011).

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).

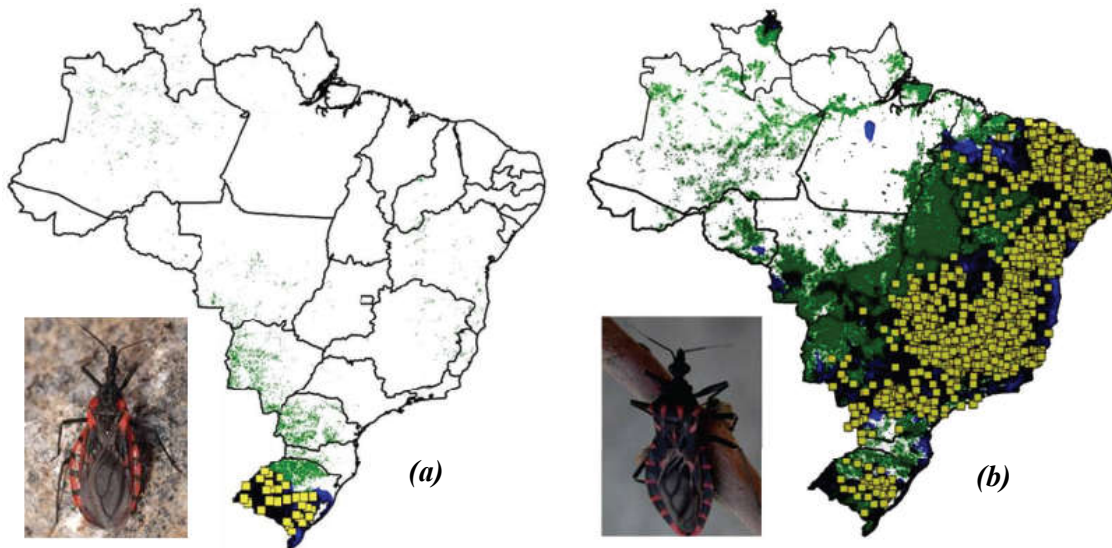


Figura 2. Distribuição geográfica de *T. rubrovaria* (a) e *P. megistus* (b) (adaptado de Gonçalves et al., 2011) no Brasil.

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).

2. Revisão da Literatura

2.1. A importância do estudo do conexivo nos *Triatominae*.

Podem-se citar trabalhos que fazem referência sobre o estudo do conexivo como Pessoa 1969, Gonçalves 1985, Juberg 1986 e Rosa & Barata 1997, em que é descrito a disposição e coloração do conexivo de seis espécies de triatomíneos. Outro trabalho importante para esse estudo foi o de Villela, 1975 que identificou dois pigmentos (eritropterina e xantopterina) no conexivo de *Ponstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma brasiliensis*.

Em particular, *Triatoma* se reveste de importância epidemiológica, devido à maior parte de espécies vetoras de *T. cruzi* ao homem pertencerem a esse gênero, como *T. infestans*, que era considerada até 1970 como principal espécie domiciliada (Vinhaes & Dias, 2000). Em casos como esse, os aspectos morfológicos e bioquímicos podem nortear e auxiliar o entendimento acerca de caracteres taxonômicos e/ou fisiológicos das espécies de triatomíneos, pois as mesmas estão inseridas em uma complexa cadeia epidemiológica em que os vetores estão associados a populações do parasita *T. cruzi*, assim como a diferentes reservatórios vertebrados incluindo os humanos.

2.2. Constituição da hemolinfa dos *Triatominae*:

A constituição elementar da hemolinfa nos triatomíneos contém essencialmente Cl, K, Ca, Fe e Zn, (Manturano et al, 2012).

Os triatomíneos, tem em sua estrutura um exoesqueleto formado por β -quitina (Imbert-Palafox, 2013).

A quitina é um polímero linear com unidade repetitiva de dissacarídeos formados por 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose unidos por ligação glicosídica (Figura 03). A quitina pode ser encontrada como estruturas polimórficas como α -, β - e γ -quitina. A α -quitina, assim como a β -quitina é encontrada na formação do exoesqueleto de artrópode, sendo nesse caso associadas a proteínas, materiais orgânicos ou ambos (Campana-Filho, 2007).

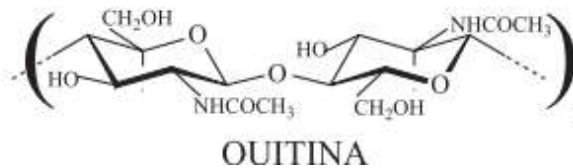


Figura 3. Conformação molecular de quitina.

2.3. Constituintes do sangue humano:

Os triatomíneos são hematófagos, se alimentam de sangue humano e de animais silvestres e domésticos, Silva, 2014 coletou cerca de 2500 exemplares de *P. megistus* em peridomicílio no estado de São Paulo entre os anos de 2010 e 2012, dos quais cerca de 23% estavam infectados por *T. cruzi*. Desses insetos, três deles revelaram hábitos alimentares por sangue humano e o restante por sangue de marsupiais e roedores.

No sangue humano encontram-se diferentes concentrações de elementos químicos. São encontrados no sangue humano, elementos como Na, K, P, Ca, Mg, Cu, Zn, Se e albumina, Fe, Sr, Mo, Cs e Ag. O Fe é trocado rapidamente entre o soro e os eritrócitos em condições de redução anaeróbias, já Mo e Ag não tem

função biológica conhecida, enquanto o Cu e o P influenciam no estrógeno em pessoas do sexo feminino (HASEGAWA, 2001).

Os minerais encontrados no organismo humano, são divididos em três grupos com base na sua importância para o funcionamento do corpo humano.

Elementos maiores (macro nutrientes), oligoelementos (macro nutrientes) e elementos ultra-traço (micro nutrientes). Os principais elementos encontrados são Na, K, Ca, Mg, P, S e cloro necessários em concentrações maiores que 50 mg/d, os oligoelementos são o Fe, I, F, Zn, Se, Cu, Mn, Cr, Mo, Co, Ni, necessários em concentrações menores que 50 mg/d. Já os elementos ultra-traços ou micronutrientes tais como Al, As, Ba, Bi, B, Cd, Cs, Ge, Hg, Li, Pb, Rb, Si, Sm, Sn, Sr, Tl, Ti, W são encontrados geralmente em menos de 1µg/g (Solayman, 2016).

2.4. Microscopia Eletrônica:

No estudo de materiais em escala nanométrica, como nanopartículas, são utilizados dois tipos de técnicas de microscopia, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A microscopia óptica não funciona para o estudo de nanomateriais por que sua resolução é da ordem de 200nm, definida pelo critério de Rayleigh.

A microscopia eletrônica de varredura se mostrou indispensável em pesquisas com materiais biológicos, contribuindo para a classificação e taxonomia de insetos e fungos e em pesquisas de estrutura de superfícies biológicas. Por fornecer imagens em aumento de até 100 000x (resolução de até 1nm) e com alta profundidade de campo, a topografia superficial de objetos sólidos pode ser observada com facilidade (Galletti, 2003).

A microscopia de duplo feixe (FIB; Focus Ion Beam), é uma técnica de microscopia eletrônica mais complexa em que se utiliza um feixe de elétrons e um feixe de íons, controlados de forma independente, para o estudo do objeto. O feixe de elétrons é similar ao utilizado em microscopia eletrônica de varredura (Echlin, 2009; Williams, 2009), fornecendo as características morfológicas da amostra. Já o feixe de íons é utilizado para cortar partes da amostra visando seu estudo interno. Assim, a microscopia de duplo feixe permite o estudo em várias camadas alvos os

tipos de estruturas químicas e biológicas, bem como a estrutura dos pigmentos e seus aglomerados. Utilizando softwares especiais esta técnica também permite a realização de reconstrução 3D do objeto, fornecendo um conhecimento mais aprofundado quando comparado a outros tipos de microscopia, dando subsídios de validação e criação de novas moléculas e estruturas químicas/biológicas combinando FIB e MET (Tzai, 2014).

A microscopia eletrônica de transmissão, pela característica do feixe de elétrons atravessar a amostra, possibilita a identificação de estruturas tridimensionais no plano. Ela é amplamente utilizada nas ciências de materiais na caracterização de nanoestruturas e nanopartículas, podendo obter imagens de planos atômicos que auxiliam a identificação de estruturas cristalinas, nanopartículas e nanoestruturas (Oliveira, 2014).

Neste projeto utilizou-se técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) para obter imagens que proporcionem informações a respeito da textura das amostras do conxivo de *P. megistus*, *T. dimidiata*, *T. lenti* e *T. rubovaria*.

2.5. Espectroscopia por Dispersão em Energia de raio-x (EDS):

A composição química dos materiais foi estudada pela técnica de espectroscopia por dispersão em energia de raio-X (EDS) realizada dentro do microscópio eletrônico de varredura (MEV), no microscópio de duplo feixe e no microscópio eletrônico de Transmissão (MET) .

A identificação de metabólitos necessita de instrumentação sofisticada, que concilie sensibilidade, seletividade e rapidez (LEI, 2011), justificando assim o uso das técnicas acima citadas, que permitem a identificação de milhares de ppm de um elemento presente na amostra.

Além de uma possível contribuição que o presente estudo tem em relação a marcadores taxonômicos e análises filogenéticas, é também válido mencionar sua possível importância para a Vigilância Entomológica. A Vigilância Entomológica leva em conta fatores relacionados aos artrópodes que influenciam no padrão de transmissão da doença, o que permite a realização de intervenções eficazes para evitá-la ou abortá-la (Gomes, 2002).

A existência de poucos trabalhos envolvendo o estudo dos conxivos chama bastante atenção, assim faz-se necessário o estudo detalhado sobre suas características estruturais, morfológicas e bioquímicas (Rosa, 2017).

Sendo assim, a determinação de metabólitos de triatomíneos poderá contribuir para fornecer informações que podem culminar em medidas para controlar ou reduzir a abundância de vetores.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral:

Desenvolver e empregar metodologias experimentais para buscar esclarecimentos sobre os constituintes químicos encontrados nos triatomíneos.

3.2. Objetivos Específicos:

- Estudar os constituintes do conexivo de exemplares adultos de *P.megistus*, *T. dimidiata*, *T. lenti* e *T. rubrovaria*.
- Executar análises dos constituintes do conexivo por meio de microscopia eletrônica de varredura e de microscopia eletrônica de transmissão.
- Executar análises de aglomerados e nanopartículas isoladas, por meio de EDS.
- Proceder análise qualitativa de nanopartículas e elementos químicos encontrados no conexivo de *P.megistus*, *T. dimidiata*, *T. lenti* e *T. rubrovaria*.

4. Material e Métodos

4.1. Obtenção dos exemplares de triatomíneos

Os exemplares de *P. megistus* utilizados neste projeto foram oriundos das colônias denominadas CTA 015 (Sítio Carandá, Araraquara/SP, 11/04/00), CTA 026 (Carmo do Paraíba e Lagoa Formosa/MG, domicílio, 11/02/85), CTA 030 (Ortigueira/PA, peridomicílio, 11/02/85), e CTA 033 (Rio Grande do Sul, Brasil, 06/04/01), e CTA 032 (Varginha/MG, doado por Carlos Frederico, E. N. S., 22/10/00).

Os exemplares de *T. lenti* foram obtidos da colônia denominada CTA 212 (Macaúbas/BA, Cana Brava, peridomicílio, galinheiro, 29/09/09).

Os exemplares de *T. rubrovaria* foram retirados das colônias denominadas CTA 162 (Quaraí/RS, 26/03/02), CTA 169 (Caçapava do Sul/RS – Guaritas, 19/12/90), CTA 231 (Quaraí/RS, 30/07/08), CTA 232 (Município de Alegrete/RS, 20/01/12), CTA 233 (Município de Alegrete/RS, 20/01/12) e CTA 234 (Município de Alegrete/RS, 20/01/12).

Os exemplares de *T. dimidiata* foram obtidos da colônia denominada CTA 260, (América Central/ Laboratório de Medicina Tropical/RJ, 18/08/2013, doado por Cleber Galvão IOC/RJ).



Figura 4. Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara – SP.

4.2. Manutenção e uso de colônias de triatomíneos

Os exemplares que foram utilizados neste trabalho são mantidos em colônias no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Foram escolhidos aleatoriamente exemplares adultos mortos das colônias referidas.

4.3. Caracterização de substâncias e estruturas encontradas no conexivo dos triatomíneos.

4.3.1. Preparação e separação do conexivo de *P. megistus*, *T. dimidiata*, *T. lenti* e *T. rubrovaria*.

Os triatomíneos foram retirados recém mortos das colônias e colocados em estufa a 34 C por uma semana, ou até que estivessem livre de umidade.

Após secos, o conexivo dos triatomíneos era separado do corpo com o auxílio de uma lupa, tesoura inoxidável de ponta reta e pinça reta pequena.

4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os conexivos foram colocados em cubos de aço inox e metalizados com carbono para diminuir o carregamento atômico, fazendo com que a imagem obtida no MEV fosse mais nítida.

Para melhor compreensão dos dados elementares apresentados anteriormente, foram feitas algumas análises da camada superficial externa do conexivo de *Ponstrongylus megistus*, *Triatoma lenti*, *Triatoma rubrovaria* e *Triatoma dimidiata*, por meio de microscopia eletrônica de varredura utilizando (FEI; Helios Nanolab 600i) equipado com detector de EDS (energy dispersive x-ray detector; Oxford instruments, modelo X max N50, como ilustrado na Figura 5) (Tzay et al, 2014).

No laboratório de microscopia avançada do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, *P. megistus*, *T. rubrovaria*, *T. lenti* e *T. dimidiata*, foram analisadas a camada superficial externa e interna com e sem pigmento do conexivo.



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.

O alvo de estudo do conexivo foram os pigmentos, embora as características morfológicas das camadas externas e internas do conexivo tenham sido analisadas, para que fosse demonstrado a diferenciação entre elas. Essa análise possibilitou a observação da morfologia das estruturas bem como a composição de elementos químicos constituintes dos pigmentos do conexivo das duas espécies.

Para obtenção de imagens dos conexivos por meio de microscopia de varredura, foram utilizadas magnificações de 200, 650 e 3500 vezes a 2 kV e 11 pA. Para as análises de EDS, utilizou-se uma magnificação de 1000 vezes, voltagem de 10 kV e corrente eletrônica de 43 pA. Foram feitos orifícios por meio de canhão de íons (FIB), medindo 30 X 37 μm e profundidade de 10 μm foram realizados com magnificação de 2000 vezes a 16KV e 11nA.

Após analisadas as estruturas e a morfologia topográfica dos conexivos, foram analisados no EDS, inserido no Microscópio de varredura.

4.3.3. *Extração do pigmento do conexivo de P. megistus, T. dimidiata, T. lenti e T. rubrovaria.*

Os triatomíneos foram retirados da colônia recém mortos, e colocados para secagem em estufa a 34 C por uma semana ou até que estivessem totalmente livres de umidade.

Para essa análise, o conxivo foi separado do triatomíneo com tesoura de aço inoxidável, a porção pigmentada interna do conxivo de quatro exemplares de cada espécie estudada foi raspada com auxílio de um bisturi e álcool isopropílico 100%. Em seguida foram armazenados em micro tubos e congelados a -20 °C.

4.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para o estudo das amostra por microscopia de transmissão os materiais forma suspndidos em álcool isopropílico e deixado em banho ultrassônico por 3 minutos. Após, uma gota da suspensão foi depositada sobre uma grade de cobre recoberta com carbono especial para observação por MET.

Para obtenção das imagens, foram utilizadas o Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips CM200 em magnificações diversas, dependendo das condições e das estruturas em escalas nanométricas a 120 Kv (Figura 6).



Figura 6. Microscópio eletrônico de transmissão Philips CM200 - Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Química/UNESP/Araraquara.

Os elementos químicos presentes nas amostras estudadas por MET foram analisados por EDS (Bruker; modelo Xflash 6TI30), com janela de 30 mm², inserido no próprio microscópio. Uma vantagem da técnica de EDS no MET é a menor interação do feixe com a amostra permitindo melhor resolução lateral, que é importante para o estudo de nanoestruturas. Em alguns casos, a técnica de EDS não permitiu uma contagem elevada dos elementos presentes nos materiais e, quando pertinente, utilizamos a técnica de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) para a visualização de um conjunto de planos atômicos presentes nos materiais.

Para análise dos planos atômicos, foi calculada as distâncias interplanares a partir de imagens de alta resolução no software ImageJ (grátis).

Os aglomerados foram mensurados a partir das imagens produzidas por MEV, a partir de 200 partículas a partir do software ImageJ (grátis), descrevendo seu tamanho e desvio padrão.

5. Resultados

5.1. Microscopia eletrônica de varredura.

Foram examinadas amostras do conexivo de *P. megistus*, *T. rubrovaria*, *T. lenti* e *T. dimidiata*, por meio de microscópio eletrônico de varredura. As imagens observadas da porção pigmentada do conexivo de *P. megistus* mostraram a presença de estruturas esféricas ou aglomerados de diversos tamanhos (Figura 7).

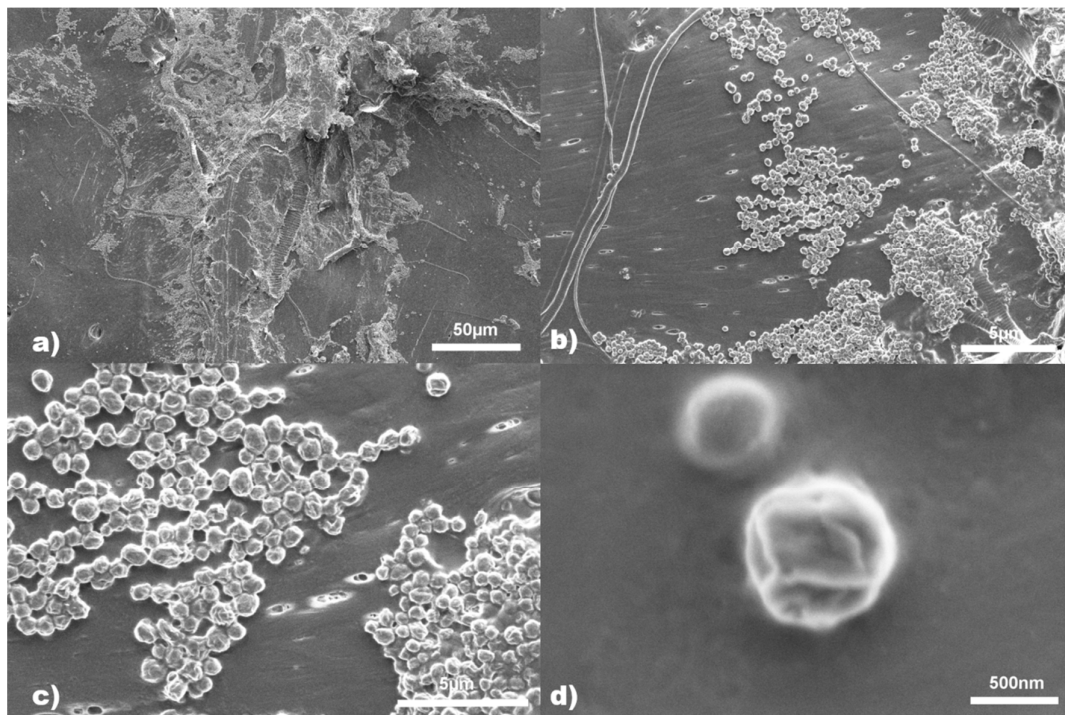


Figura 7. Imagem de porção vermelha do conexivo de *P. megistus* por meio de microscopia eletrônica de varredura, com aumentos de 650, 3500, 10000 e 65000 vezes, respectivamente. a) Localização dos aglomerados. b,c e d) Estruturas esféricas.

As imagens por MEV, mostram estruturas esféricas mesmo na porção não pigmentada de *P. megistus*, essas estruturas aparecem na porção preta em menor número do que na porção pigmentada (Figura 8).

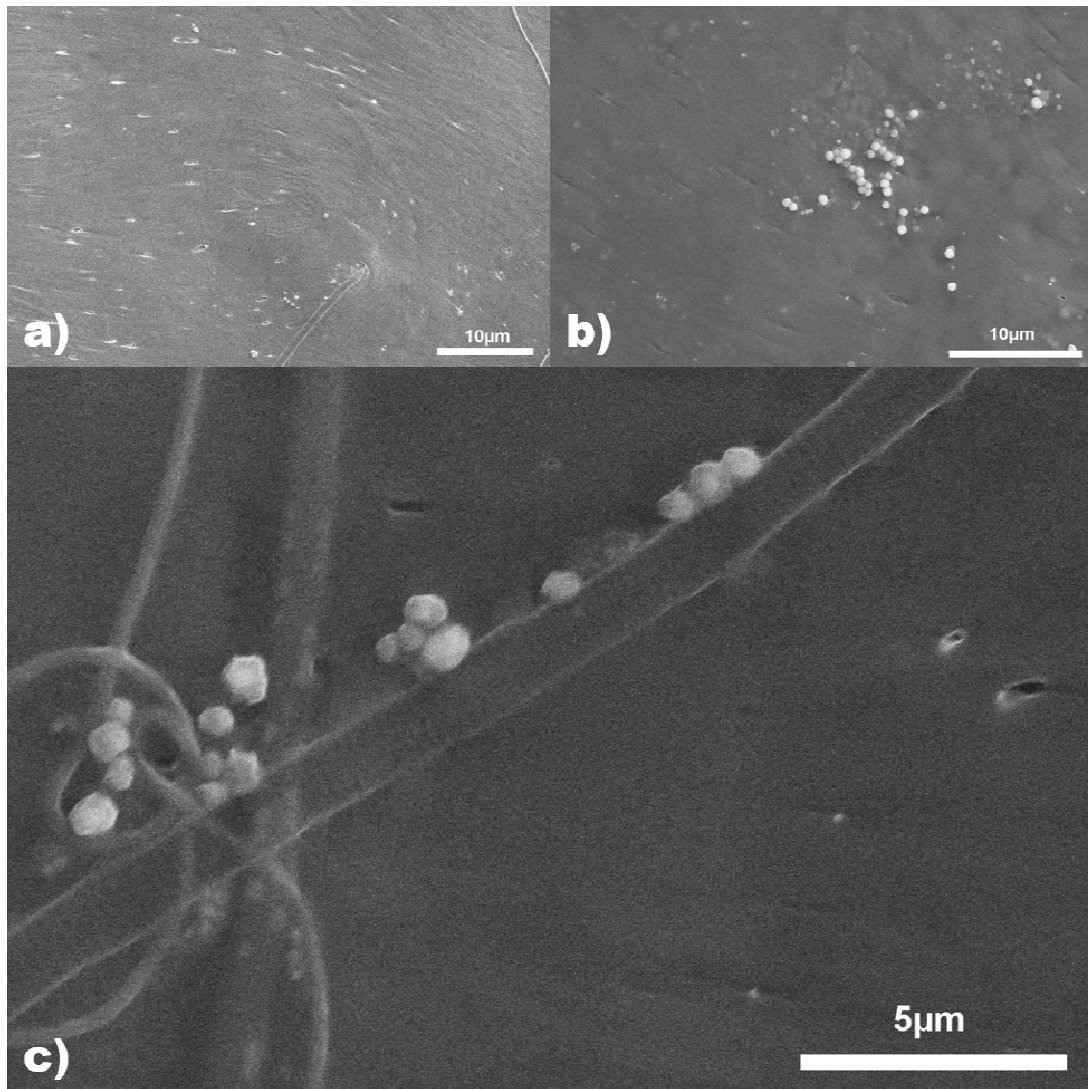


Figura 8. Imagem da porção preta do conexivo de *P. megistus* por meio de microscopia de varredura, com aumentos de 650, 3500 e 10000 vezes respectivamente. a) Localização dos aglomerados. b e c) Estruturas esféricas ou aglomerados.

A título de comparação foram feitas análises da porção externa do conexivo de *P. megistus*, tanto na porção pigmentada quanto da porção não pigmentada. As imagens obtidas não revelaram as estruturas esféricas encontradas na parte interna do conexivo (Figura 9 e 10).

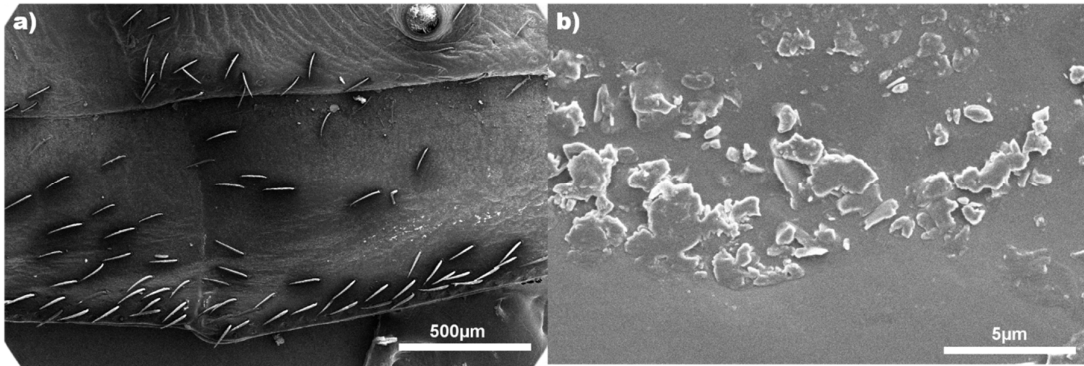


Figura 9. Imagem da porção externa da porção vermelha do conexivo de *P. megistus* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de 100 e 10000 vezes respectivamente.

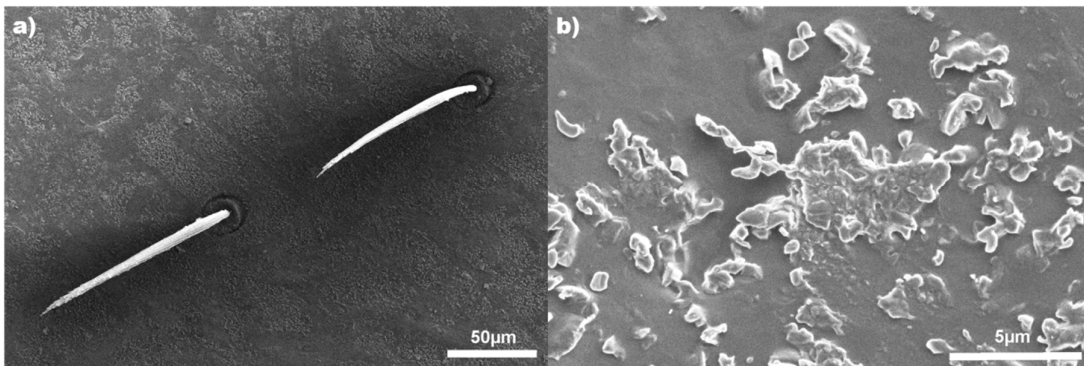


Figura 10. Imagem da porção externa preta do conexivo de *P. megistus* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de 650 e 10000 vezes respectivamente.

Em *T. rubrovaria* foi encontrada uma grande concentração de esferas na parte interna do conexivo, mas somente na porção vermelha (Figura 11). Na porção preta da parte interna do conexivo o relevo das imagens se mostraram semelhantes à parte externa do conexivo tanto na porção vermelha externa quanto na porção preta externa (Figura 12,13 e 14).

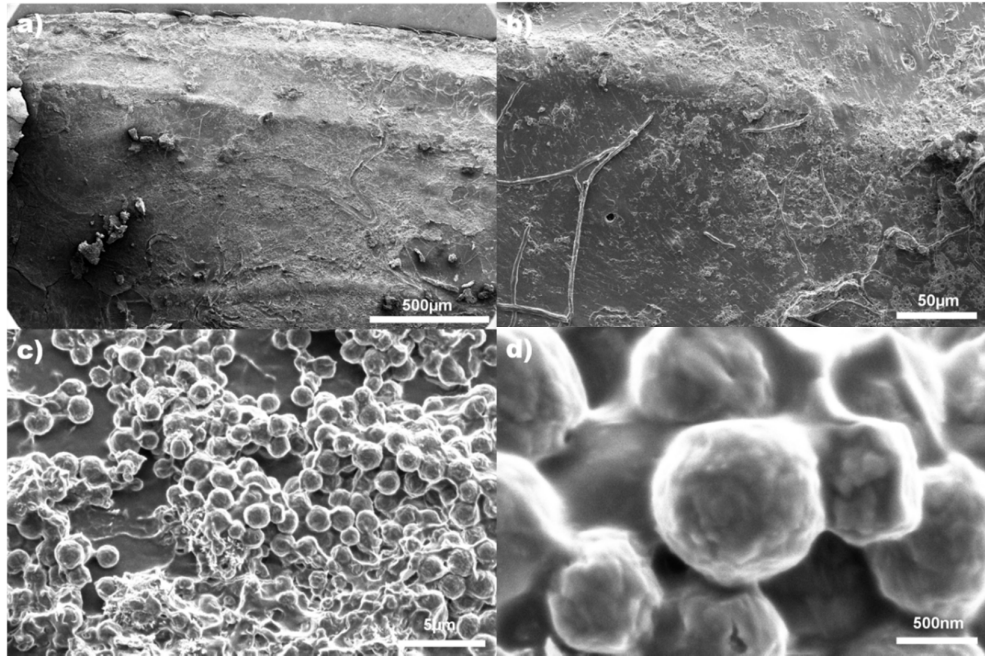


Figura 11. Imagem da porção interna vermelha do conexivo de *T. rubrovaria* por meio de microscopia eletrônica de varredura por FIB, com aumentos de 100, 650, 10000 e 65000 vezes respectivamente. a e b) Localização dos aglomerados. c , d) estruturas esféricas.

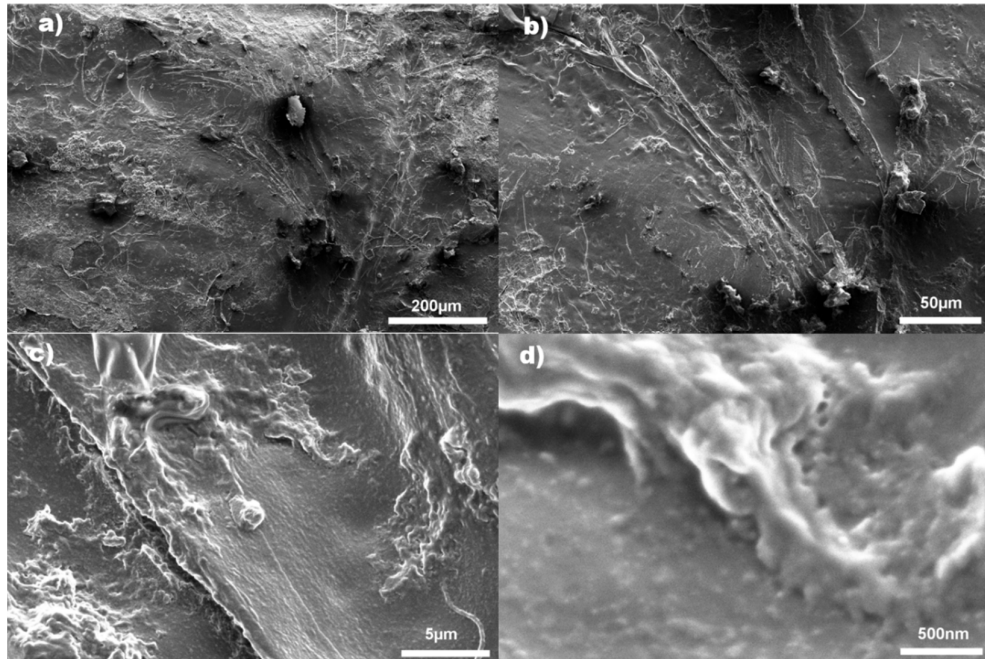


Figura 12. Imagem da porção interna preta do conexivo de *T. rubrovaria* por meio de microscopia eletrônica de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 10000, d) 65000 vezes.

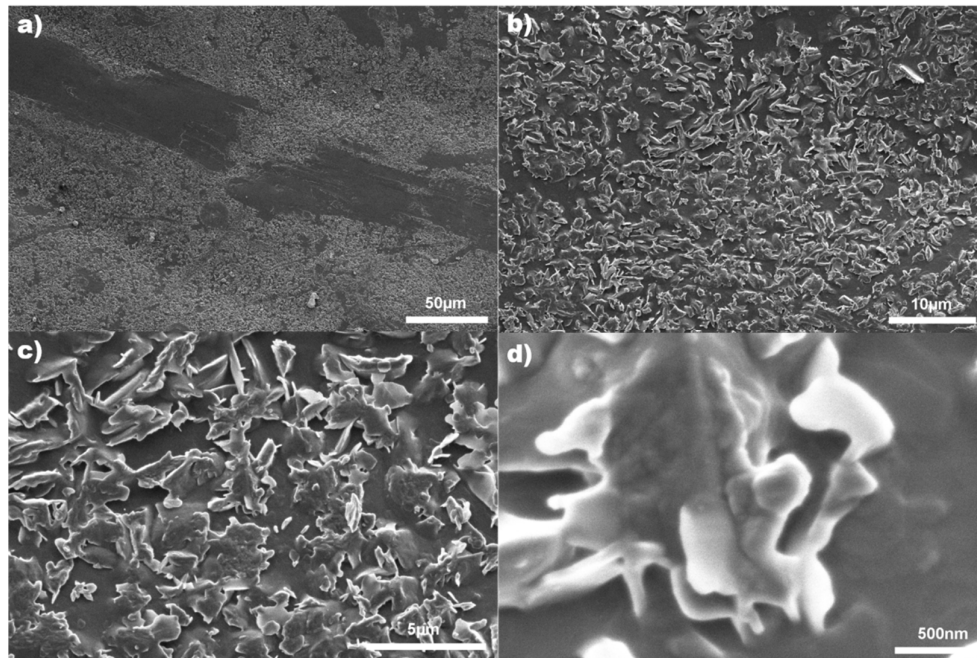


Figura 13. Imagem da porção externa vermelha do conxivo de *T. rubrovaria* por meio de microscopia de varredura por FIB, com magnificações de a) 650, b) 3500, c) 10000, d) 65000 vezes.

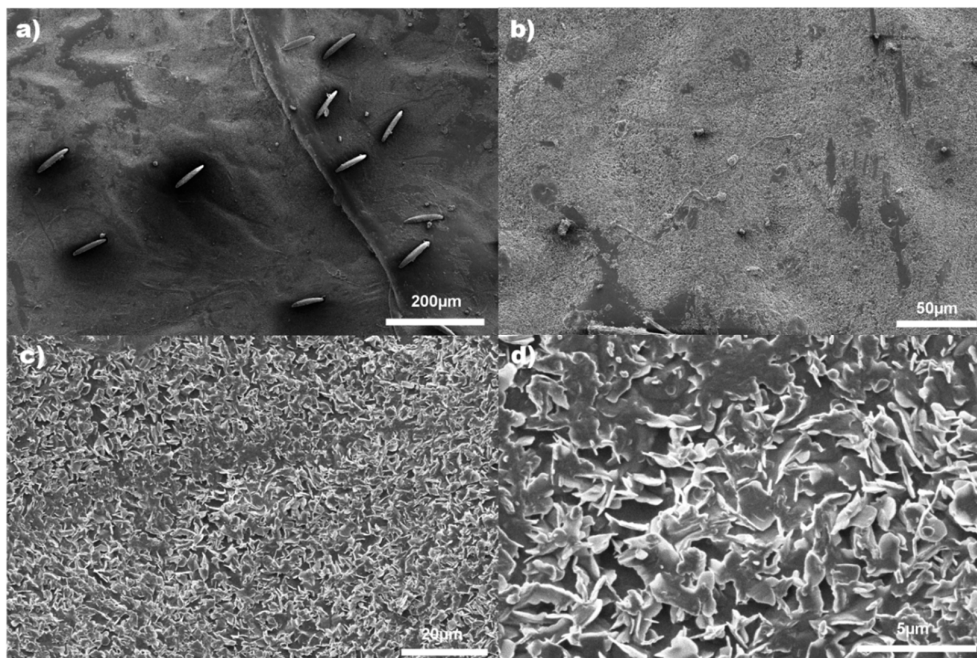


Figura 14. Imagem da porção externa preta do conxivo de *T. rubrovaria* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.

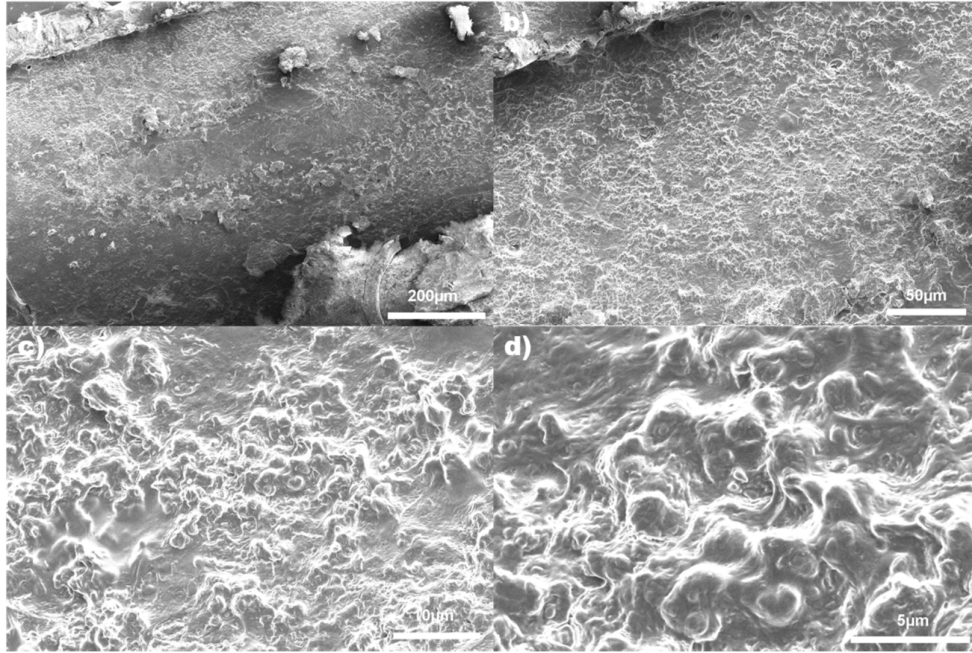


Figura 15. Imagem da porção interna amarela do conexivo de *T. lenti* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.

Em *T. lenti* foram encontradas esferas na porção interna pigmentada, essas esferas encontram-se ancoradas no assoalho da amostra e visualizadas apenas na magnificação de 10.000X, (Figura 15). As esferas não foram encontradas na porção interna preta, nem na parte externa do conexivo (figura 16, 17, 18).

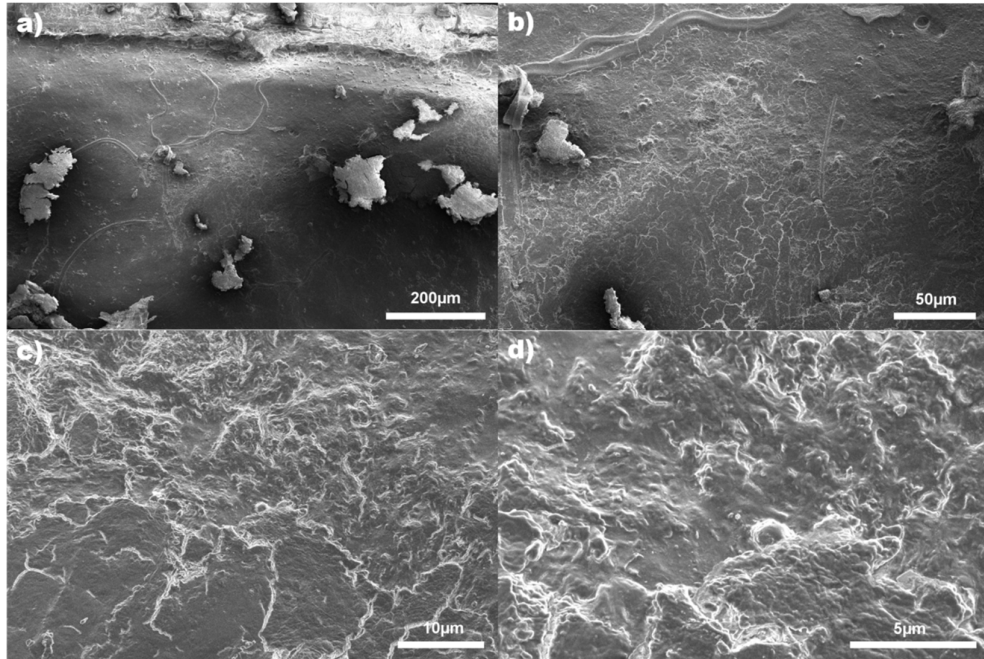


Figura 16. Imagem da porção interna preta do conexivo de *T. lenti* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.

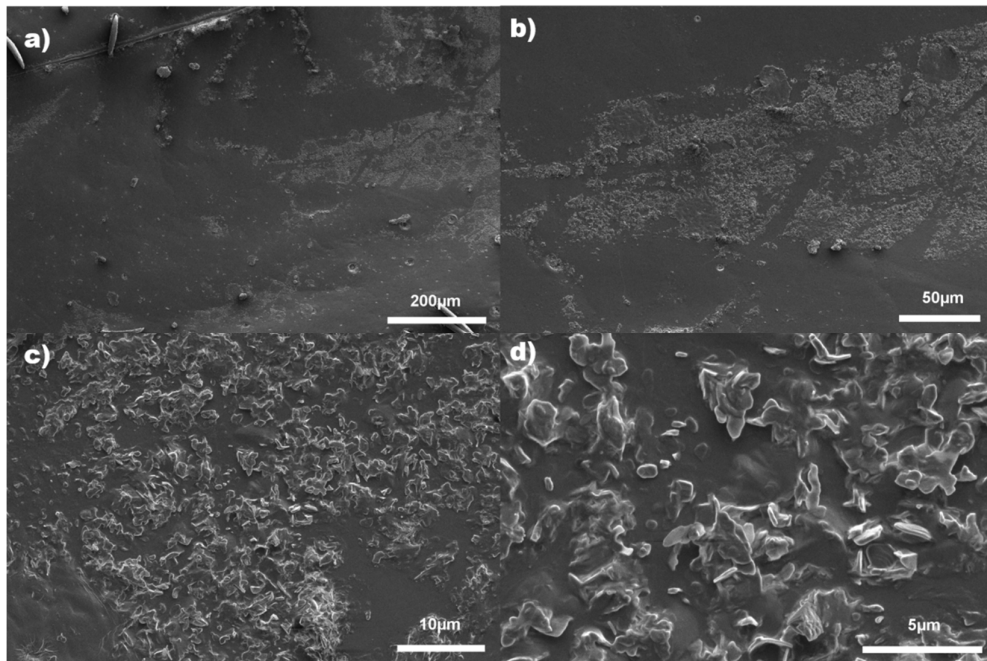


Figura 17. Imagem da porção externa amarela do conexivo de *T. lenti* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.

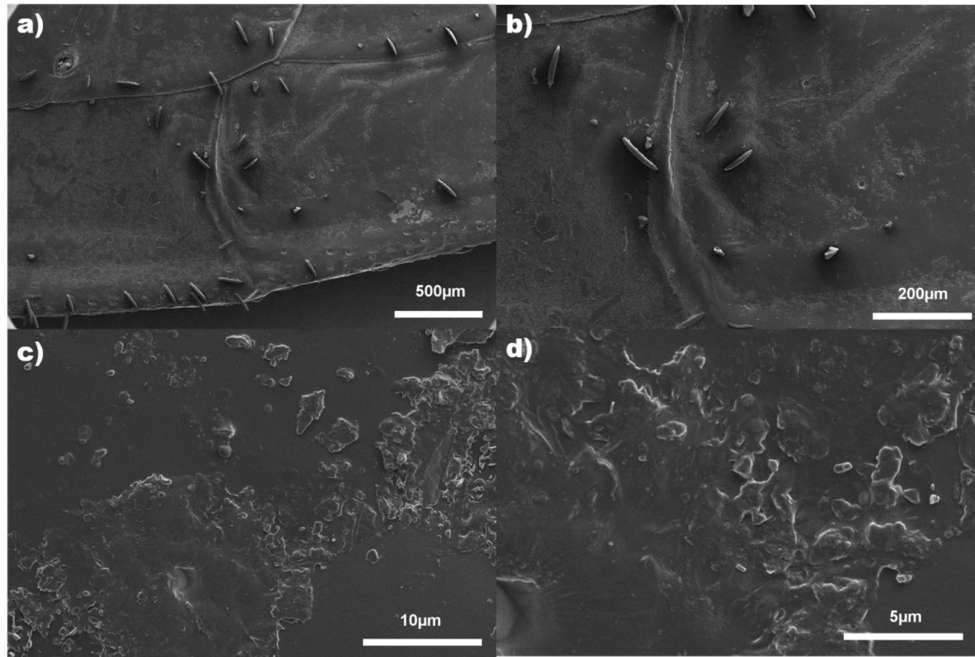


Figura 18. Imagem da porção externa preta do conxivo de *T. lenti* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.

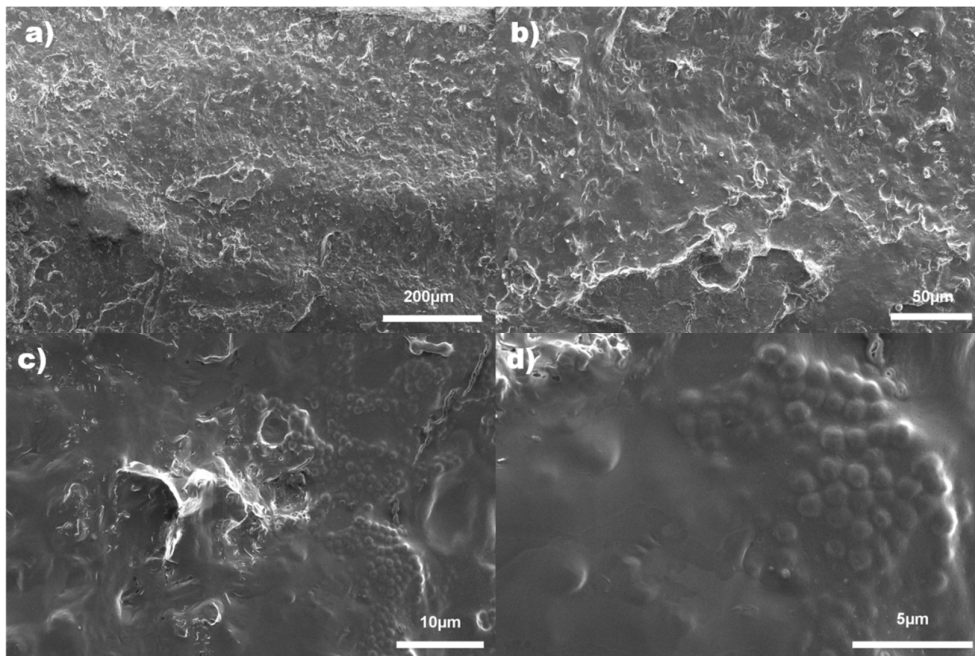


Figura 19. Imagem da porção interna amarela do conxivo de *T. dimidiata* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.

O mesmo ocorreu em *T. dimidiata*, onde foram encontradas esferas incrustadas somente na parte interna pigmentada do assoalho do conxivo (Figura 19), essas esferas ou aglomerados de nanopartículas não foram encontradas em nenhuma outra parte do conxivo seja interno ou externo (Figura 21, 21 e 22).

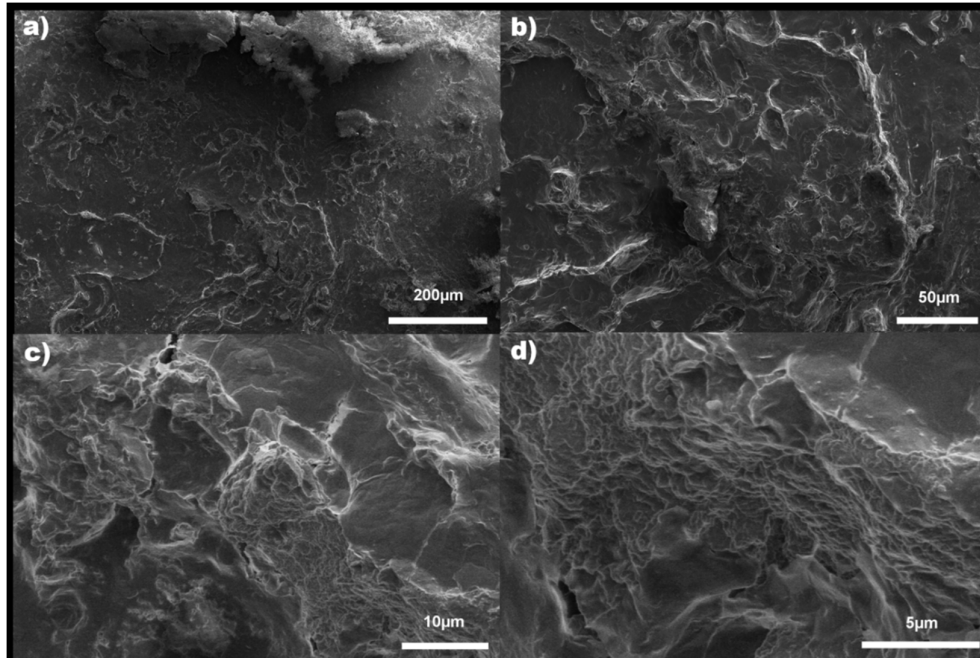


Figura 20. Imagem da porção interna preta do conxivo de *T. dimidiata* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.

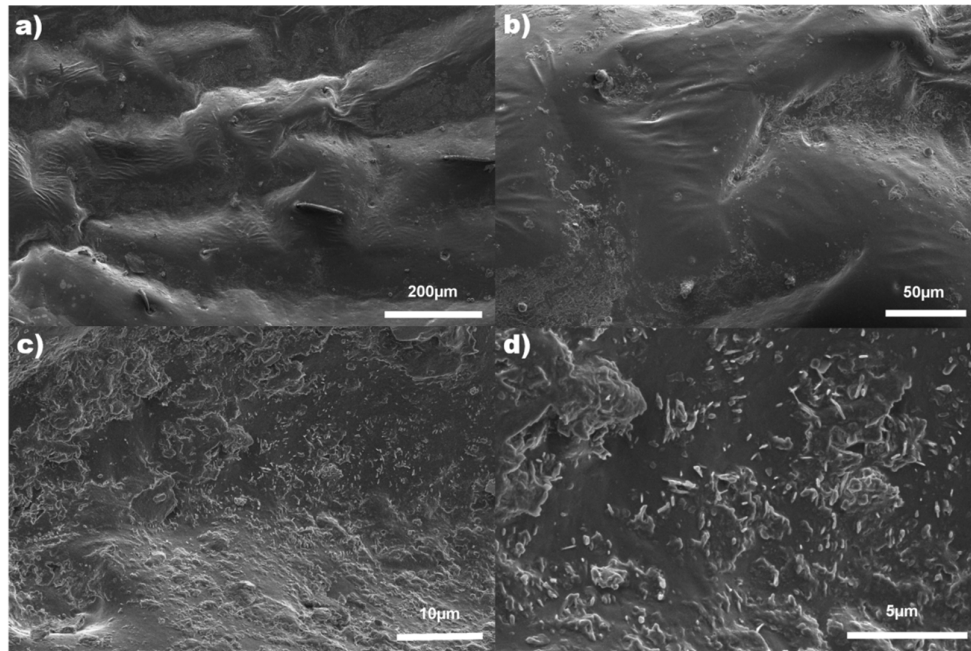


Figura 21. Imagem da porção externa amarela do conexivo de *T. dimidiata* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes.

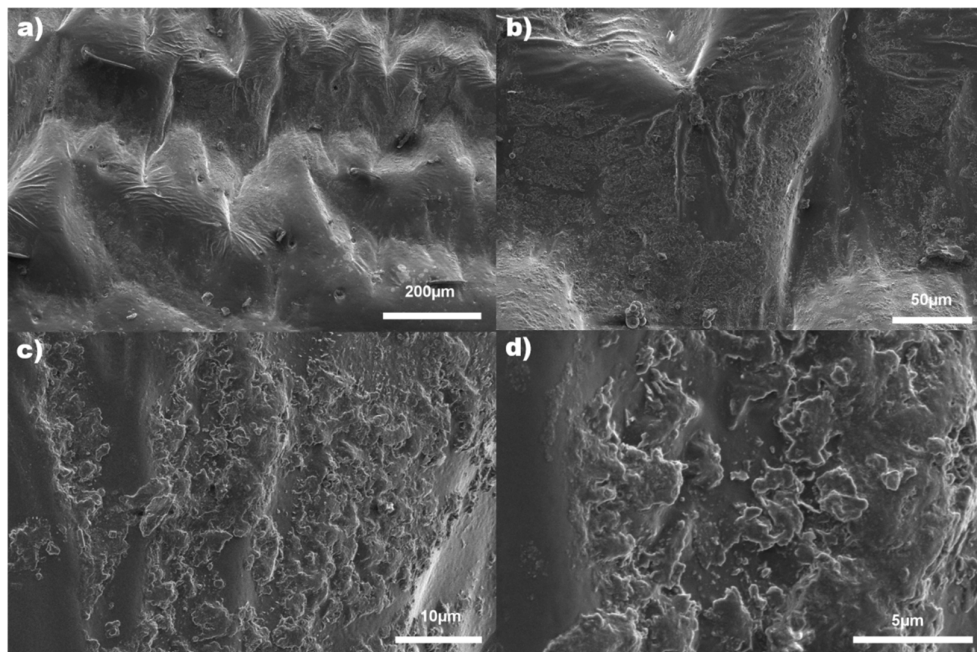


Figura 22. Imagem da porção externa preta do conexivo de *T. dimidiata* por meio de microscopia de varredura por FIB, com aumentos de a) 200, b) 650, c) 3500, d) 10000 vezes respectivamente.

Foram feitos orifícios por meio de íons de gálio, para verificar se haviam os mesmos elementos no interior da amostra (Figura 23 e 24).

Quando feito o EDS, tanto na porção pigmentada interna, quanto na porção não pigmentada interna, nota-se os mesmos elementos encontrados na superfície interna dos conexivos analisados anteriormente. Não foi possível realizar a análise com triatomíneos de pigmentação amarela, pois nessas espécies, havia um carregamento de elétrons muito grande, dificultando a visualização pela microscopia iônica, sendo impossível realizar o corte das camadas por meio de íons de gálio. O magnésio não pode ser detectado, pois a borda K- α de emissão de raios-X do Mg superpõe com a borda de emissão L- α do Ga.

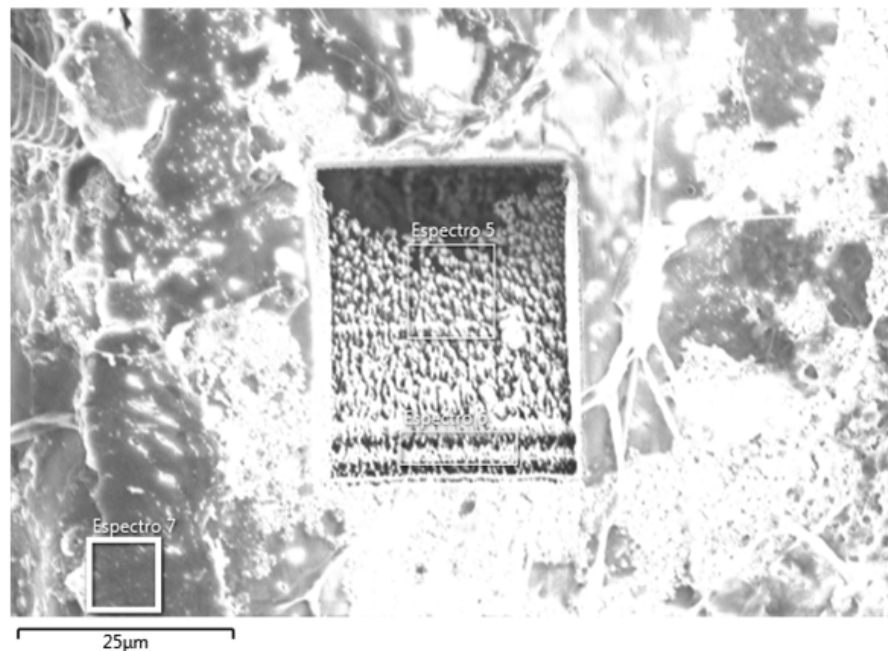


Figura 23. Imagem de orifício feito por íons de gálio, 30x37 μm , com profundidade de 10 μm da porção vermelha do conexivo de *T. rubrovaria* por meio de Microscopia de duplo feixe (FIB) (1000X, 10 KV e 43pA).

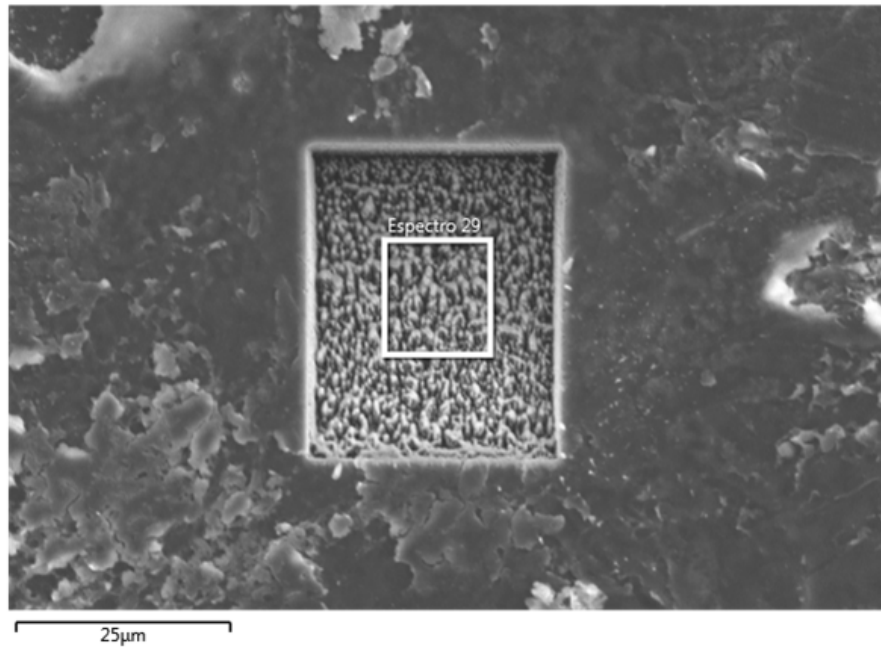


Figura 24. Imagem de orifício feito por íons de gálio, 30x37 μm , com profundidade de 10 μm da porção escura do conexivo de *P. megistus* por meio de Microscopia de duplo feixe (FIB) (1000X, 10 KV e 43pA).

Os resultados obtidos por EDS no MEV mostraram que todos os elementos encontrados na porção interna são também encontrados na externa do conexivo de *P. megistus*, *T. rubrovaria*, *T. lenti* e *T. dimidiata* seja na porção pigmentada ou não pigmentada. A diferença observada foi a presença de magnésio somente na porção interna das quatro espécies estudadas. Em *P. megistus*, além de todos os outros elementos encontrados no conexivo, pode-se notar a detecção de magnésio, tanto na porção pigmentada, quanto na porção não pigmentada. Em *T. rubrovaria*, *T. lenti* e *T. dimidiata*, a detecção de aglomerados só ocorreu na porção pigmentada (Tabela 1).

Tabela 1. Elementos químicos encontrados no conexivo de quatro espécies de Triatominae por meio de EDS/FIB.

	Conexivo Interno								Conexivo Externo							
	<i>P. meg</i>		<i>T. rub</i>		<i>T. len</i>		<i>T. dim</i>		<i>P. meg</i>		<i>T. rub</i>		<i>T. lent</i>		<i>T. dim</i>	
	P	Ø	P	Ø	P	Ø	P	Ø	P	Ø	P	Ø	P	Ø	P	Ø
Carbono	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Sódio	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Nitrogênio	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Oxigênio	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fósforo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Enxofre	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cloro	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Potássio	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Magnésio	X	X	X	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-

P=Com pigmento Ø= Sem pigmento

O tamanho das esferas ou aglomerados foram analisadas estatisticamente mostrando que *P. megistus* tem esferas com tamanho médio de 0,513 µm e desvio padrão 0,165 µm (Figura 25), em *T. dimidiata* essa média é de 0,938 µm com desvio padrão de 0,272 µm (Figura 26), em *T. lenti* a média foi de 0,366 µm e desvio padrão de 0,141 µm (Figura 27) e em *T. rubrovaria*, a média foi de 0,743 µm com desvio padrão em 0,238 µm (Figura 28).

Figura 25. Histograma do diâmetro (μm) de esferas/aglomerados de nanopartículas observadas em *P. megistus*.

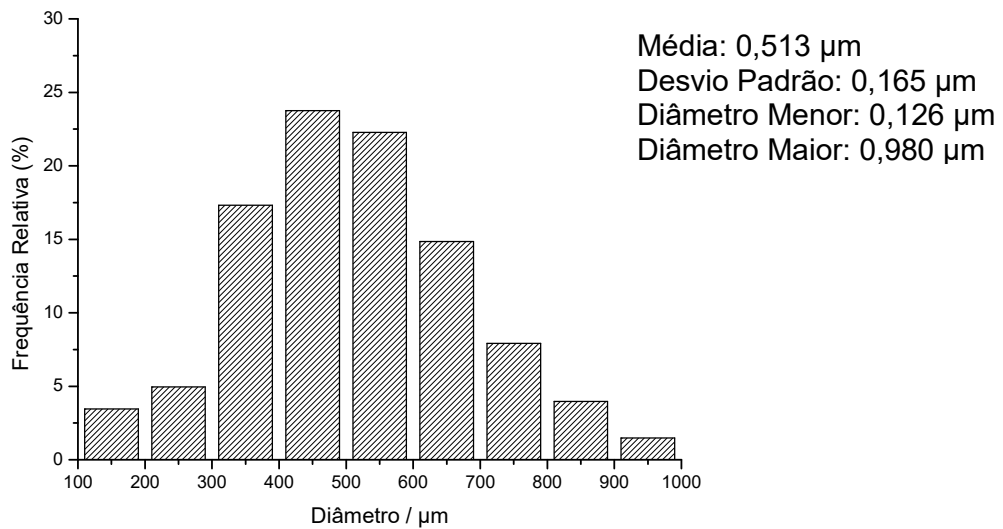


Figura 26. Histograma do diâmetro (μm) de esferas/aglomerados de nanopartículas observadas em *T. dimidiata*.

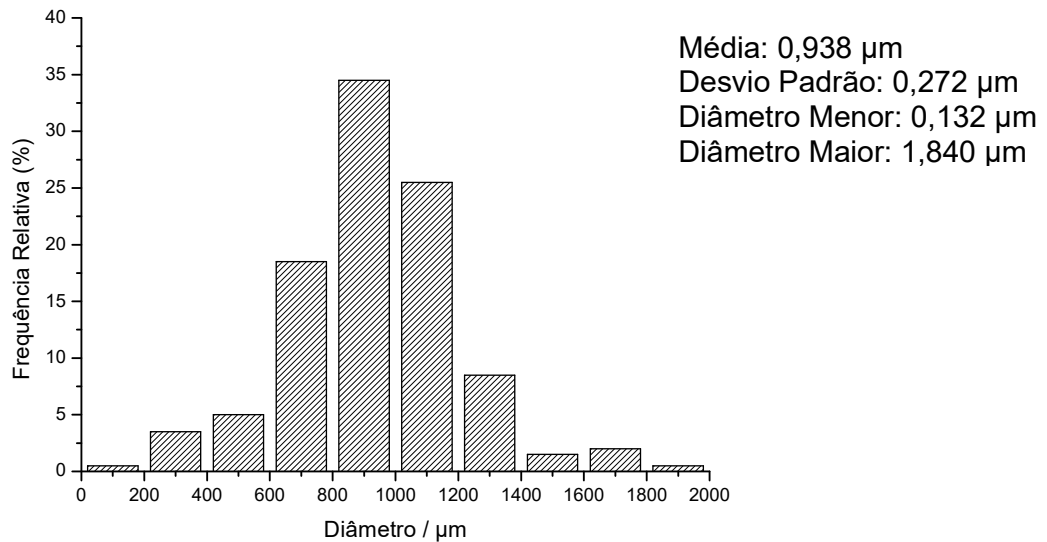


Figura 27. Histograma do diâmetro (μm) de esferas/aglomerados de nanopartículas observadas em *T. lenti*.

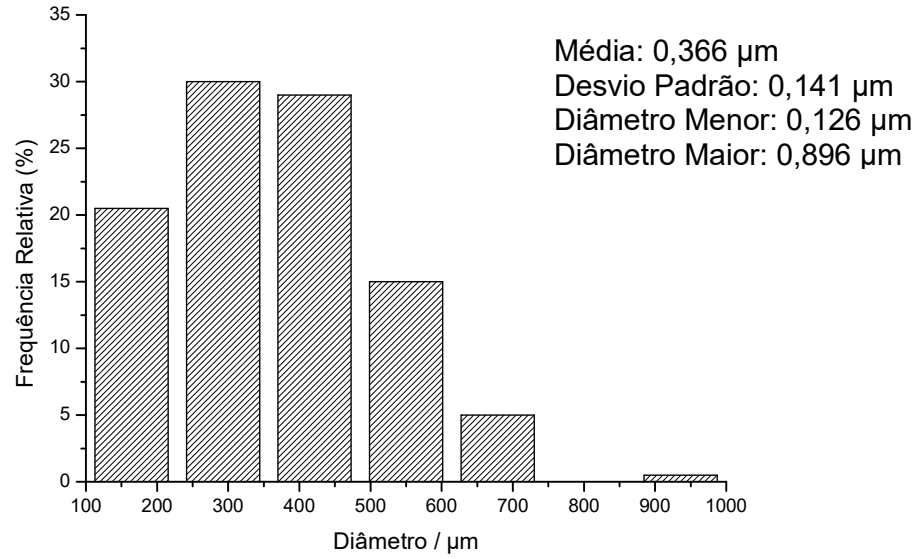
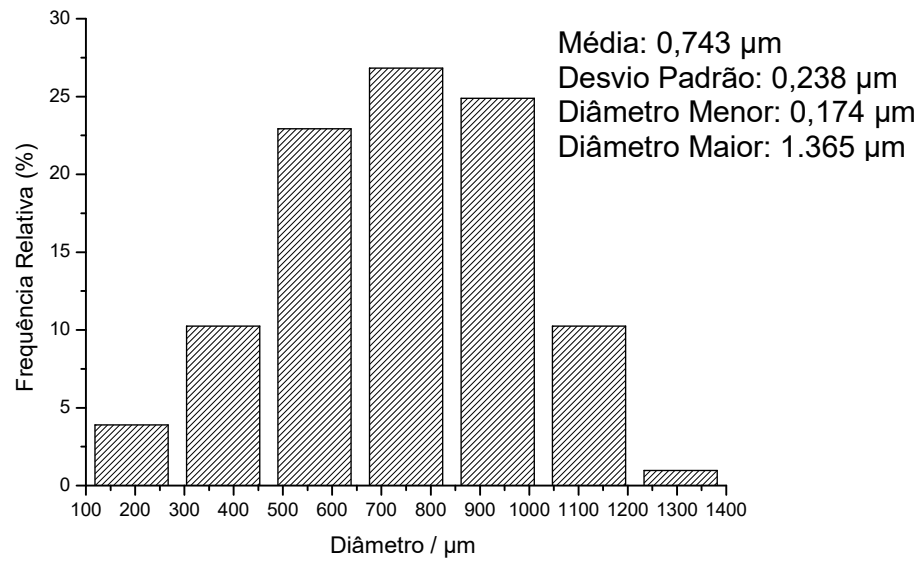


Figura 28. Histograma do diâmetro (μm) de esferas/aglomerados de nanopartículas observadas em *T. rubrovaria*.



5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

Foi examinada a porção pigmentada interna de *P. megistus*, *T. dimidiata*, *T. lenti* e *T. rubrovaria*, para verificar as estruturas encontradas nesse substrato.

As análises por TEM de *P. megistus*, evidenciam uma grande quantidade de nanopartículas, que em aumentos maiores mostram nanopartículas típicas de estruturas de carbono (Figura 29).

Já em *T. dimidiata*, as imagens obtidas revelam uma boa concentração de nanopartículas (Figura 30, a,b,c) aparentemente essas estruturas são octogonais e maiores do que as nanopartículas encontradas em *P. megistus* e *T. rubrovaria*.

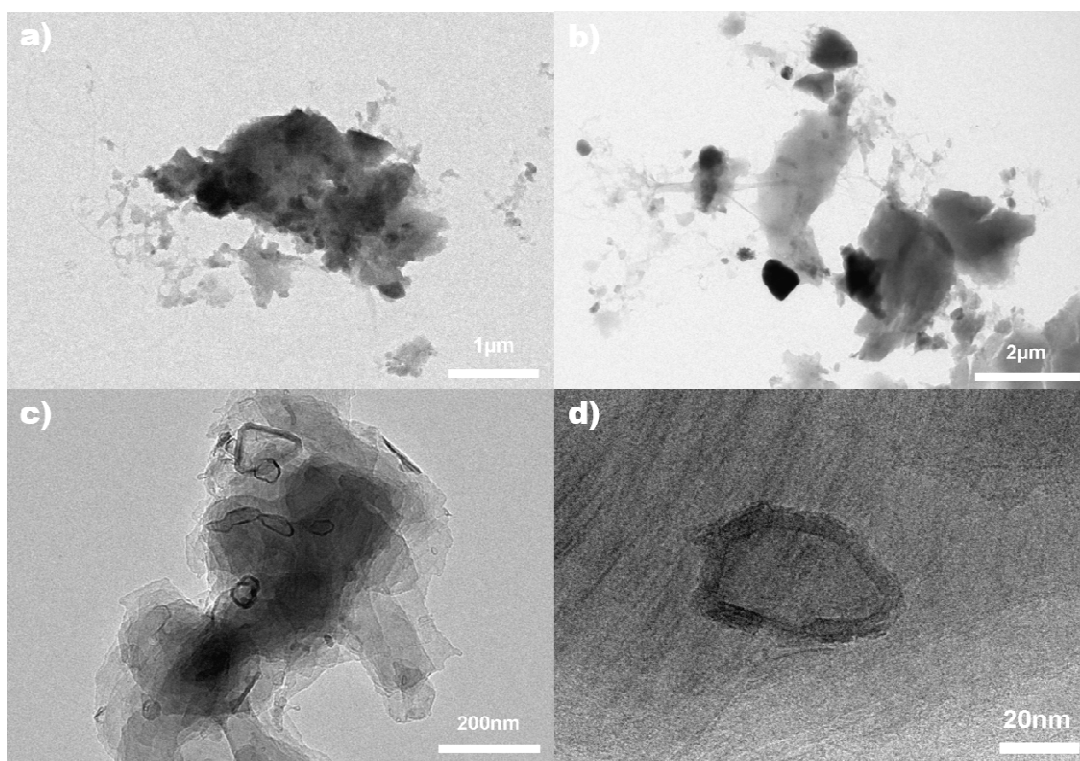


Figura 29. Imagens obtidas por MET da porção pigmentada de *P. megistus*. a, b) possíveis nanopartículas. c, d) nanopartículas com aproximadamente 50 nm.

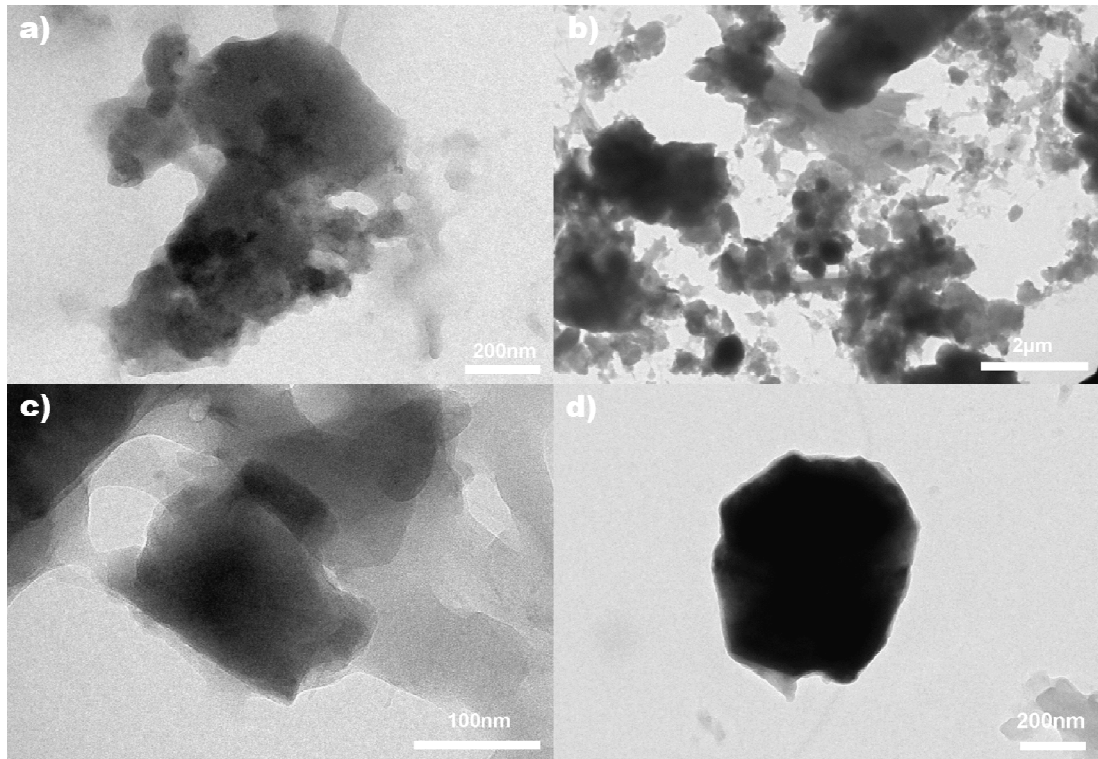


Figura 30. Imagens por MET da porção pigmentada de *T. dimidiata*. a), b) Possíveis nanopartículas. c) Estruturas disformes com aproximadamente 600 nm. d) Estrutura octagonal com 750nm.

Em *T. lenti*, não foram encontradas nem nanopartículas hexagonais, nem nanotubos, mas estruturas disformes (Figura 31, a,b), que observadas em grandes aumentos revelam padrões de planos atômicos (Figura 31, c,d).

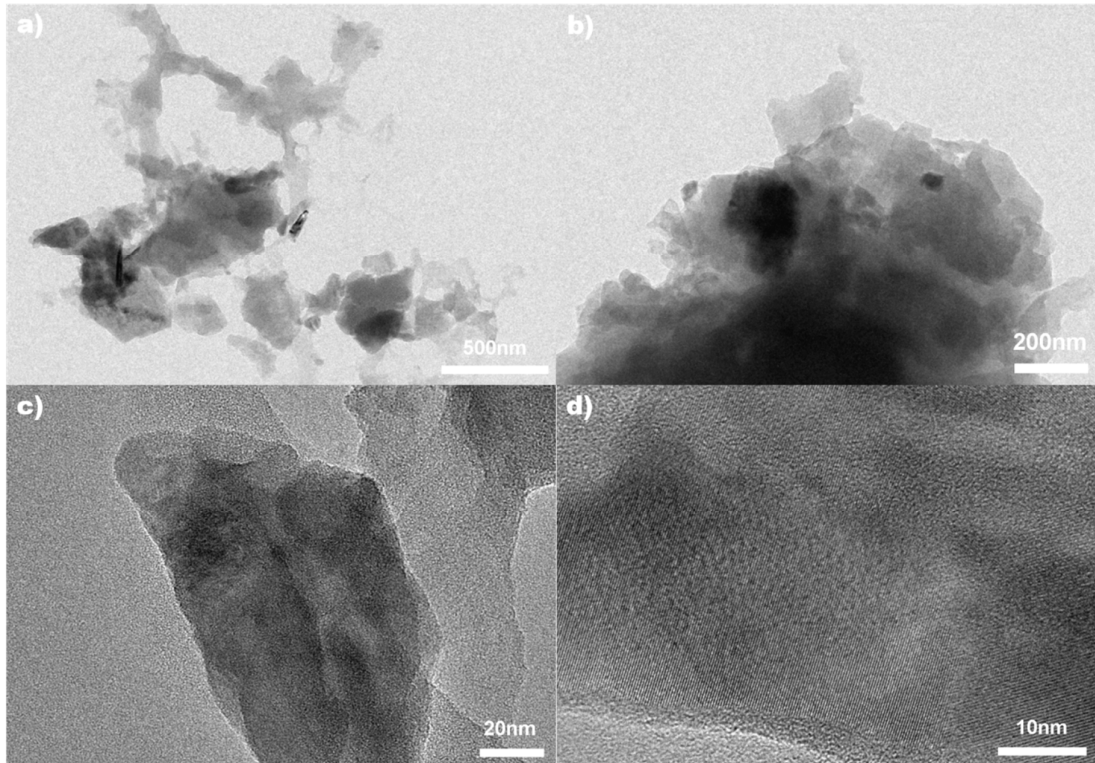


Figura 31. Imagens por microscopia eletrônica de transmissão da porção pigmentada de *T. lenti*. a, b) Possíveis nanopartículas c) Estruturas disformes com aproximadamente 350 nm, d) Planos atômicos.

Em *T. rubrovaria*, além das nanopartículas hexagonais, as imagens mostraram também, nano tubos (Figura 32 c, d).

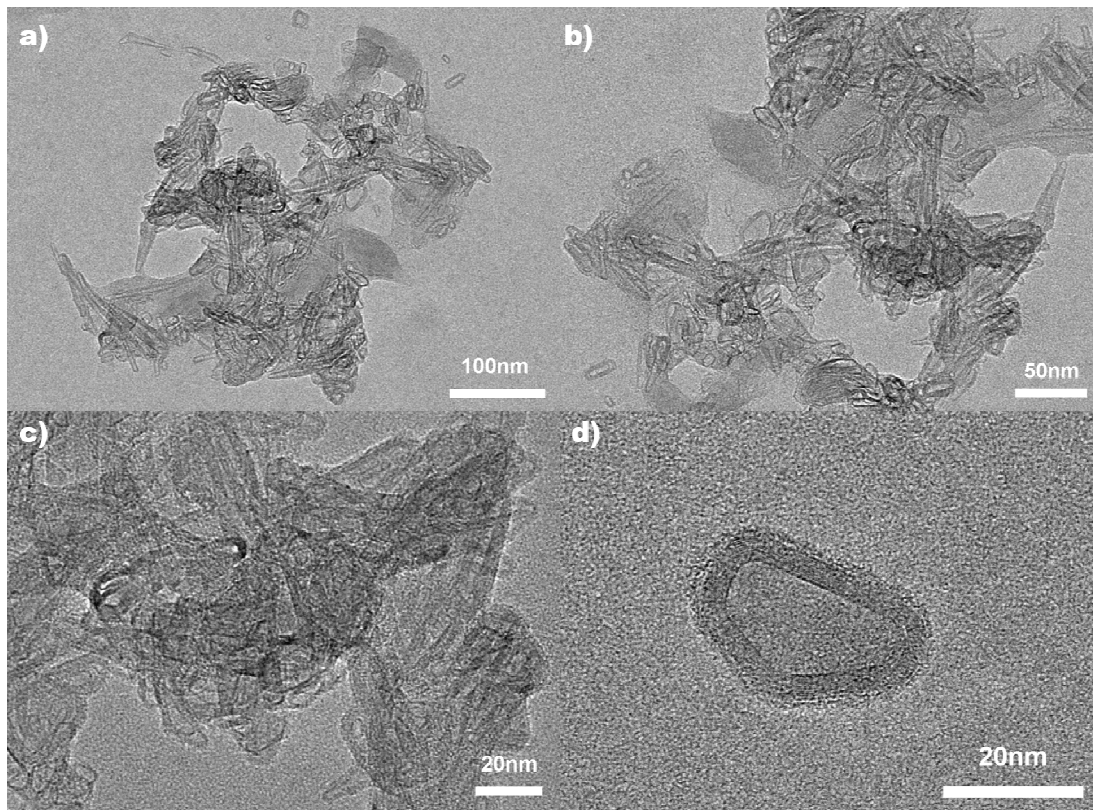


Figura 32. Imagens obtidas por MET da porção pigmentada de *T. rubrovaria*. a), b) Possíveis nanopartículas e nano tubos. c), d) nanopartículas ocas hexagonais e nano tubos com aproximadamente 40 nm.

Em *P. megistus*, na figura 33, pode ser visto uma partícula, constituída por O, C, K, Na, Mg, P e S. O cobre visto (Figura 34) por EDS faz parte da grade utilizada para a fixação do material para observação no microscópio eletrônico de transmissão. Já na figura 35, pode ser visto a presença de Ti. Nesse tipo de partícula, por não ser uma estrutura cristalina, não pode ser realizada a medidas dos planos atômicos.

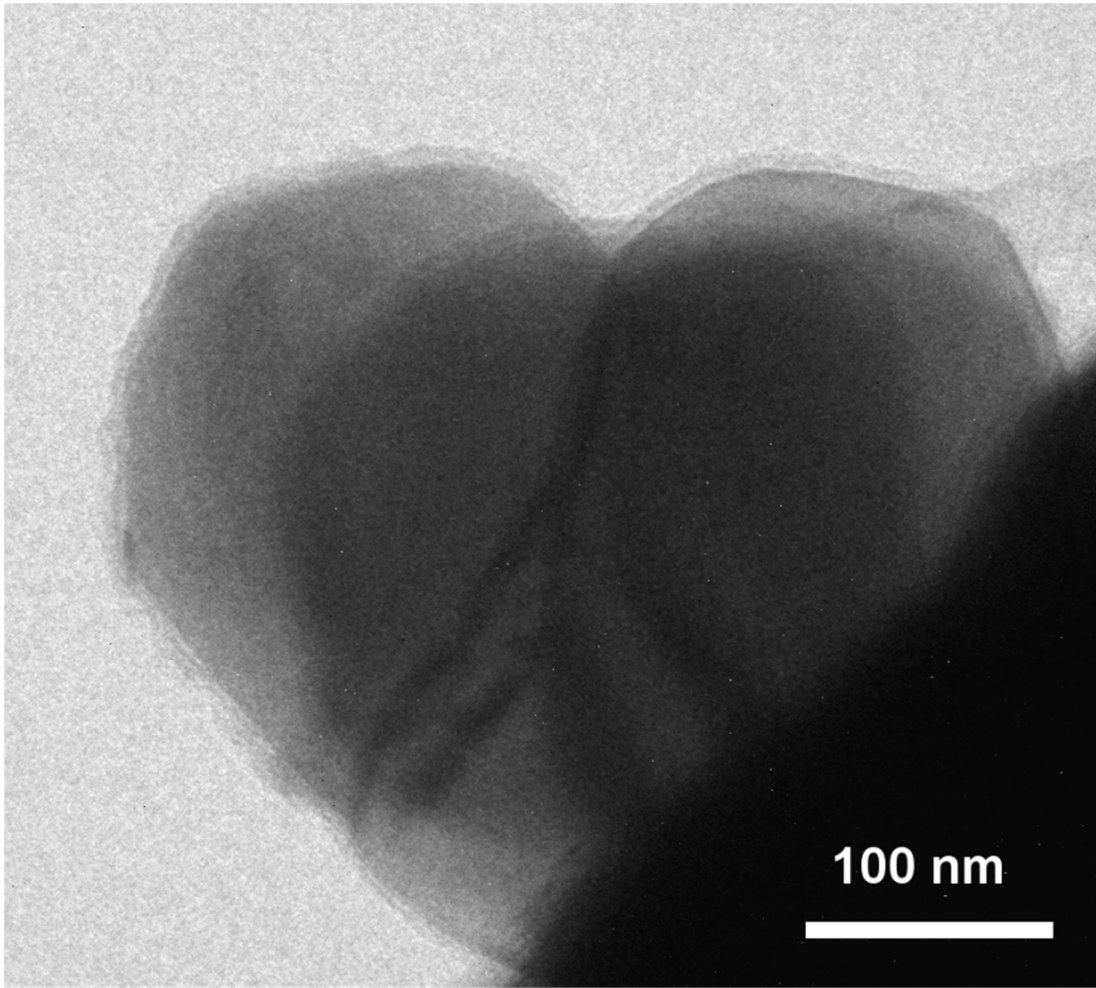


Figura 33. Imagens obtidas por MET de precipitado extraído da porção pigmentada de *P. megistus*.

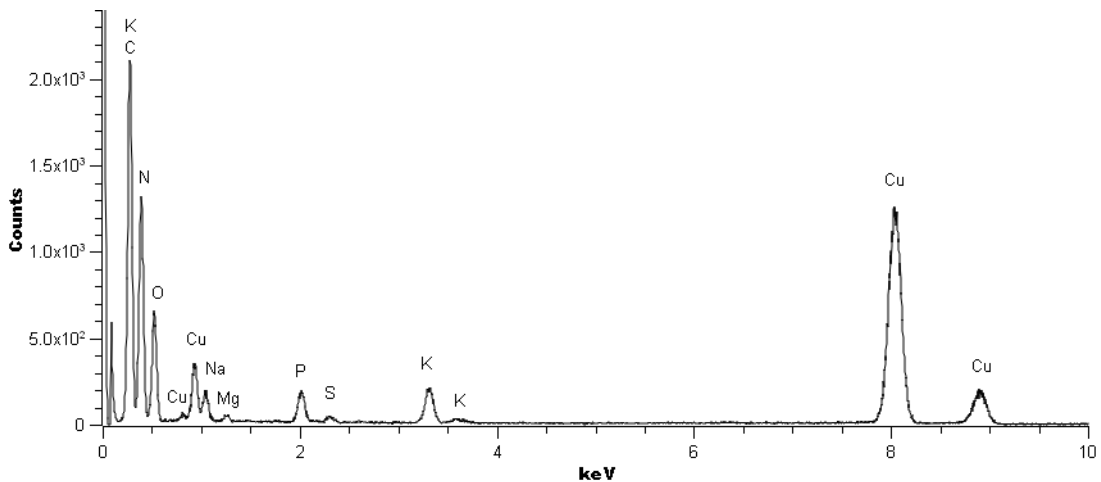


Figura 34. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de *P. megistus* por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.

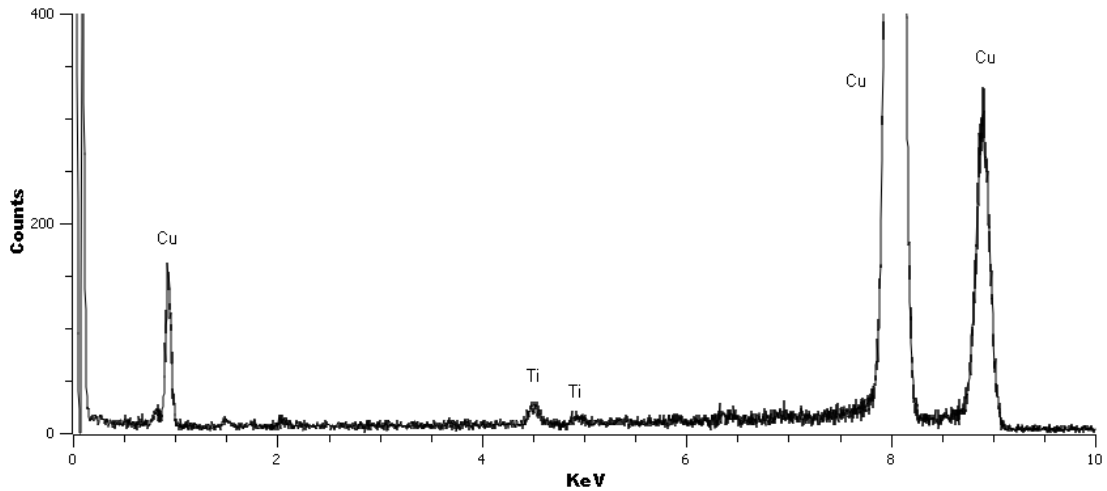


Figura 35. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de *P. megistus* por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.

Em *T. dimidiata*, a estrutura vista na figura 36, também não cristalina e com características de precipitado ou aglomerado, quando feito o EDS, além de todos os elementos citados anteriormente, pode ser visto o Mg (Figura 37). Na figura 38, mostra um aglomerado de nanopartículas, diferentes da figura 36, nessa pode ser visto na EDS da figura 39, a presença de Ti.

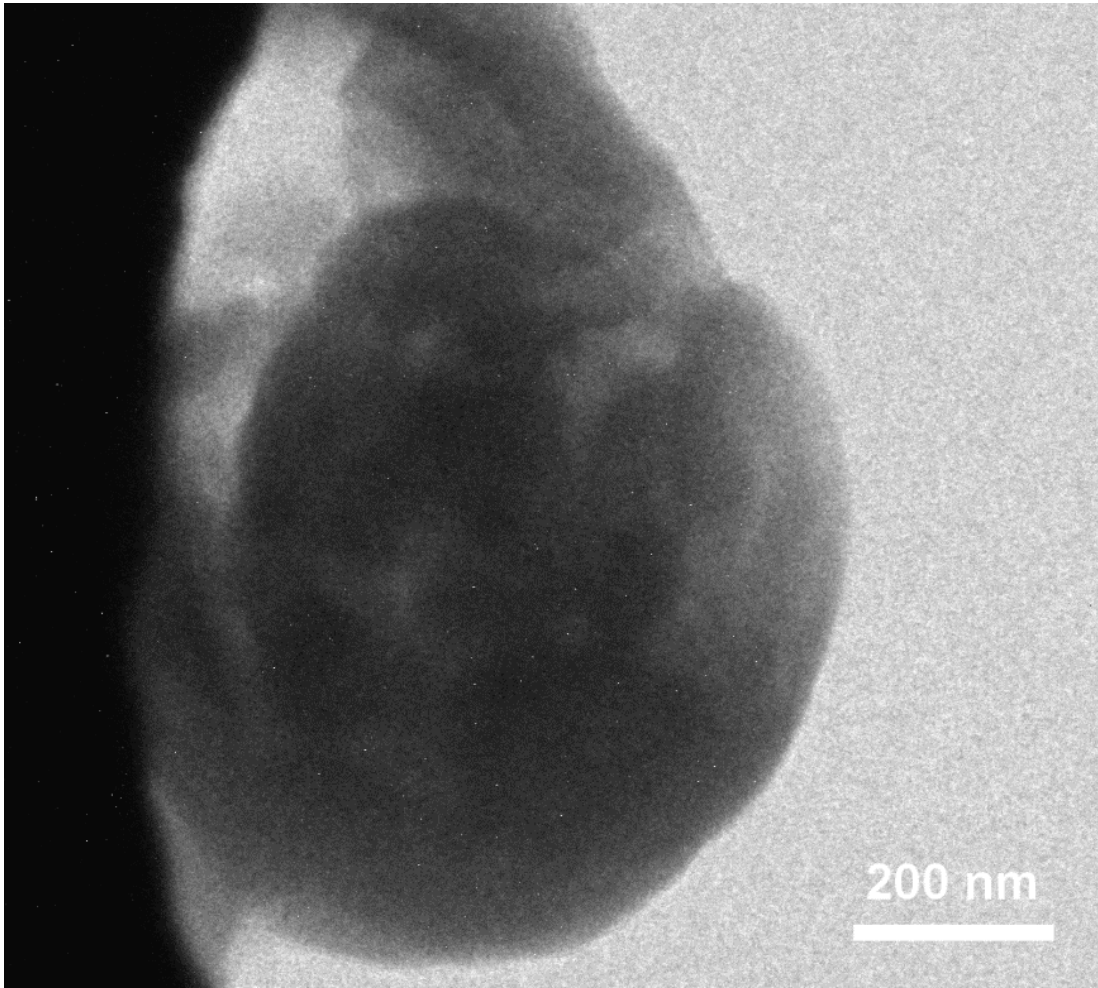


Figura 36. Imagens obtidas por MET de precipitado extraído da porção pigmentada de *T. dimidiata*.

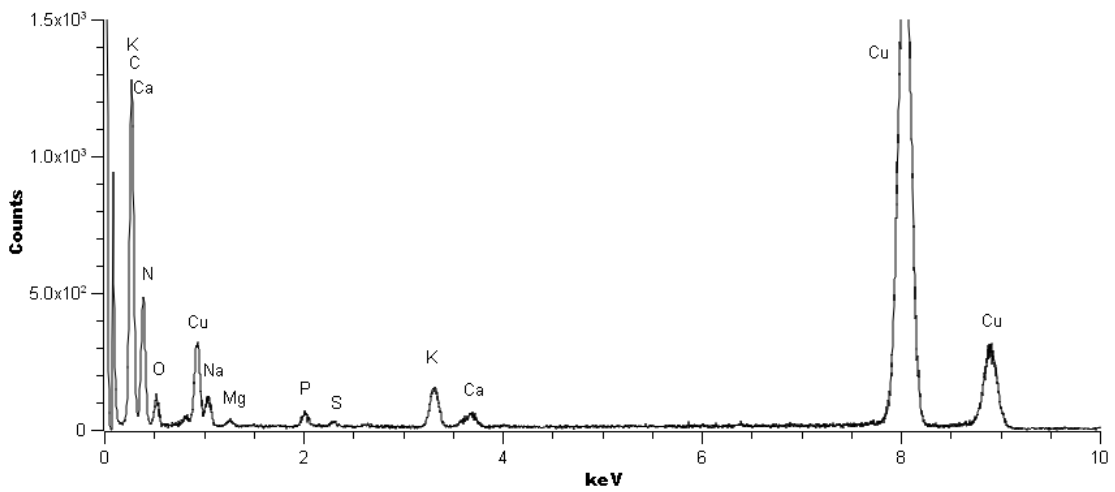


Figura 37. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de *T. dimidiata* por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.

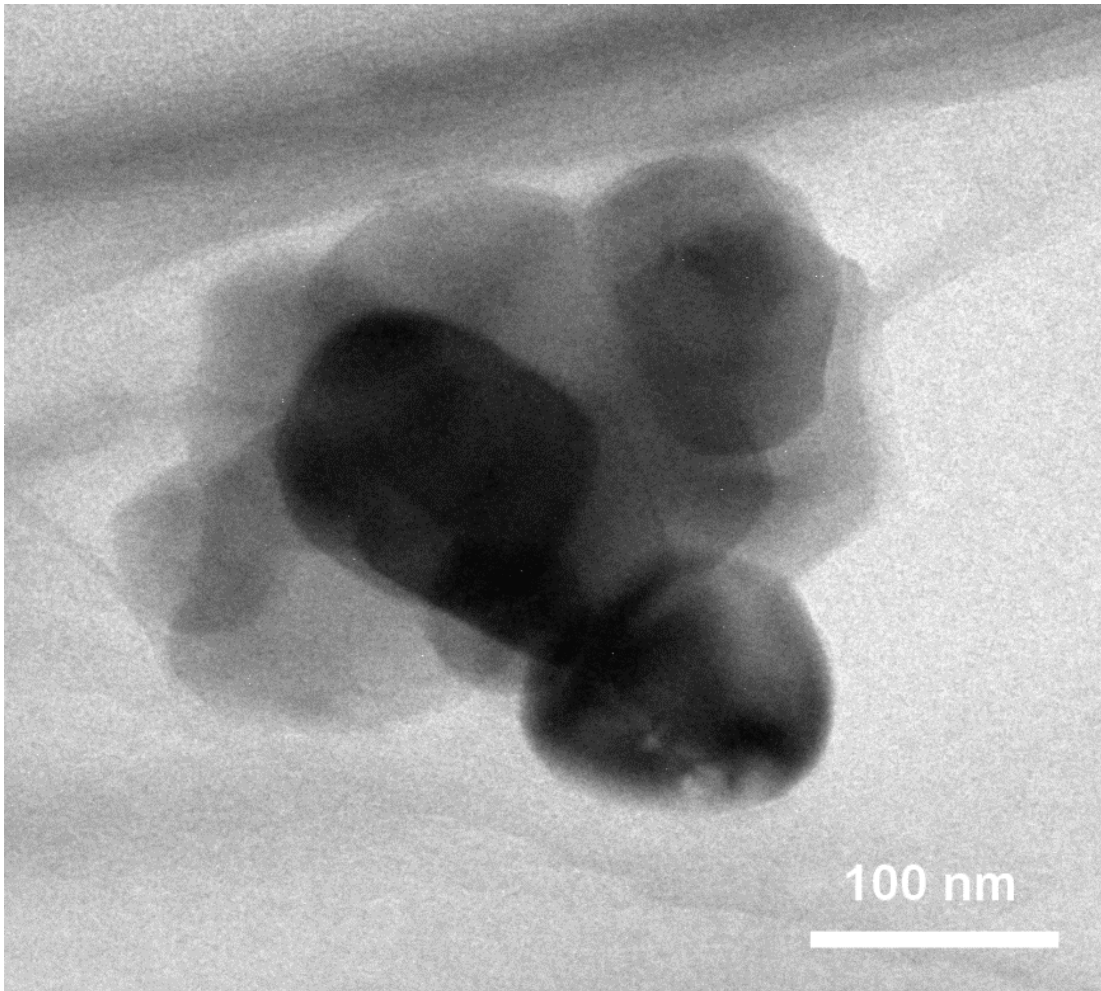


Figura 38. Imagens obtidas por MET de precipitado de nanopartículas extraído da porção pigmentada de *T. Dimidiata*.

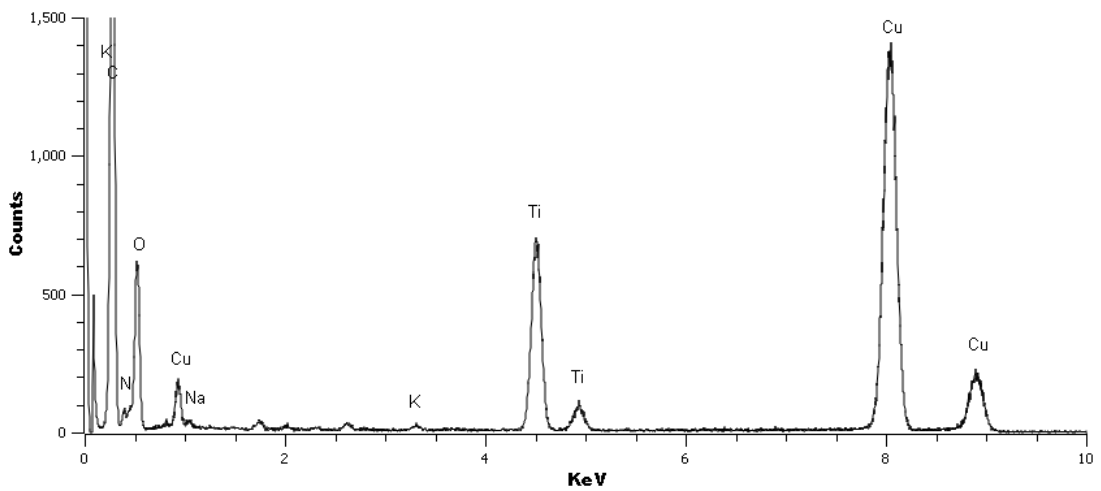


Figura 39. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de *T. dimidiata* por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.

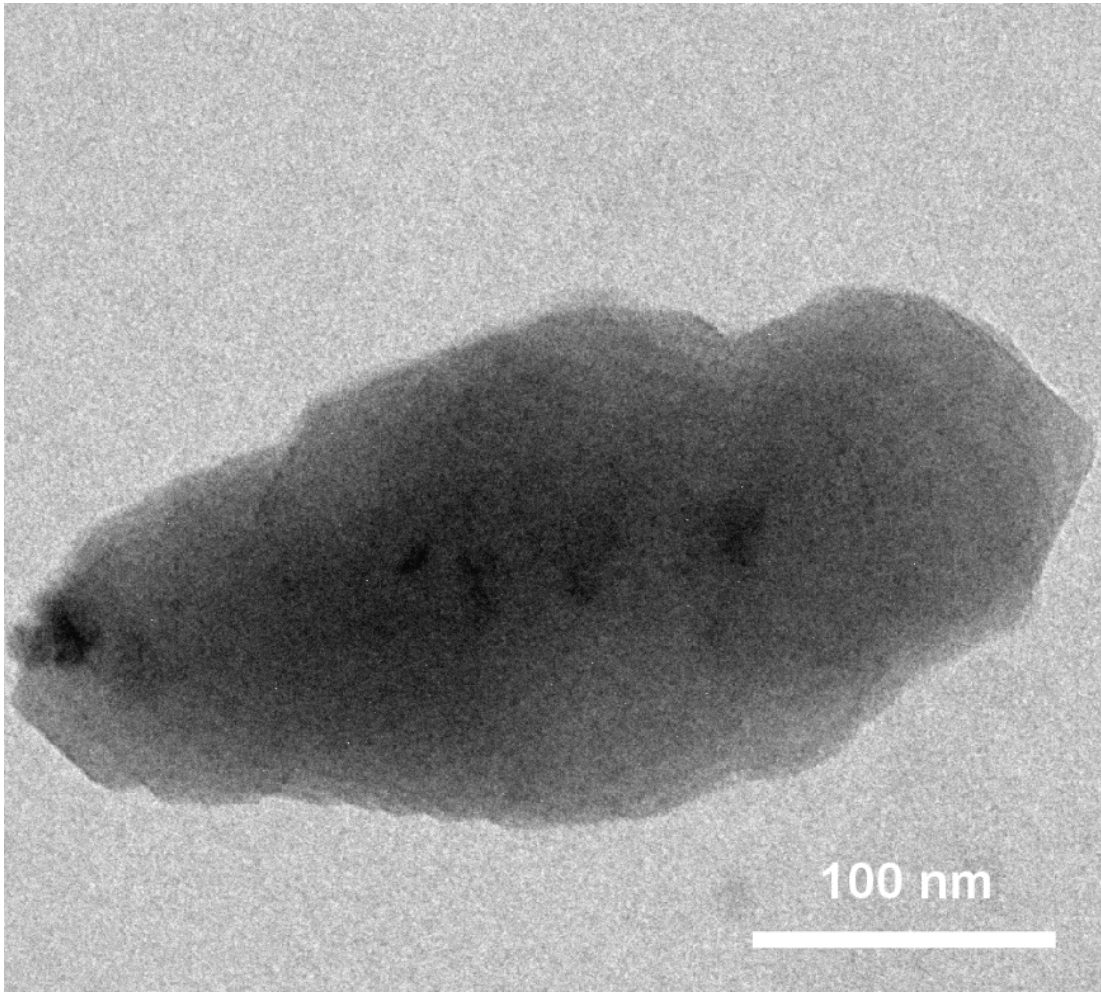


Figura 40. Imagens de precipitado da porção pigmentada de *T.lenti* obtidas por MET mostrando nanopartículas na extremidade esquerda e ao centro.

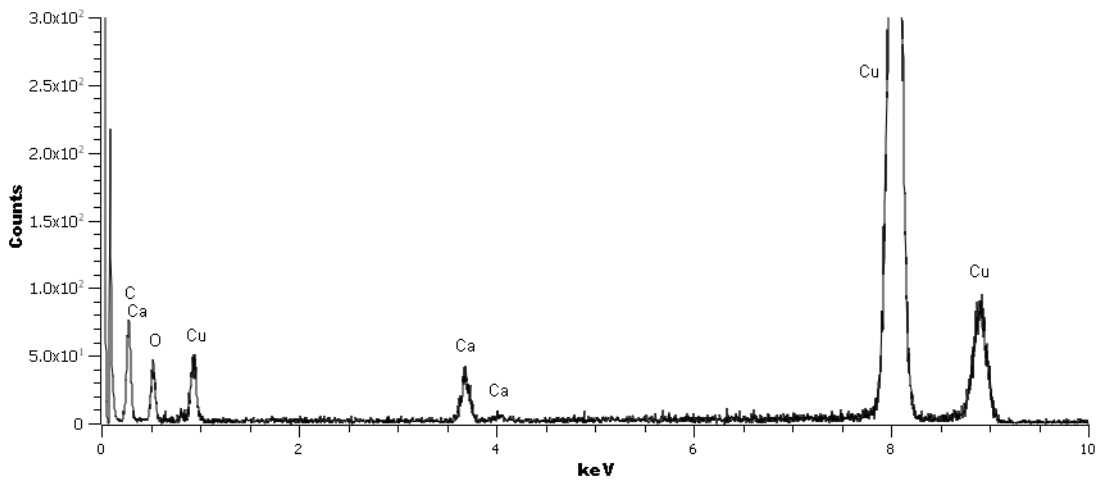


Figura 41. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de *T. lenti* por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.

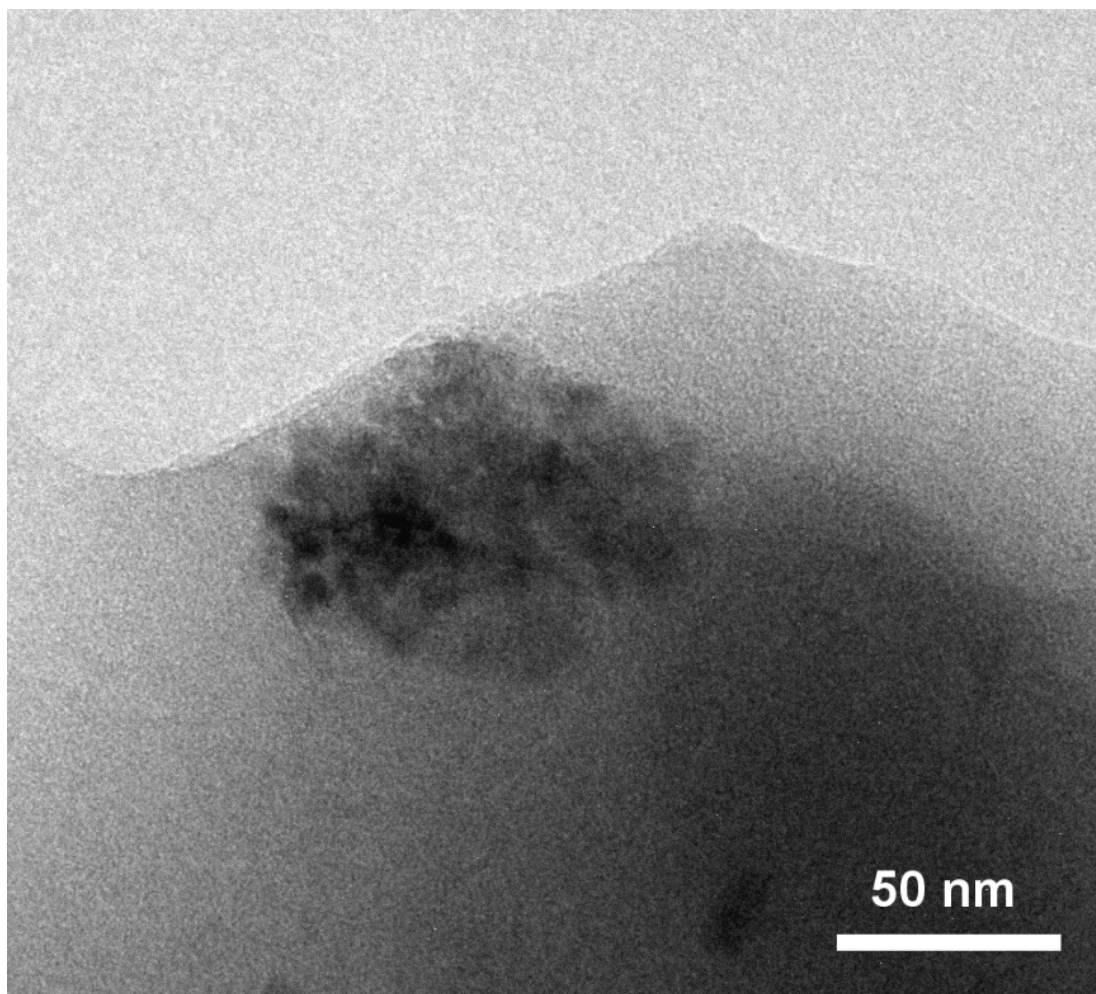


Figura 42. Imagens obtidas por MET de nano partícula extraída da porção pigmentada de *T. lenti*.

Visualização de uma estrutura ou aglomerado em *T. lenti* que difere estruturas de *P. megistus*, *T. rubrovaria* e *T. dimidiata* quanto a detecção de Mg por EDS (figura 41). Na figura 42 a visualização de nanopartículas demonstra por meio de EDS (Figura 43) a presença de Ca e Fe.

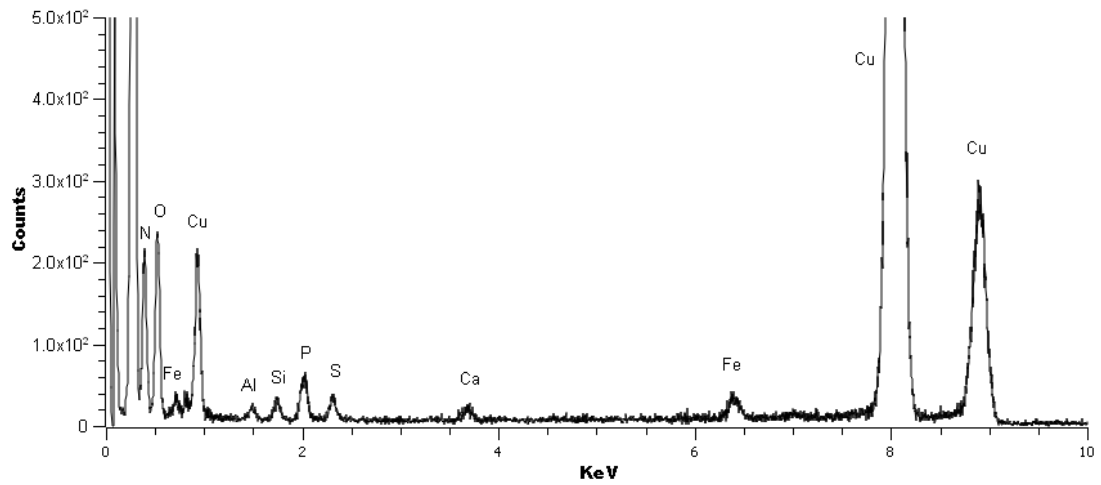


Figura 43. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de *T. lenti* por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.

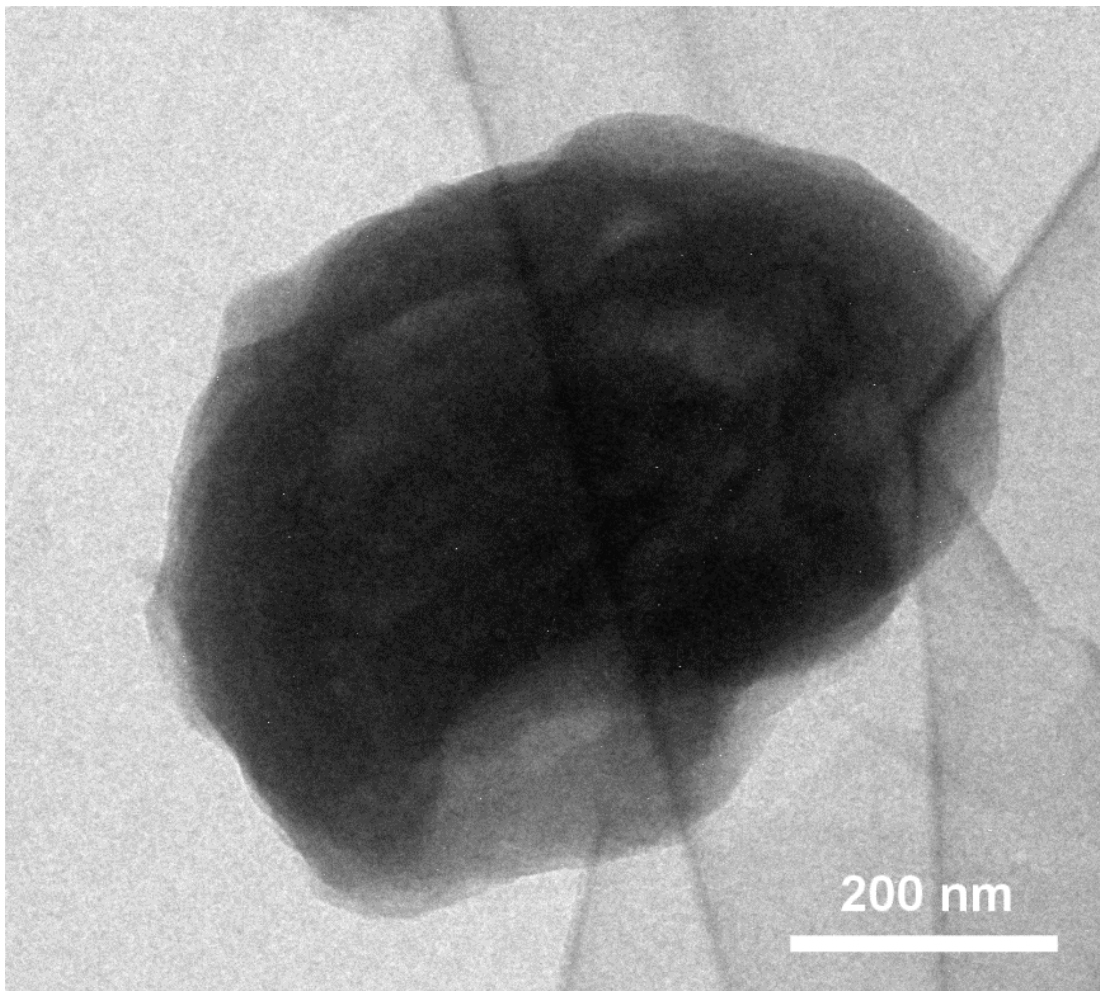


Figura 44. Imagens obtidas por MET de precipitado extraído da porção pigmentada de *T. rubrovaria*.

Em *T. rubrovaria*, o precipitado ou aglomerado de nanopartículas na figura 44, por não ser uma estrutura cristalina, foi analisado por EDS, determinando sua constituição (Figura 45) por vários elementos visto anteriormente inclusive o Mg. Contudo, na figura 46 pode ser visto nanopartículas que quando analisados por EDS (Figura 47), mostra a detecção de Fe, Mg e V.

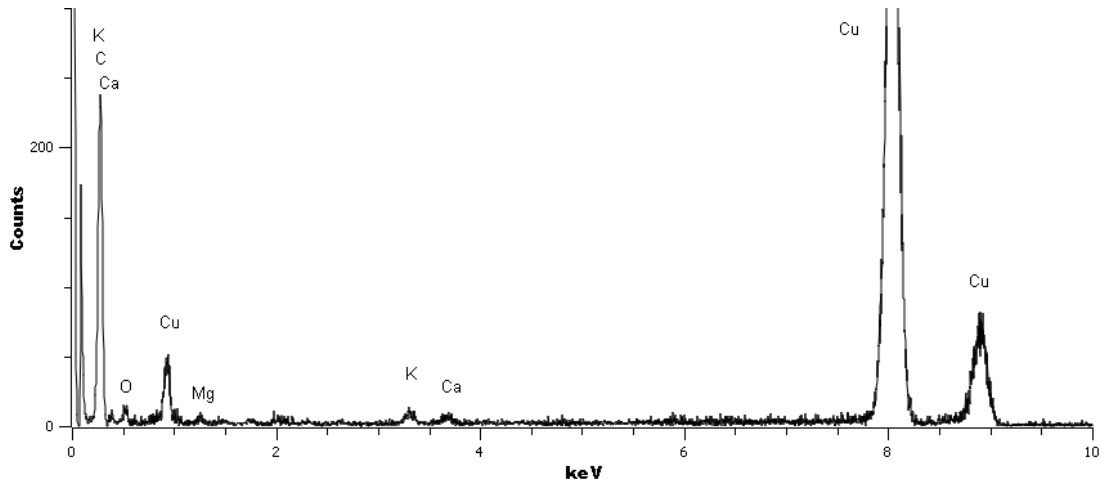


Figura 45. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de *T. rubrovaria* por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.

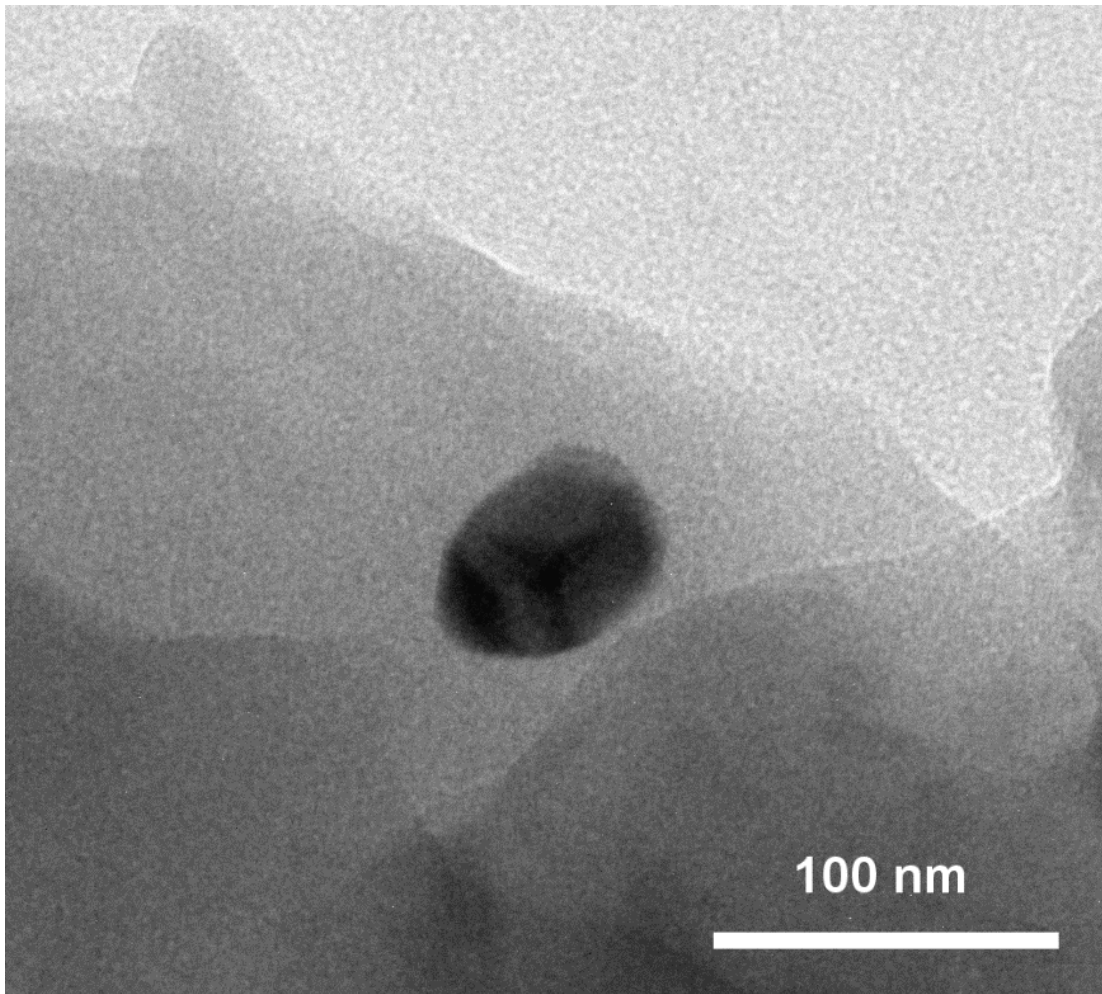


Figura 46. Imagens obtidas por MET de nanopartícula extraída da porção pigmentada de *T. rubrovaria*.

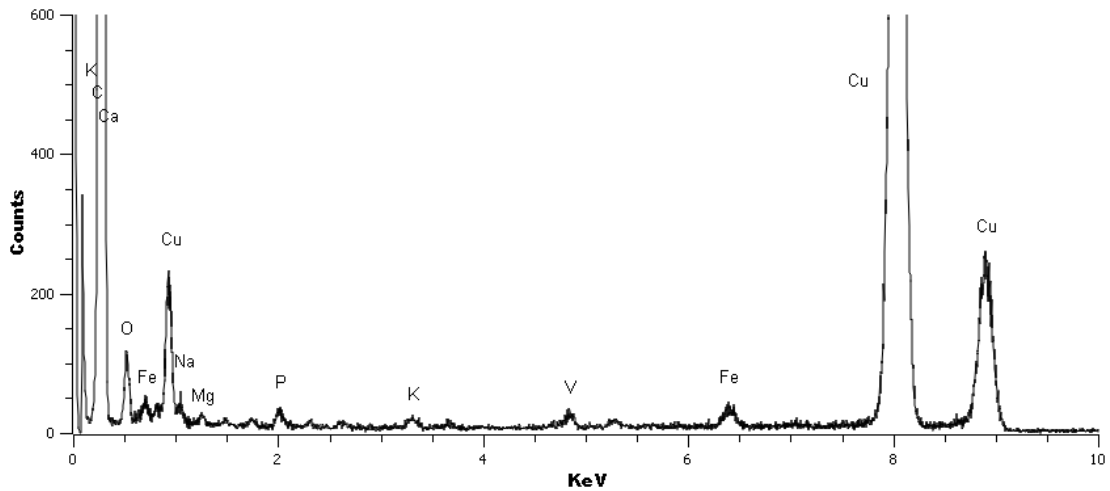


Figura 47. Gráfico resultante de precipitado da porção pigmentada de *T. rubrovaria* por meio de EDS, que evidencia elementos químicos.

A partir da análise dos planos atômicos porção pigmentada interna de *P. megistus* por meio das distâncias interplanares, na figura 48, foram detectadas nanopartículas de titânio (Tabela 02).

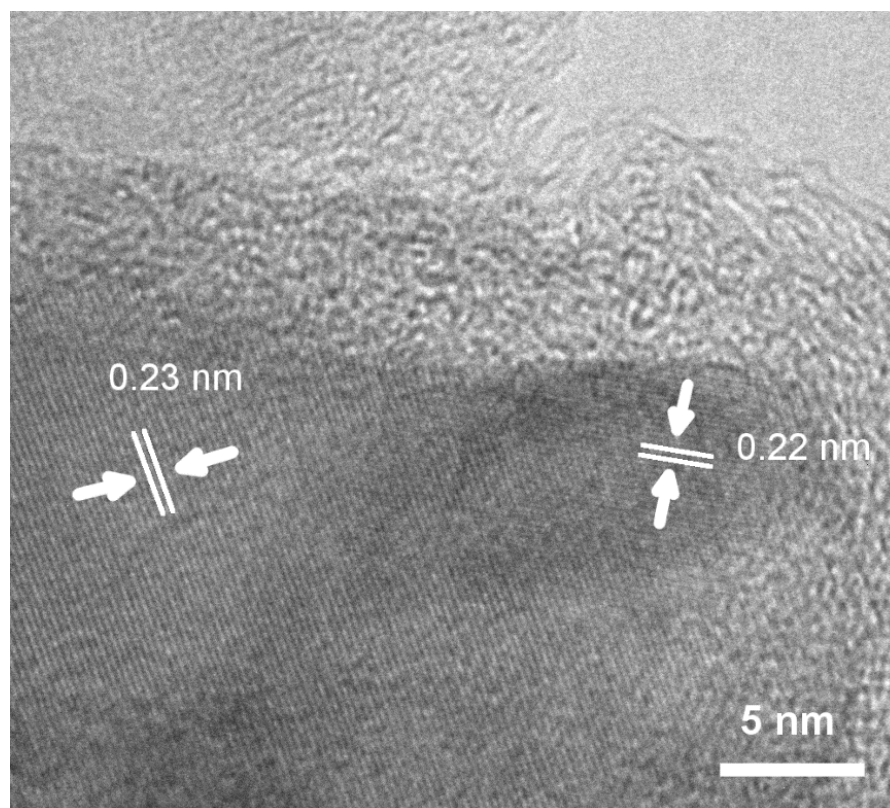


Figura 48. Imagens obtidas por MET de nanopartícula extraída da porção pigmentada de *P. megistus*, que mostram planos atômicos e as distâncias interplanares.

Tabela 2. Valores de distância interplanares e substâncias encontradas a partir desses valores na ficha cristalográfica de nanopartículas encontradas na porção pigmentada de *P. megistus*.

Lista de picos					Informação do cartão	
h	k	l	D (Å)	I	Nomes	Titânio
0	0	2	2.34	30	Fórmula	Ti
1	0	1	2.24	100	Número do PDF	44-1294
					Qualidade	Star
					Subfiles	Inorganic alloy CP FOR EXP

Em *T. dimidiata* as distâncias interplanares (Figura 49) mostram que a composição das nanopartículas encontradas na porção interna pigmentada é composta Ti_2O_3 (Tabela 3).

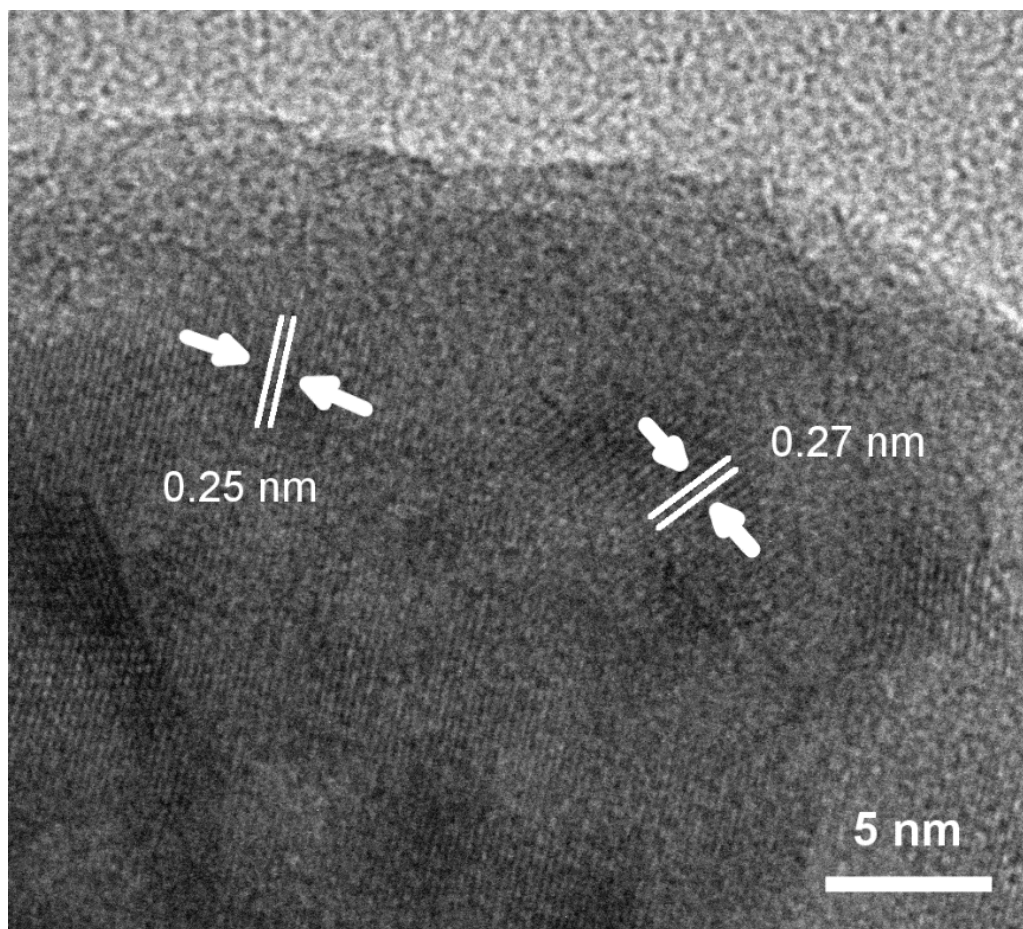


Figura 49. Imagens obtidas por MET dos planos atômicos e distância Interplanares de nano partícula extraída da porção pigmentada de *T. dimidiata*.

Tabela 3. Valores de distância Interplanares e substâncias encontradas a partir desses valores na ficha cristalográfica de nanopartículas encontradas na porção pigmentada de *T. dimidiata*.

Lista de picos					Informação do cartão	
h	k	l	d	I	Nomes	Óxido de Titânio
1	0	4	2.7120	50	Fórmula	Ti_2O_3
1	1	0	2.5720	60	Número do PDF	10-63
					Qualidade	Star
					Subfiles	inorganic alloy NBS CP COR

Entretanto na porção interna pigmentada do conexivo de *T. lenti*, as análises das distâncias interplanares, mostram que as nanopartículas são constituídas por Óxido de Ferro e Magnetita (Figura 50), (Tabela 4).

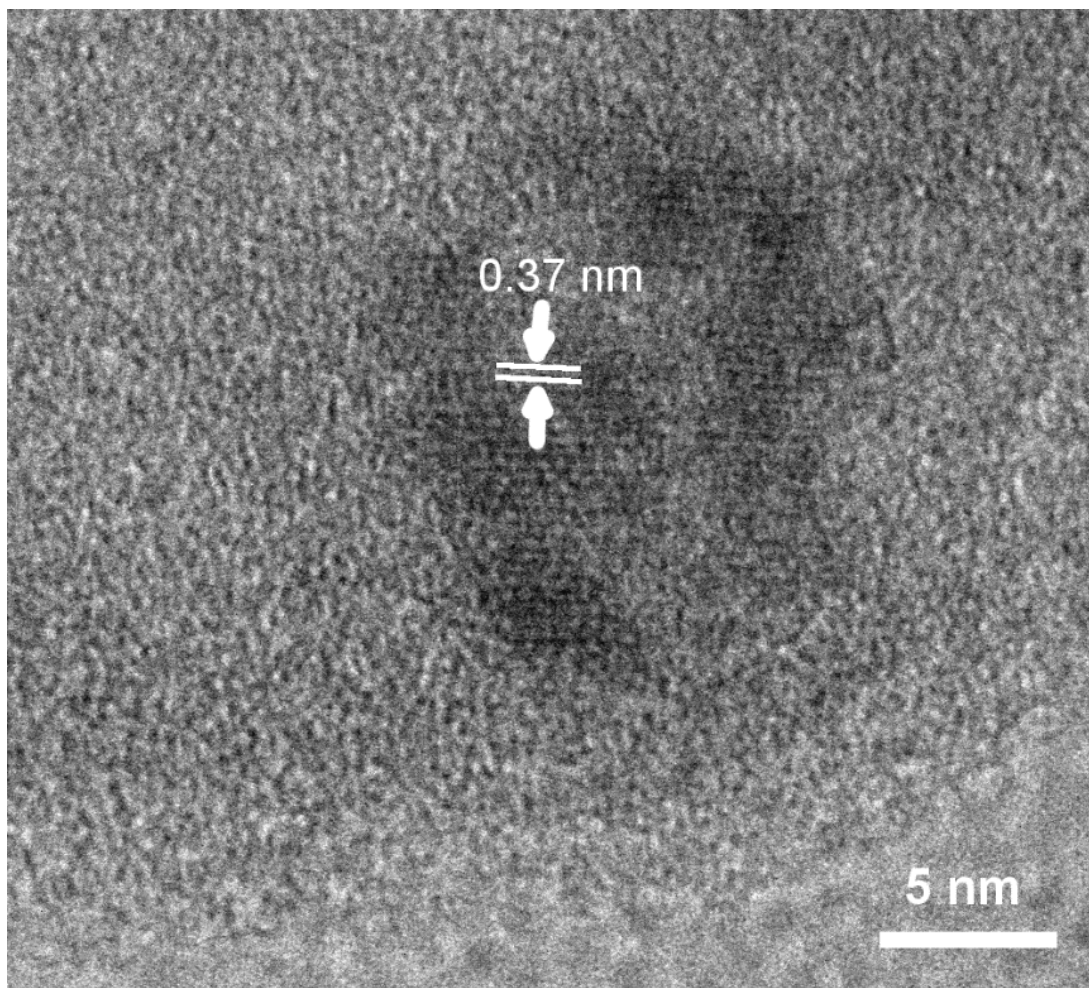


Figura 50. Imagens obtidas por MET dos planos atômicos e distância interplanares de nano partícula extraída da porção pigmentada de *T. lenti*.

Tabela 4. Valores de distância Interplanares e substâncias encontradas a partir desses valores na ficha cristalográfica de nanopartículas encontradas na porção pigmentada de *T. lenti*.

Lista de picos					Informação do cartão	
h	k	l	d	l	Nomes	Óxido de Ferro
2	1	0	3.7400	5		Maghemite- C , syn
					Fórmula	Fe ₂ O ₃
					Número de PDF	39-1346
					Qualidade	Star
					Subfiles	Webmineral

Na porção interna pigmentada de *T. rubrovaria*, foi constatado a presença de nanopartículas (Figura 51). A constituição dessas nanopartículas, por meio da análise das distâncias interplanares é FeVO_4 (Tabela 5).

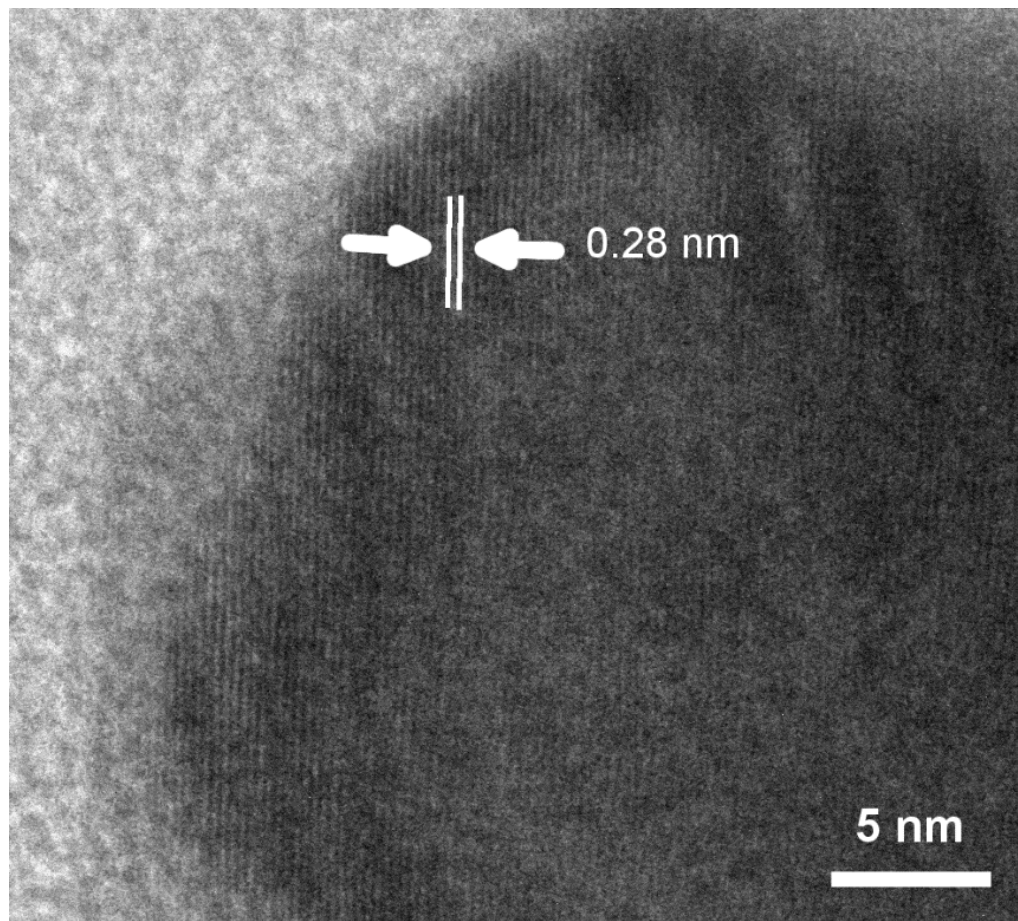


Figura 51. Imagens obtidas por MET dos planos atômicos e distância Interplanares de nano partícula extraída da porção pigmentada de *T. rubrovaria*.

Tabela 5. Valores de distância Interplanares e substâncias encontradas a partir desses valores na ficha cristalográfica de nanopartículas encontradas na porção pigmentada de *T. rubrovaria*.

Lista de picos					Informação do cartão	
h	k	l	D	I	Nomes	Iron Vanadium Oxide
-2	-2	1	2.8624	24	Fórmula	FeVO_4
					Número do PDF	38-1372
					Quality	Star
					Subfiles	inorganic NBS CP COR

6. *Discussão:*

Inicialmente o trabalho propunha o uso de diversas técnicas, ligadas principalmente à análise de compostos químicos encontrados no conexivo dos triatomíneos. Conforme o estudo foi ocorrendo, várias técnicas propostas não puderam ser implementadas pois não proporcionariam respostas conclusivas. Levando em consideração o tamanho das colônias utilizadas, a quantidade de material coletado e principalmente a falta de informações sobre a classe de compostos químicos que poderiam ser encontrados no substrato dos conexivos.

A escolha das espécies e gêneros utilizados no trabalho não foi feita de forma aleatória. Mesmo sendo três espécies de *Triatoma* e somente uma de *Ponstrongylus*. A escolha foi devida à cor do pigmento encontrado no conexivo, vermelho e amarelo. No caso específico de *Triatoma dimidiata*, o tamanho corporal contribuiu para a escolha, relacionando isso a dificuldade de se conseguir pigmento amarelo, de *Triatoma lenti*.

Primeiramente nesse estudo foram realizadas observações por MEV pois era preciso conhecer a topografia dos conexivos de *P. megistus*, *T. dimidiata*, *T. lenti* e *T. rubrovaria*. Na sequência foi feita a análise do conexivo interno na porção pigmentada notou-se a presença de esferas em seu conteúdo, a seguir quando era realizado EDS, foram observados diversos elementos. Posteriormente foram preconizadas análises para saber se essas esferas e esses elementos eram encontrados em toda as partes dos conexivos, ou seja, porção externa pigmentada e preta e porção interna pigmentada e preta.

Todas as imagens feitas por MEV nas porções externas do conexivo de *P. megistus*, *T. dimidiata*, *T. lenti* e *T. rubrovaria* mostraram estruturas muito similares independente das cores de seus pigmentos. Foi observado também que as esferas ou aglomerados de nanopartículas não ocorriam na porção externa em nenhum triatomíneo. Em consequência dessa observação concluiu-se que o pigmento estava no interior do conexivo e não no exterior como em alguns insetos (ASSIS, 2013).

As análises por MEV em *P. megistus*, mostraram que apenas nessa espécie estudada foram verificadas esferas na porção interna tanto na porção pigmentada, quanto na não pigmentada. Porém, na porção não pigmentada a quantidade de esferas é muito menor do que na porção pigmentada. Isso ocorre, pois na porção

pigmentada, existe uma depressão na topografia do conexivo que propicia um acúmulo dessas esferas. Verificou-se que *P. megistus* apresentou uma quantidade maior de esferas do que *T. dimidiata*, *T. lenti* e *T. rubrovaria*. Essa constatação indique que a quantidade de esferas pode ser um dos fatores que influenciam a intensidade de cor, pois das espécies utilizadas nesse estudo, *T. rubrovaria* é o que tem o vermelho mais intenso, mas pode sofrer variações de tons e em *P. megistus* não se observa diferenças na tonalidade da cor vermelha (Juberg, 2014).

Diferentemente de *P. megistus* e *T. rubrovaria*, o conexivo de *T. dimidiata* e *T. lenti* apresentam manchas de cor amarela. As esferas encontradas no interior do conexivo na porção pigmentada se mostram fundidas ao assoalho do conexivo e em quantidades bem inferiores às observadas em *P. megistus* e *T. rubrovaria* que possuem pigmentos vermelhos, o que pode ser também um dos fatores para a cor amarela.

Todas as quatro espécies quando analisadas por meio de EDS mostram em sua constituição elementos como Ca, Na, N, O, P, S e K, tanto na porção interna quanto na porção externa, sendo indiferente para a presença de pigmento. O Mg foi detectado somente nas esferas da porção interna pigmentada do conexivo das quatro espécies.

As análises conduzidas por meio do equipamento FIB, utilizando íons de gálio para a realização de orifícios com intuito de verificar se ocorriam os mesmos elementos na porção pigmentada das quatro espécies somente foi possível em *P. megistus* e *T. rubrovaria*. Por intermédio do FIB não se conseguiu enquadrar e fazer os orifícios de forma uniforme no material encontrado em *T. dimidiata* e *T. lenti*, com conexivo com manchas de cor amarela. Ao realizar o EDS no fundo do orifício em *P. megistus* e *T. rubrovaria*, todos os elementos que foram detectados anteriormente, também foram detectados nessa análise. Mas não foi possível detectar de maneira coesa o Mg, pois o pico do gálio era tão intenso que interferia no pico do Mg.

Não foram encontradas publicações a respeito da execução de orifícios iônicos em insetos por meio de FIB. Essa modalidade de análise foi encontrada apenas em metais em que seus compostos já são conhecidos e os picos de gálio já são previstos (Echlin, 2009; Williams, 2009).

Após as análises serem realizadas por MEV, utilizou-se o precipitado da porção pigmentada das quatro espécies, para realizar o MET e averiguar a composição

desses aglomerados. Levando em consideração que as outras porções se mostraram iguais em todos os triatomíneos. A diferença de cores, formas de esferas e quantidade eram apenas nas porções internas pigmentadas. Pelo fato do Mg ser detectado apenas nas esferas, foi realizada a extração dessas, juntamente com o material encontrado na porção interna pigmentada e utilizada as técnicas de análise em MET (Echlin, 2009; Williams, 2009).

Nas primeiras análises realizadas (Figuras 25 a 28), foi visto uma grande presença de nanopartículas de vários formatos e tamanhos e esferas incrustadas no material (Figura 26). As mesmas esferas que foram vistas por MEV. Nessas análises por meio do EDS acoplado ao MET não se conseguiu fazer a leitura pois a amostra provavelmente estava com muito material orgânico e se degradava com muita rapidez.

Isso ajudou a entender qual o alvo da análise por MET. Pois as nanopartículas hexagonais e pentagonais eram provavelmente cadeias de carbono decorrente de impurezas vindas da extração.

Com o aprimoramento da técnica de raspagem da parte pigmentada, foi possível analisar as nanopartículas aglomeradas demonstradas nas análises por MEV e comparar sua constituição elementar com a constituição da β -quitina (Campana-Filho, 2007), Sangue humano (Solayman, 2016) e hemolinfa dos triatomíneos (Manturano et al, 2012). Foi possível verificar também a presença dos pigmentos xantopterina $C_6H_5N_5O_2$ de cor amarela e eritropterina $C_9H_7N_5O_5$ de cor vermelha (PubChem, 2017) em *P. megistus*, *T. dimidiata*, *T. lenti* e *T. rubrovaria*. No caso dos pigmentos, todos seus elementos foram verificados nos EDS, menos o hidrogênio que não pode ser detectado pelo EDS por ter seu número atômico 1. A presença dos pigmentos xantopterina e eritropterina foi verificada em *P. megistus* por Vilela, 1975.

Grande parte dos elementos encontrados nas quatro espécies tais como: Mg, N, C, O, Ca, K, Na, estudadas coincidem, mostrando uma gama de elementos diversificados. Alguns deles são um diferencial para a possível diferença de cores do conexivo dos triatomíneos, que nesse caso, podem ser vermelhas ou amarelas com variantes nas duas cores.

Em *P. megistus*, o que difere é a presença do titânio, sendo encontrado no aglomerado por meio de EDS e nanopartículas separadas constituídas de titânio puro. Essa espécie contém manchas vermelhas em seu conexivo. Possivelmente

essa ocorrência se deve a uma quantidade maior de Eritropterina (Vilela, 1975), que mesmo com a presença de nanopartículas de titânio, não altera sua cor para o amarelo. O titânio contido nas manchas vermelhas do conexivo de *P. megistus* provem dos oligoelementos e ultra-traços que constituem o sangue.

Em *T. dimidiata*, a detecção dos elementos em sua constituição, difere também pela presença do titânio e do sódio quando analisado o aglomerado de nanopartículas. As nanopartículas encontradas nessa espécie, são constituídas por Ti_2O_3 identificadas após a análise das medidas interplanares da nano partícula. Nesse caso, o titânio pode sim estar influenciando na cor do pigmento, pois essa espécie mostra manchas amarelas no conexivo. Geralmente o Ti_2O_3 tem a cor azulada, junte-se isso a Xantopterina, que também tem a cor amarela. O titânio encontrado nessa amostra, provem de ultra-traços ou micronutrientes encontrados no sangue.

Triatoma lenti, tem manchas amarelas no conexivo, apesar de conter ferro Fe_2O_3 e magnetita na constituição dos pigmentos encontrados no conexivo, isso não influencia na cor do conexivo, pois provavelmente a quantidade de Xantopterina é bastante alta se comparada às nanopartículas.

Triatoma rubrovaria, tem em seu conexivo, manchas vermelhas que quando analisadas por EDS se diferenciam por conter em sua constituição o elemento ferro. E quando analisados os planos atômicos pela medida das distâncias interplanares, verificou-se que as nanopartículas encontradas no conexivo são constituídas por $FeVO_4$. Geralmente o vanadium encontra-se ligado ao ferro mesmo na constituição do sangue humano e de outros animais (Solayman, 2016). Essa composição de Ferro e eritropterina pode reforçar a cor vermelha.

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 hábito 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 as 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_triatomínio_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 Quarai, 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.