

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**BIOATIVIDADE DE BIFLAVONOIDE EXTRAÍDO DE *Luxemburgia nobilis* (Eichl)
(OCHNACEAE) E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrciaria floribunda* Berg.
(MYRTACEAE) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Rhodnius nasutus* Stal, 1859
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE), VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS**

Marcio Borges Pinto Lopes

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**BIOATIVIDADE DE BIFLAVONOIDE EXTRAÍDO DE *Luxemburgia nobilis* (Eichl)
(OCHNACEAE) E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrciaria floribunda* Berg.
(MYRTACEAE) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Rhodnius nasutus* Stal, 1859
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE), VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS**

MARCIO BORGES PINTO LOPES

Sob a Orientação da Professora

Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas**, Área de Concentração em Zoologia.

Seropédica, RJ

Abril de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

MARCIO BORGES PINTO LOPES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de Concentração em Zoologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 16 de abril de 2014

Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz - FIOCRUZ

Dr. José Mario d'Almeida - UFF

Dr. Antonio José Mayhé Nunes – UFRRJ

Dra. Jacenir dos Santos Mallet - FIOCRUZ

“O conhecimento serve para
encantar as pessoas e não para
humilhá-las.”

Mário Sérgio Cortella

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu chegar onde estou hoje, tornando isso tudo possível.

Agradeço à idealizadora e incentivadora deste projeto, Dra. Margareth M. de Carvalho Queiroz, a quem tenho profundo respeito como pessoa, professora e pesquisadora.

À Dra. Jacenir Reis Santos Mallet, pela oportunidade de incrementar esse estudo com a utilização da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

À Dra. Ana Amaral e ao Dr. Mário Geraldo por não só fornecer as substâncias para realização desse estudo, mas pelas sugestões no decorrer do trabalho.

À minha amiga Renata Rocha Pessanha, por me ajudar sempre nos momentos de dificuldade, porque sem a ajuda dela, muita coisa não se realizaria.

A todos os colegas pelas importantes ajudas no decorrer do trabalho e as descontrações em laboratório: Alexandre, Carlos, César, Eliane, Felipe, Idelsy, Isabel, Izadora, Lorrane, Lucas, Luiz, Marina, Paloma, Raquel, Rebecca, Rodrigo, Viviane, Vitor, Tayra e Zeneida pelo ótimo convívio.

Agradeço à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, bem como a todo o corpo docente por ter me oferecido um curso do qual me recordarei sempre.

Em especial aos meus pais, minha irmã e irmão, por participarem positivamente em todos os momentos da minha vida e sempre torcendo por mim.

Aos que de qualquer forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

RESUMO

LOPES, Marcio Borges Pinto. **Bioatividade de biflavonoide extraído de *Luxemburgia nobilis* (Eichl) (Ochnaceae) e do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* Berg. (Myrtaceae) sobre o desenvolvimento de *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae), vetor da Doença de Chagas.** 2014. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Animal) Instituto de Biologia, Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O controle da doença de Chagas depende de ações eficazes contra os vetores, dentre os quais se encontram insetos hematófagos como o barbeiro *Rhodnius nasutus*. O controle químico tem sido amplamente utilizado, mas gera riscos ao ambiente e pode ser tóxico para outros animais. Sendo assim, faz-se necessária a busca de métodos alternativos, como substâncias naturais extraídas de plantas. Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos dos biflavonoide (Lophirona B) extraído de *Luxemburgia nobilis* (Eichl) (Ochnaceae) e do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* Berg. (Myrtaceae) sobre o desenvolvimento de *R. nasutus*. Com o intuito de avaliar o efeito destas substâncias, utilizaram-se como parâmetros o período de desenvolvimento de ninfa de 5º estágio a adulto, longevidade do adulto e alterações morfológicas. Além disso, buscou-se determinar a toxicidade, a atividade repelente e inibidora da alimentação. Para isso, foi aplicada biflavonoide e óleo essencial topicamente na parte ventral das ninfas, nas concentrações de 10, 25 e 50%, e 137,5 (1µL) e 275µg (2µL), respectivamente. Foram utilizados triatomíneos da espécie *R. nasutus* de ninfa de 5º estágio criados em laboratório (F5). Estes insetos foram separados em grupos teste e controle, contendo 90 indivíduos por grupo (30 indivíduos por repetição) para o teste com biflavonoide (Lophirona B) e 30 indivíduos por grupo (10 indivíduos por repetição) para o teste com o óleo essencial. Após a aplicação da substância, as ninfas foram individualizadas e acondicionadas em tubos de ensaio recoberto por tecido náilon preso por um elástico e contendo uma tira de papel de filtro no seu interior, a qual serviu de suporte para a movimentação do inseto. As ninfas foram pesadas individualmente em balança analítica, antes e após a aplicação da substância em intervalos de 24, 48 e 72 horas. Após a primeira semana, as ninfas foram pesadas antes e após a alimentação *in vivo*, realizadas semanalmente e com duração média de 30 minutos cada. Foram alimentados em camundongos (*Mus musculus*) em aparato artificial, confeccionado em isopor, apresentando em sua superfície basal uma concavidade na qual o camundongo era inserido, e na apical encontravam-se cinco orifícios onde eram inseridos os tubos de ensaio contendo os triatomíneos. As observações foram realizadas a cada dois dias, onde eram analisados o número de ecdises e a mortalidade dos insetos. A partir das observações realizadas, concluiu-se que a Lophirona B e o óleo essencial apresentaram um decréscimo na quantidade de sangue ingerido e no período de desenvolvimento de ninfa de 5º estágio a adulto de acordo com o aumento da concentração. Na perda de peso, a Lophirona B (18,3, 19,8 e 8,4, respectivamente 10, 25 e 50%) e o óleo essencial (6,6 e 23,1, respectivamente, MF1 e MF2) apresentaram uma maior perda de peso de acordo com que a concentração aumentava. Já na longevidade dos adultos as substâncias demonstraram resultados inversos, onde a Lophirona B (25,4, 25,2 e 24,7, respectivamente, 10, 25 e 50%) e o óleo essencial (19,6 e 19 dias, respectivamente, MF1 e MF2) sendo aproximadamente a metade do grupo controle puro. Na mortalidade das ninfas a Lophirona B apresentou 35, 44, 60% (10, 25 e 50%, respectivamente) das ninfas do grupo teste e o óleo essencial 57 e 83% (MF1 e MF2, respectivamente) das ninfas em menos de 60 segundos. Apenas a Lophirona B causou deformidade e em 34, 48 e 67% (10, 25 e 50%, respectivamente) dos adultos.

Palavras-chave: Produtos naturais, Triatomine, Controle vetorial, Condições de laboratório.

ABSTRACT

LOPES, Marcio Borges Pinto. **Bioactivity of biflavonoid extracted of *Luxemburgia nobilis* (Eichl) (Ochnaceae) and essential oil of *Myrciaria floribunda* Berg. (Myrtaceae) on the development of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae), vector of Chagas Disease.** 2014. 67p. Thesis (Master in Sciences Biology, Animal Biology). Instituto de Biologia, Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The control of Chagas disease depends on the effective action against the vectors (bloodsucking insects such as *Rhodnius nasutus*). Chemical control has been widely used however; it creates risks to the environment and can be toxic to other animals. Therefore, it is necessary to search for alternative control methods, such as natural substances extracted from plants. This study aimed to investigate the effect of the biflavonoid (Lophirona B) extracted of *Luxemburgia nobilis* (Eichl) (Ochnaceae) and essential oil extracted of *Myrciaria floribunda* Berg. (Myrtaceae) on the development *R. nasutus*. Aiming to evaluate the effect of that substance, the parameters used were the period of development 5th instar nymphs to adults, adult longevity and morphological changes. In addition, we sought to determine toxicity, repellent activity, and inhibition of feeding. For this, we applied biflavonoid and essential oil topically to the ventral part of the nymphs, at concentrations of 10, 25 and 50%, 137.5 (1 μ L) and 275 μ g (2 μ L), respectively. Fifth instar nymphs of *R. nasutus* belonging to the third laboratory generation (F5) were used. These insects were divided into test and control groups containing 90 individuals per group (three replications of 10 individuals each) for the test with biflavonoid (Lophirona B) and 30 individuals for group (three replications of 30 individuals each) for the test with essential oil. After the application of the substance, they were separated individually in test tubes containing a filter paper which provided support for the movement of the insect and were covered with nylon fabric fastened with an elastic band. The nymphs were individually weighed on an analytical scale before and after the application of the substance at intervals of 24, 48 and 72 hours. After the first week, the nymphs were weighed before and after feeding *in vivo*, and fed weekly for approximately 30 minutes each. They were fed on mice (*Mus musculus*) in an artificial apparatus that was made of Styrofoam, that had on its underlying surface a basal concavity in which the mice were maintained, and top five holes where the test tubes containing the triatomines were inserted. The observations were made every two days, when we analyzed the number of ecdysis and mortality of the insects. From the observations, it was concluded that the Lophirona B and essential oil showed a decrease in the quantity of ingested blood and the development period of fifth instar nymphs to adult according to the concentration. In losing weight, Lophirona B (18.3, 19.8 and 8.4, respectively 10, 25 and 50%) and essential oil (6.6 and 23.1, respectively, MF1 and MF2) had a higher weight loss in accordance with the concentration increased. Since longevity in adult substances opposite results demonstrated where Lophirona B (25.4, 25.2 and 24.7, respectively, 10, 25 and 50%) and essential oil (19.6 and 19 days, respectively, MF1 and MF2) being approximately half of the control. Mortality of the nymphs Lophirona B had 35, 44, 60% (10, 25 and 50%, respectively) of the nymphs of the test group and the essential oil 57 and 83 % (MF1 and MF2, respectively) nymphs in less than 60 seconds. Only Lophirona B showed morphological alterations 34, 48 and 67% (10, 25 and 50%, respectively) in adults.

Key words: Natural Products, Triatomine, Vector Control, Laboratory conditions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colônia de <i>Rhodnius nasutus</i> criados em condições de laboratório.....	8
Figura 2. Cristalizador contendo as sanfonas de papel filtro, onde foram criados os triatomíneos (<i>Rhodnius nasutus</i>), em condições de laboratório	9
Figura 3. Balança analítica (de precisão) onde foi realizada a pesagem dos triatomíneos da espécie <i>Rhodnius nasutus</i>	11
Figura 4. Aparato artificial para alimentação de <i>Rhodnius nasutus</i> , com camundongo.....	12
Figura 5. Aparato artificial para alimentação dos triatomíneos da espécie <i>Rhodnius nasutus</i> , superfície inferior.....	12
Figura 6. Aparato artificial para alimentação de <i>Rhodnius nasutus</i> , superfície superior.....	13
Figura 7. Aparato artificial para alimentação de <i>Rhodnius nasutus</i> , vista lateral.....	13
Figura 8. Aparato artificial para alimentação de <i>Rhodnius nasutus</i>	14
Figura 9. Relação da Média de perda de peso (mg) de <i>Rhodnius nasutus</i> , entre os grupos controle e tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , criados em laboratório e alimentados em camundongos.....	16
Figura 10. Dendrograma demonstrando a relação de mortalidade de ninfas de <i>Rhodnius nasutus</i> , entre o controle e os grupos tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , sob condições de laboratório.....	22
Figura 11. Micrografia eletrônica de varredura da visão dorsal do tórax de <i>Rhodnius nasutus</i> pertencentes ao grupo controle, sem deformidades.....	24
Figura 12. Micrografia eletrônica de varredura da visão dorsal do tórax de um adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> pertencentes ao grupo tratado com diferentes concentrações de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , com deformidade na inserção das asas (ins.).....	25
Figura 13. Micrografia eletrônica de varredura da visão da região posterior do abdômen de <i>Rhodnius nasutus</i> pertencentes ao grupo controle, sem deformidades.....	25
Figura 14. Micrografia eletrônica de varredura da visão da região posterior de <i>Rhodnius nasutus</i> adulto pertencentes ao grupo tratado com biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , com deformidades nas asas (as.) e abdômen (abd.).....	26
Figura 15. Micrografia eletrônica de varredura da visão das pernas do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> pertencentes ao grupo controle, sem deformidades.....	26
Figura 16. Micrografia eletrônica de varredura da visão das pernas do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> pertencentes ao grupo tratado com biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , com deformidades nas pernas (per.).....	27
Figura 17. Micrografia eletrônica de varredura da visão lateral do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> pertencentes ao grupo controle, sem deformidades.....	27
Figura 18. Micrografia eletrônica de varredura da visão dorsal do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> adulto pertencentes ao grupo tratado com biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , com deformidades na inserção da cabeça (ins.).....	28
Figura 19. Micrografia eletrônica de transmissão do estômago do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> adulto pertencentes ao grupo controle (Puro).....	28
Figura 20. Micrografia eletrônica de transmissão do estômago do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> adulto pertencentes ao grupo controle (Metanol).....	29
Figura 21. Micrografia eletrônica de transmissão do estômago do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> adulto pertencentes ao grupo tratado (10%) com biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i>	29
Figura 22. Micrografia eletrônica de transmissão do estômago do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> adulto pertencentes ao grupo tratado (25%) com biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i>	30
Figura 23. Micrografia eletrônica de transmissão do estômago do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> adulto pertencentes ao grupo tratado (50%) com biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i>	30

Figura 24. Média de perda de peso (mg) de <i>Rhodnius nasutus</i> , entre os grupos controle e tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Myrciaria floribunda</i> , criados em laboratório e alimentados em camundongos.....	31
Figura 25. Dendrograma demonstrando a relação de mortalidade ninfal de <i>Rhodnius nasutus</i> , entre o controle e os grupos tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Myrciaria floribunda</i> , sob condições de laboratório.....	37
Figura 26. Micrografia eletrônica de varredura do espiráculo do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> pertencentes ao grupo controle puro.....	38
Figura 27. Micrografia eletrônica de varredura do espiráculo do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> pertencentes ao grupo tratado.....	38
Figura 28. Micrografia eletrônica de varredura da genitália do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> pertencentes ao grupo controle puro.....	39
Figura 29. Micrografia eletrônica de varredura da genitália do adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> pertencentes ao grupo tratado.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1a. Diferença de peso (mg) de <i>Rhodnius nasutus</i> tratados com diferentes concentrações (10, 25 e 50%) de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , antes e após a alimentação (1 ^a a 5 ^a semana) em condições de laboratório.....	18
Tabela 1b. Diferença de peso (mg) de <i>Rhodnius nasutus</i> tratados com diferentes concentrações (10, 25 e 50%) de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , antes e após a alimentação (6 ^a a 10 ^a semana) em condições de laboratório.....	18
Tabela 1c. Diferença de peso (mg) de <i>Rhodnius nasutus</i> tratados com diferentes concentrações (10, 25 e 50%) de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , antes e após a alimentação (11 ^a a 17 ^a semana) em condições de laboratório.....	19
Tabela 2. Desenvolvimento de <i>Rhodnius nasutus</i> (ninfa de 5 ^o estágio / adulto), tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , em condições de laboratório.....	20
Tabela 3. Longevidade dos adultos de <i>Rhodnius nasutus</i> , tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , em condições de laboratório.....	20
Tabela 4. Mortalidade das ninfas de 5 ^o estágio e percentual (%) de adultos mortos e com alterações morfológicas (%) de <i>Rhodnius nasutus</i> , tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , em condições de laboratório.....	21
Tabela 5a. Deformidades nos adultos de <i>Rhodnius nasutus</i> , tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , em laboratório.....	23
Tabela 5b. Deformidades simultâneas em adultos de <i>Rhodnius nasutus</i> , tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de <i>Luxemburgia nobilis</i> , em laboratório.....	23
Tabela 6a. Diferença de peso de <i>Rhodnius nasutus</i> tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Myrciaria floribunda</i> antes e após a alimentação (1 ^a a 5 ^a semana), em condições de laboratório.....	33
Tabela 6b. Diferença de peso de <i>Rhodnius nasutus</i> tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Myrciaria floribunda</i> antes e após a alimentação (6 ^a a 10 ^a semana), em condições de laboratório.....	33
Tabela 6c. Diferença de peso de <i>Rhodnius nasutus</i> tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Myrciaria floribunda</i> antes e após a alimentação (11 ^a a 17 ^a semana), em condições de laboratório.....	34
Tabela 7. Média do tempo de desenvolvimento de ninfa de 5 ^o estágio a adulto de <i>Rhodnius nasutus</i> , tratados com diferentes concentrações (137,5µg = MF1 e 275µg = MF2) do óleo essencial de <i>Myrciaria floribunda</i> , alimentadas em camundongos, em condições de laboratório.....	35
Tabela 8. Longevidade dos adultos de <i>Rhodnius nasutus</i> , tratados com diferentes concentrações (137,5µg = MF1 e 275µg = MF2) do óleo essencial de <i>Myrciaria floribunda</i> , em condições de laboratório.....	35
Tabela 9. Mortalidade de ninfas de 5 ^o de <i>Rhodnius nasutus</i> estágio durante o experimento e em menos de 60 segundos (% e número absoluto), tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Myrciaria floribunda</i> , sob condições de laboratório.....	36

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Família Reduviidae - Subfamília Triatominae.....	3
2.2. <i>Rhodnius nasutus</i>	3
2.3. Controle Vetorial.....	3
2.4. Família Ochnaceae (<i>Luxemburgia nobilis</i> (Eichl)).....	4
2.5. Família Myrtaceae (<i>Myrciaria floribunda</i> Berg.).....	5
3. OBJETIVO GERAL.....	6
3.1. Objetivos Específicos.....	6
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
4.1. Manutenção da colônia de <i>Rhodnius nasutus</i> em laboratório.....	7
4.2. Etapa Experimental.....	9
4.2.1. Ensaios com Biflavonoide (Lophirona B) extraído de <i>Luxemburgia nobilis</i>	9
4.2.2 Experimento.....	9
4.2.3. Ensaios com Óleo essencial extraído de <i>Myrciaria floribunda</i>	10
4.2.4. Experimento.....	10
4.2.5. Atividade da substância e concentração letal.....	14
4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	14
4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1. <i>Luxemburgia nobilis</i> sobre <i>Rhodnius nasutus</i>	16
5.2. <i>Myrciaria floribunda</i> sobre <i>Rhodnius nasutus</i>	300
7. CONCLUSÕES.....	400
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	411
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	422

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma antropozoonose do continente americano que se estende do sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile, com forte incidência no Brasil. É causada pelo protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. Esta doença pode evoluir da forma aguda para uma forma crônica que pode causar cardiopatia chagásica e manifestações digestivas (megacólon e/ou megaesôfago) dentre outras formas da doença (Silveira, 2000; Rey, 2008).

A forma aguda da doença é marcada por uma lesão inicial, que são alterações anátomo-fisiopatológicas e inflamação na área da picada, esta última decorrente da hipersensibilidade à secreção salivar do triatomíneo. Quando a entrada do parasito ocorre na região periocular, essas alterações são conhecidas como sinal de Romana, enquanto outras formações de tumores cutâneos constituem os chamados chagomas de inoculação (Brenner *et al.*, 2000; Rey, 2008). A forma crônica da doença se manifesta de três maneiras, sendo elas: assintomática (indeterminada), oligossintomática e a forma crônica clássica (determinada).

A principal forma de transmissão da doença de Chagas é a vetorial, sendo a maior parte das infecções dos humanos e de outros animais vertebrados, produzida através do contato da pele ou de mucosas, com fezes ou urina dos vetores, insetos hematófagos contaminados com *T. cruzi*. Entretanto, as demais formas de transmissão não podem ser descartadas, como a via congênita (Dias, 1994), e os riscos ocasionais de transmissão: por acidentes de laboratório; manejo de animais infectados; transplante de órgãos, por intermédio do leite materno ou fissura mamilar e por via oral, ou seja, ingestão de alimentos contendo o triatomíneo contaminado (Brasil, 2008). A transmissão por via oral ocorre principalmente na região amazônica pelo consumo de açaí, sendo responsável por 80% dos casos de contaminação da doença por via oral no Brasil segundo a Secretária de Saúde Pública - SESP (Diário do Pará, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica que há pelo menos 35 milhões de indivíduos expostos nas Américas, onde a doença de Chagas provoca aproximadamente 10.000 mortes por ano (Unicef, 2008). A emigração de pessoas infectadas das zonas endêmicas (América Latina) para outros países não endêmicos tem se acentuado, especialmente os Estados Unidos e alguns países da Europa (Espanha, Itália e França), mas também para o Japão e Austrália (Rassi *et al.*, 2009). O problema dessas emigrações é que em países que não são endêmicos as medidas tomadas para a prevenção da doença (verificação sorológica em bancos de sangue etc.) não têm sido extensivamente adotada.

Os hospedeiros invertebrados e vetores de *T. cruzi* são insetos pertencentes à Ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Todos os triatomíneos são obrigatoriamente hematófagos sendo conhecidos popularmente por barbeiros, bicudos etc. A maioria das espécies ocorre nas Américas, com exceção do gênero *Linshcosteus* (Distant 1904) na Índia e de *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) que está distribuído em todas as regiões tropicais. Naturalmente esses insetos habitam o ambiente silvestre, onde se alimentam do sangue dos animais que ali vivem, tais como marsupiais, edentados, roedores, carnívoros, morcegos e aves. Muitos triatomíneos tornaram-se peridomiciliares, ocorrendo em estábulos, currais, chiqueiros e galinheiros. Nas habitações humanas, além do homem, se alimentam também do sangue de animais mamíferos domésticos, nos quais podem transmitir uma infecção natural muito semelhante à humana (Schofield, 1988, Schofield & Galvão, 2009).

Destes apenas três gêneros possuem importância médica, sendo eles *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Pereira *et al.*, 2010). Segundo Lima *et al.* (2008), várias espécies

do gênero *Rhodnius* são importantes vetores do *T. cruzi*, dentre eles *Rhodnius nasutus* Stal, 1859.

Rhodnius nasutus é uma espécie de triatomíneo silvestre que tem distribuição geográfica restrita ao nordeste semiárido do Brasil (Dias, 2000). Em estudos realizados no Piauí, diversos autores relataram que *R. nasutus* coloniza ecótopos naturais como ninhos de pássaros e palmeiras, principalmente as palmeira de babaçu (*Orbignya martiana* Barb.) e as palmeira de carnaúba (*Copernicia cerifera* Mart.) e em menor número em ecótopos artificiais. Esta espécie foi capturada em 95% das 55 *O. martiana* examinadas na área urbana de Teresina e em 78% das 50 *C. cerifera*, pesquisada em diversos municípios do Estado e com um índice de 26,2 e 4,0% de infecção para o *T. cruzi*, respectivamente (Bento *et al.*, 1989, 1992). Soares *et al.* (1995) observaram que diversos insetos adultos e ninfas têm sido encontrados em ecótopos artificiais, na zona rural de Teresina, Piauí, com uma taxa de 30% de infecção. Para Bento *et al.* (1989; 1992), o registro da ocorrência de *R. nasutus* no peridomicílio pode ser indicativo de adaptação às habitações humanas, o que aumenta o potencial vetorial desta espécie pela possibilidade de participação na transmissão da doença de Chagas, no Piauí.

No Ceará, *R. nasutus* tem sido encontrada com frequência no peridomicílio e intradomicílio, demonstrando assim importância na transmissão da doença de Chagas. O índice de infecção encontrado pelo *T. cruzi* foi de 16,8% e sendo também encontrado infectado pelo *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 no estado do Ceará, com índice de infecção natural de 7,7% nos insetos analisados (Diotaiuti, 2007). Neste estado, têm sido descrito diversos casos de transmissão da doença de Chagas humana transmitida por *R. nasutus*, juntamente com *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, onde estas espécies de triatomíneos coletadas, encontravam-se infectadas com níveis elevados de *T. cruzi*. De acordo com Lima & Sarquis (2007), com o desmatamento da carnaúba (*C. cerifera*) para criação de gado e para o desenvolvimento agrícola no estado do Ceará está ocasionando a diminuição do ambiente silvestre onde a espécie ocorre, levando-a a ser colonizada no ambiente peri-urbano.

Apesar de *R. nasutus* ser considerada uma espécie tipicamente silvestre, que coloniza ecótopos naturais como ninhos de pássaros e palmeiras, atualmente esta espécie tem sido registrada no peri-domicílio, indicando a adaptação às habitações humanas como relatado anteriormente, aumentando o potencial vetorial desta espécie. Desta forma, fica clara a importância da realização de ações de controle desta espécie.

A principal forma de controle destes insetos é baseada no uso de inseticidas químicos, no entanto, a residualidade destes produtos causa danos toxicológicos ao ambiente, assim como aos humanos e outros animais. O controle biológico de insetos de importância em saúde pública objetiva uma metodologia segura ao homem que não causem contaminação ambiental, porém, questionável quanto à sua eficiência devido aos mecanismos de resistência. Baseado nestas informações é de suma importância a busca contínua de substâncias naturais extraídas de plantas que atuem como inseticidas. Sendo assim, no intuito de ampliar o conhecimento sobre a ação de substâncias naturais, será estudada a influência de biflavonoides extraídos de *Luxemburgia nobilis* (Eichl) (Ochnaceae) e do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* Berg. (Myrtaceae), sobre ninfas de 5º estágio de *R. nasutus*, vetores da doença de Chagas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Reduviidae - Subfamília Triatominae

Reduviidae é um grande grupo de insetos predadores e hematófagos, contendo cerca de 6.250 espécies e subespécies de 913 gêneros e 25 subfamílias (Maldonado Capriles, 1990). Caracterizando a morfologia externa desta família podemos citar a cabeça livre, estreitando-se em pescoço para trás e geralmente dividida em dois lóbulos separados por um sulco ou depressão transversa interocular. Apresentam o rostro mais ou menos robusto, com um lábio de três segmentos, geralmente recurvado em gancho, de modo a formar, com o perfil inferior da cabeça, em um ângulo reto e, em repouso, encostado à face inferior da cabeça ou dela pouco afastado, tendo a ponta do rostro em repouso, atingindo o sulco prosternal, transversalmente estriado, chamado “sulco estridulatório” pela maioria dos autores. Antenas, geralmente, de quatro segmentos, às vezes, com maior número, quando um ou dois desses segmentos se apresentam subdivididos em dois ou mais subsegmentos. Pernas, pouco diferenciadas, do tipo ambulatório nas anteriores, entretanto, na maioria das espécies, apresentam os fêmures consideravelmente dilatados e não raro com estes e, às vezes, também, as tíbias, armados de dentes ou espinhos em baixo (Costa-Lima, 1940).

Nesta família apenas a subfamília Triatominae realiza hematofagia, as demais subfamílias são compostas por insetos predadores, sendo atualmente composta por cinco tribos, 18 gêneros e 146 espécies (Pereira *et al.*, 2010). Em nível taxonômico essa subfamília é caracterizada por apresentar hemiélitros bem desenvolvidos, porém sem o cúneo. Rostro reto, fino, de comprimento quase igual ou ligeiramente superior à cabeça. Sulco transversal pós-ocular pouco nítido. Escutelo com uma ponta só no ápice e as fêmeas põem ovos isolados (Costa-Lima, 1940).

2.2 *Rhodnius nasutus*

A distribuição geográfica do *R. nasutus*, está restrita ao Nordeste do Brasil, incluindo os estados do Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (Bento *et al.*, 1989, 1992; Galvão *et al.*, 2003). Esta espécie é considerada de importância secundária na transmissão do *T. cruzi* (Alencar, 1987).

Em geral, tem tamanho de dois a três centímetros, apresentam a cabeça longa, os olhos salientes, rostro dobrado sob a cabeça, sendo curto e reto, não ultrapassando as antenas. A partir do seu tubérculo antenífero se diferencia o gênero *Rhodnius* dos demais, onde neste se apresentam próximo à extremidade anterior da cabeça (Argolo *et al.*, 2008).

Em nível taxonômico *R. nasutus*, pode ser identificada a partir de alguns caracteres, como a antena que apresenta o terceiro segmento com a parte basal clara e a apical escura, as pernas de cor uniforme, castanha clara, apenas as tíbias enegrecidas no ápice e cabeça distintamente mais longa que o tórax (Lent & Wygodzinsky, 1979).

2.3 Controle Vetorial

Existem diversos tipos de controle de vetores, dentre eles o controle mecânico que compreende técnicas simples, porém eficazes representando alto investimento inicial, mas compensando por terem resultados permanentes, porque envolvem ações de saneamento básico e de educação ambiental. Essas ações envolvem coleta e destino adequado para o lixo, destruição de criadouros etc. (FUNASA, 2001).

O controle químico compreende o uso de produtos químicos para controlar ou eliminar os insetos alvos sendo, entretanto, utilizado como última alternativa, ou seja, em casos emergenciais ou quando não há alternativa (FUNASA, 2001).

Já o controle biológico consiste na diminuição dos insetos alvos utilizando inimigos naturais específicos como, predadores, parasitoides, patógenos e toxinas ou substâncias obtidas de vegetais (FUNASA, 2001).

Certas substâncias quando provadas por espécies herbívoras têm a propriedade de interromper a alimentação dos insetos, podendo este efeito, dependendo da eficácia do repelente, ser temporário ou permanente. Essas substâncias podem agir estimulando o sistema nervoso, variando sua especificidade de inseto para inseto. São geralmente específicas para determinadas espécies de insetos, não causando diretamente a morte, mas inibindo suas funções fisiológicas e bioquímicas. Além disso, são substâncias especiais pela sua interferência no sistema endócrino dos insetos, que é o responsável pelo desenvolvimento, metamorfose, reprodução e controle de outros processos do metabolismo, representando um ponto vulnerável no ciclo de vida destes artrópodes (Stoka, 1987).

Estes compostos naturais extraídos de plantas têm sido atrativos para as indústrias, desde 1990, devido à utilização de produtos naturais na agropecuária e em saúde pública.

Calcula-se que 16% das cerca de 500.000 espécies de plantas existentes no mundo encontram-se na floresta Amazônica. Apesar disso, a pesquisa de substâncias ativas derivadas de plantas no Brasil ainda é muito incipiente. Até o início da década de 1980 foi estimado que menos de 1% das espécies da flora brasileira tinham seus constituintes químicos conhecidos. Mesmo considerando um crescimento significativo desse percentual, ainda há uma lacuna de desconhecimento da nossa flora. Nesse sentido, isolar, caracterizar e desenvolver bioensaios com compostos extraídos de plantas para o controle de vetores ou de causadores de doenças é papel extremamente relevante. (EMBRAPA-AM, 2010).

2.4 Família Ochnaceae (*Luxemburgia nobilis* (Eichl))

A família Ochnaceae pertence à ordem Malpighiales (APG, 1998) e compreende cerca de 28 gêneros e 400 espécies de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo mundo (Dahlgren, 1980). No Brasil ocorrem aproximadamente nove gêneros com 105 espécies (Joly, 1988), dentre esses gêneros está *Luxemburgia*, tendo sua distribuição restrita ao Brasil. São constituídas por 105 espécies essencialmente arbóreas ou arbustivas, encontradas naturalmente em campos rupestres e afloramentos rochosos, sendo facilmente reconhecidas por apresentarem as folhas denteadas com cílios no ápice e pelas flores amarelas zigomorfas, devido ao agrupamento dos estames em apenas um lado da flor (Feres, 2001).

A diversidade da flora brasileira apresenta um imenso potencial para a produção de compostos. A utilização de plantas no tratamento de doenças apresenta influências da cultura indígena e da população migrante que utilizam, por exemplo, a casca e as folhas do gênero *Luxemburgia* na prevenção e combate à arteriosclerose, estimulante da circulação e nefrites (Plantemed, 2010). A espécie *Luxemburgia nobilis* possui como sinônimos *Luxemburgia gaudichaudii* Tiegh e *Luxemburgia elegans* Dwyer (Feres, 2001).

As espécies de Ochnaceae distribuídas pelo país recebem denominações específicas como Angelim (*Ouratea vaccinoides*), Caju Bravo (*Ouratea floribunda* e *Ouratea salicifolia*) e Coração de Bugre (*Ouratea parviflora*). *Ouratea floribunda* e *Ouratea castanaefolia* são empregadas em ornamentação urbana. No Nordeste, as espécies desse gênero são conhecidas como batiputá (Barroso, 1986).

As espécies de Ochnaceae são capazes de biossintetizar flavonoides e biflavonoides, sendo essa família melhor representada pelos gêneros *Ouratea*, *Luxemburgia*, *Ochna* e *Lophira* (Thi *et al.*, 1992; Messanga *et al.*, 2002). A primeira biflavona foi isolada em 1929 e

é conhecida como gingentina. Desde então mais de mil biflavonoides foram isolados de plantas e muitas atividades biológicas, têm sido relacionadas a elas (Lin *et al.*, 1999).

2.5 Família Myrtaceae (*Myrciaria floribunda* Berg.)

A família Myrtaceae compreende cerca de 3600 espécies, distribuídas em aproximadamente 150 gêneros. Suas espécies são encontradas principalmente em regiões de clima tropical e temperado (Limberger & Sobral, 2004). No Brasil esta família é amplamente encontrada, possuindo 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies. O gênero *Myrciaria* possui espécies do México ao Caribe e até o norte da Argentina (Landrun & Kawasaki, 1997).

Myrciaria floribunda é uma espécie frutífera nativa da região amazônica, conhecida popularmente como camu arbóreo (Pícon *et al.*, 1987). Sendo considerada arvoreta a árvore de grande porte com folhas pequenas, cartáceas, apresentando lâmina ondulada com pontuações visíveis, nervura central na face adaxial biconvexa e pecíolo enegrecido (Ribeiro *et al.*, 2002).

Entre várias espécies da família Myrtaceae destaca-se o fruto Cambuí que pertence à espécie *Myrciaria floribunda* que é comestível e bastante utilizado pelas populações locais na fabricação de polpas, sucos, sorvetes, vinhos e licores por apresentar um alto teor de vitamina C que pode variar até 1526 mg por 100 g de polpa (López *et al.*, 2006; Santos, 2010).

O óleo essencial dessa espécie também é descrito com importância antimicrobiana, anti-inflamatória e como agente anticancerígeno (Apel *et al.*, 2006).

Sua distribuição geográfica no Brasil estende-se do Pará até o alto do rio Amazonas, no extremo setentrional brasileiro, no estado de Roraima e ainda no estado de Rondônia bem como a beira de rios em outros países como Venezuela (Rios Casiquiare, Oreda, Pargueni e Caura), Colômbia (Rios Putumayo e Inirida) e na parte ocidental do Peru (Ribeiro *et al.*, 2002; Pinedo *et al.*, 2004).

3. OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos da bioatividade de biflavonoides extraídos de *Luxemburgia nobilis* (Ochnaceae) e do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* (Myrtaceae), sobre ninfas de 5º estágio de *Rhodnius nasutus*, em condições de laboratório.

3.1 Objetivos Específicos

1. Verificar a quantidade de sangue ingerido por ninfas de *R. nasutus* tratadas com biflavonoides (extraídos de *L. nobilis*) e do óleo essencial de *M. floribunda*, alimentados semanalmente em camundongos.

2. Analisar a eficácia de das substâncias sobre a perda de peso de ninfas de *R. nasutus* tratadas com essas substâncias, em laboratório.

3. Avaliar a duração do tempo de desenvolvimento das ninfas de 5º estágio de até adulto de *R. nasutus*, em laboratório.

4. Determinar a longevidade dos adultos de *R. nasutus* tratados com as substâncias, em laboratório.

5. Analisar a mortalidade de ninfas de 5º estágio, durante a ecdise e dos adultos de *R. nasutus* tratados com as substâncias, em laboratório.

6. Observar possíveis as alterações morfológicas nos espécimes de *R. nasutus*, tratados com diferentes concentrações de *L. nobilis* e *M. floribunda*, através da microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

7- Examinar através de microscopia de varredura e microscopia de transmissão os insetos tratados a fim de determinar o(s) local(is) de atuação das substâncias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção da colônia de *Rhodnius nasutus* em laboratório

Os insetos utilizados neste trabalho foram triatomíneos da espécie *R. nasutus* oriundos da cidade de Jaguaruana - CE, área endêmica de doença de Chagas. A alimentação *in vivo* da colônia foi semanal, com duração de aproximadamente uma hora. Os camundongos utilizados foram colocados em envelopes feitos de tela de náilon, presos por grampos. Após o envelopamento foram colocados sobre cristalizadores (recipientes de vidro com capacidade para 5L), sendo estes foram forrados com papel de filtro (Figuras 1 e 2), contendo em seu interior várias sanfonas de papel de filtro dobrado com furos para que os insetos possam circular dentro do recipiente (simulando seu ecótopo silvestre, onde são encontrados nas folhagens de palmeiras, e domiciliares como nas paredes das casas de pau-a-pique e casas de barro, locais onde esses insetos são encontrados normalmente). O papel de filtro, também serviu para retirar o excesso de umidade proveniente das fezes e urina. Os recipientes foram cobertos com tecido de náilon, preso por elásticos. A colônia foi mantida em condições de laboratório, a temperatura de 24 - 30 °C e a umidade relativa do ar de 60 - 85%, sem controle do fotoperíodo.



Figura 1. Colônia de *Rhodnius nasutus* criados em condições de laboratório.
Imagem: Marcio Lopes

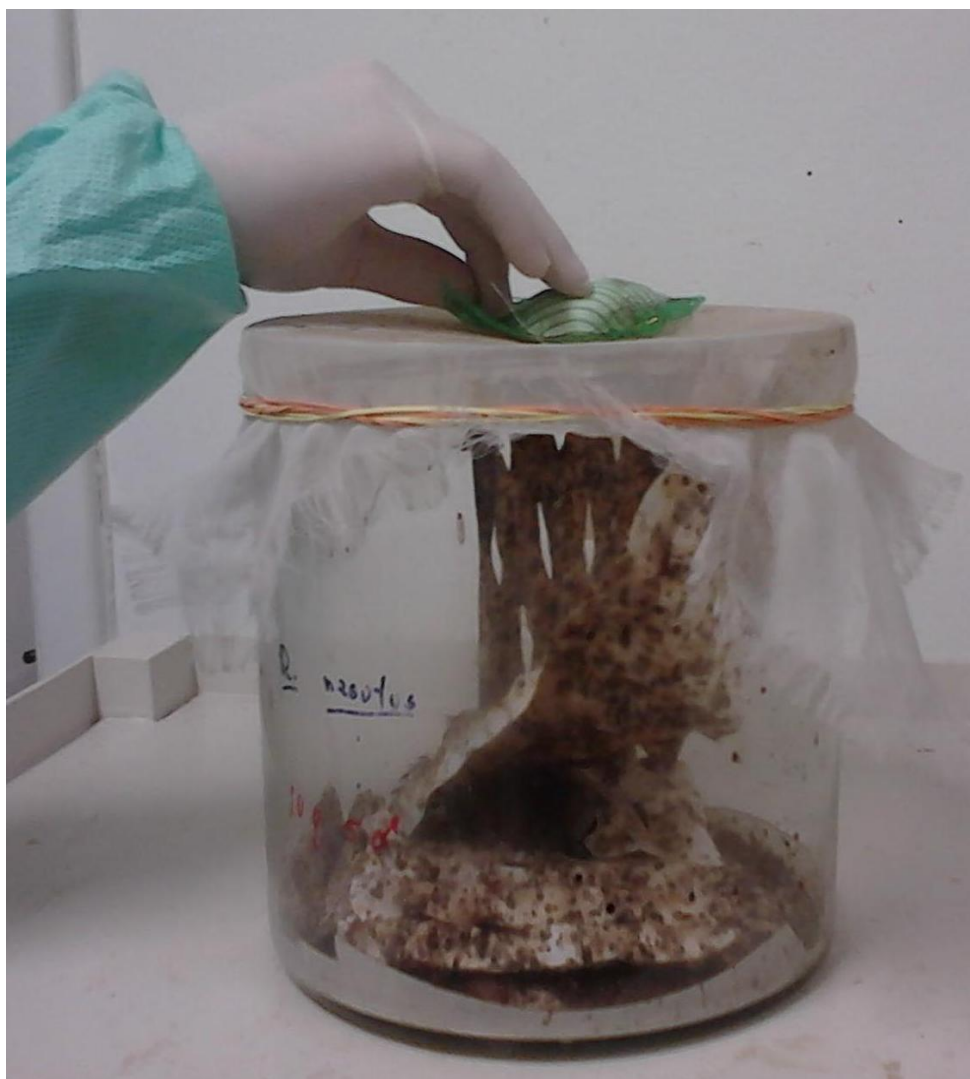


Figura 2. Cristalizador contendo as sanfonas de papel filtro, onde foram criados os triatomíneos (*Rhodnius nasutus*), em condições de laboratório.
Imagem: Marcio Lopes

4.2 Etapa Experimental

4.2.1 Ensaio com Biflavonoide (Lophirona B) extraído de *Luxemburgia nobilis*

A substância utilizada foi o biflavonoide (Lophirona B) de *L. nobilis*, nas concentrações de 10, 25 e 50% (sendo aplicado 1 μ L/inseto do biflavonoide de *L. nobilis*), que foram diluídas em metanol. A droga foi aplicada topicamente por contato na parte ventral do abdômen das ninfas de 5^o estágio, através da utilização de uma micropipeta automática.

4.2.2 Experimento

Foram utilizados triatomíneos da espécie *R. nasutus* de 5^o estágio pertencentes à quinta geração (F5). Os insetos foram separados em grupos teste e grupos controle (sem nenhuma substância ou puro e com metanol), contendo 90 insetos para cada grupo experimental, sendo estes divididos em três subgrupos (A, B e C) de 30 indivíduos cada. Os insetos foram

individualizados e acondicionados em tubos de ensaio contendo uma tira de papel de filtro no seu interior, a qual serviu de suporte para a movimentação do inseto. O recipiente foi recoberto por tecido de náilon (escaline) e este foi preso por elástico. As ninfas (dos grupos teste e controle) foram pesadas individualmente em balança analítica de precisão da marca Gehaka (Figura 3), antes e após o tratamento com a substância, assim como antes e após cada alimentação, onde cada uma teve duração média de 30 minutos, sendo realizada uma vez por semana. Na primeira semana, para todos os grupos do experimento, as observações eram realizadas com intervalo de 24h, 48h e 72 horas após a aplicação da substância. Durante todo o período restante do experimento as observações foram realizadas a cada dois (2) dias, nos quais foram analisados o número de ecdises e a mortalidade. A alimentação *in vivo* foi feita semanalmente em camundongos albinos da espécie *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) em aparato artificial. O aparato foi confeccionado em isopor de maneira onde a superfície basal apresentava uma concavidade na qual o camundongo foi inserido e na superfície apical encontravam-se cinco orifícios onde foram inseridos os tubos de ensaio contendo os triatomíneos (Figuras 4 a 8).

Ao longo do período analisado foi verificada a quantidade de sangue ingerido, ecdise, duração e viabilidade do 5º estágio, assim como a dos adultos e também a longevidade desses insetos. Todas as etapas foram mantidas em condições de laboratório, a temperatura de 24 - 30 °C e a umidade relativa do ar de 60 - 85%, sem controle do fotoperíodo.

Os resultados foram analisados pela análise de Cluster para similaridade de índice conforme o PAST, também foram analisados pela análise de variância (ANOVA 1; $P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1979), a significância estatística foi determinada pelo teste T (Student's *t* test) sendo significativa quando $P \leq 0,05$, e o erro padrão foi calculado através da média dos experimentos. As médias também foram comparadas pelo teste de Tuckey - Kramer ($P \leq 0,05$), quando apresentado significância.

4.2.3 Ensaio com Óleo essencial extraído de *Myrciaria floribunda*

Foi utilizado o óleo essencial de *Myrciaria floribunda*, nas concentrações 137,5µg e 275µg (sendo aplicado 1 e 2µL/inseto, respectivamente), que foram diluídas em Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO). A droga foi aplicada topicamente por contato na parte ventral do abdômen das ninfas de 5º estágio, através da utilização de uma micropipeta automática.

4.2.4 Experimento

Foram utilizados triatomíneos da espécie *R. nasutus* de 5º estágio pertencentes à quinta geração (F5). Os insetos foram separados em grupos teste e grupos controle (sem nenhuma substância ou puro e com DMSO), contendo 30 insetos para cada grupo experimental, sendo estes divididos em três subgrupos (A, B e C) de 10 indivíduos cada. Os insetos foram individualizados e acondicionados em tubos de ensaio contendo uma tira de papel de filtro no seu interior, a qual serviu de suporte para a movimentação do inseto. O recipiente foi recoberto por tecido de náilon (escaline) preso por elástico. As ninfas (dos grupos teste e controle) foram pesadas individualmente em balança analítica de precisão da marca Gehaka (Figura 3), antes e após o tratamento com a substância, assim como antes e após cada alimentação, onde cada uma teve duração média de 30 minutos, sendo realizada uma vez por semana. Na primeira semana, para todos os grupos do experimento, as observações eram realizadas com intervalo de 24, 48 e 72 horas após a aplicação da substância. Durante todo o período restante do experimento as observações foram realizadas a cada dois (2) dias, nos

quais foram analisados o número de ecdises e a mortalidade. A alimentação *in vivo* foi feita semanalmente em camundongos albinos da espécie *M. musculus* em aparato artificial. O aparato foi confeccionado em isopor de maneira que a superfície basal apresentava uma concavidade na qual o camundongo foi inserido e na superfície apical encontravam-se cinco orifícios onde foram inseridos os tubos de ensaio contendo os triatomíneos (Figuras 4 a 8).

Ao longo do período analisado foi verificada a quantidade de sangue ingerido, ecdises, duração e viabilidade do 5º estágio, assim como a dos adultos e também a longevidade desses insetos. Todas as etapas foram mantidas em condições de laboratório, a temperatura de 24 - 30 °C e a umidade relativa do ar de 60 - 85%, sem controle do fotoperíodo.

Os resultados foram analisados pela análise de Cluster para similaridade de índice conforme o PAST, também foram analisados pela análise de variância (ANOVA 1; $P \leq 0,05$) (Sokal e Rohlf, 1979), a significância estatística foi determinada pelo teste T (Student's *t* test) sendo significativa quando $P \leq 0,05$, e o erro padrão foi calculado através da média dos experimentos. As médias também foram comparadas pelo teste de Tuckey - Kramer ($P \leq 0,05$), quando apresentado significância.



Figura 3. Pesagem dos triatomíneos (*Rhodnius nasutus*) em balança analítica (de precisão), em laboratório.

Imagem: Renata Rocha



Figura 4. Aparato artificial para alimentação dos triatomíneos da espécie *Rhodnius nasutus*, com camundongo.
Imagem: Marcio Lopes

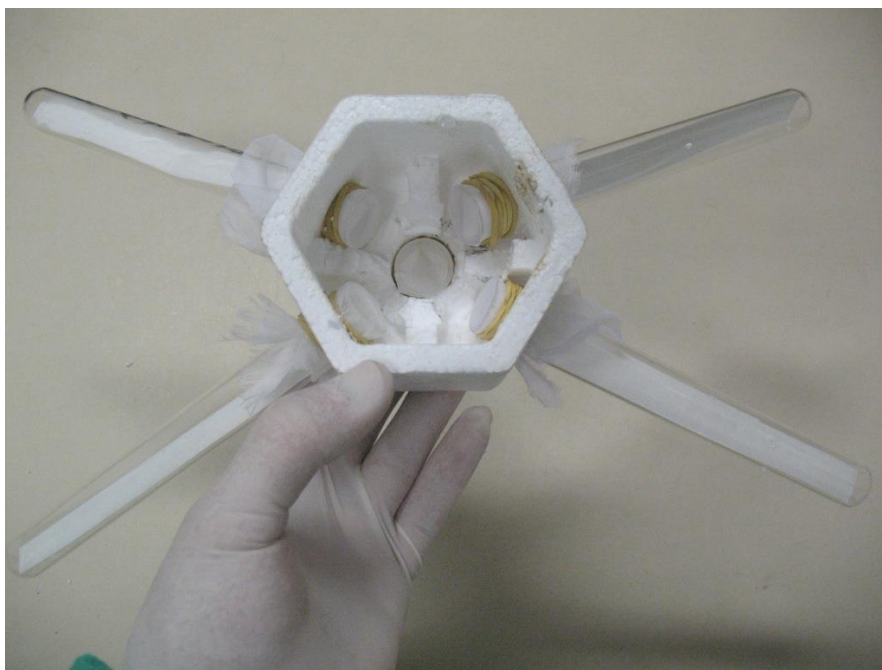


Figura 5. Aparato artificial para alimentação dos triatomíneos da espécie *Rhodnius nasutus*, superfície inferior.
Imagem: Marcio Lopes

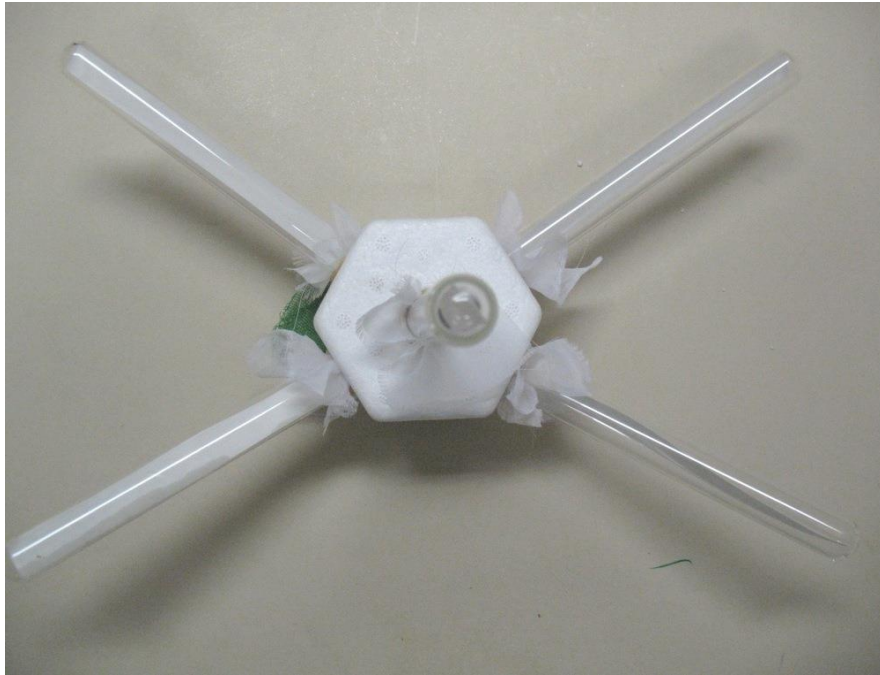


Figura 6. Aparato artificial para alimentação dos triatomíneos da espécie *Rhodnius nasutus*, superfície superior.
Imagem: Marcio Lopes

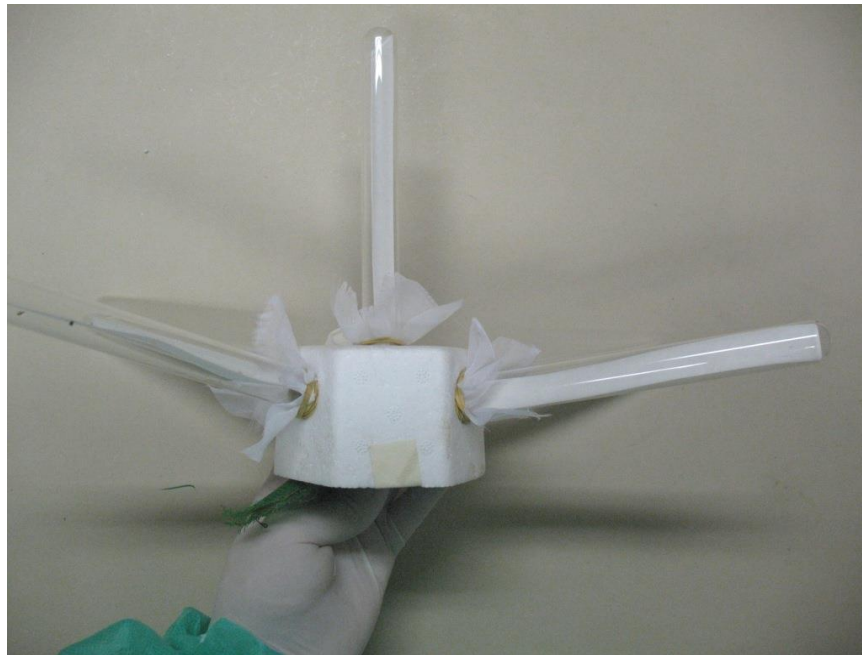


Figura 7. Aparato artificial para alimentação dos triatomíneos da espécie *Rhodnius nasutus*, vista lateral.
Imagem: Marcio Lopes

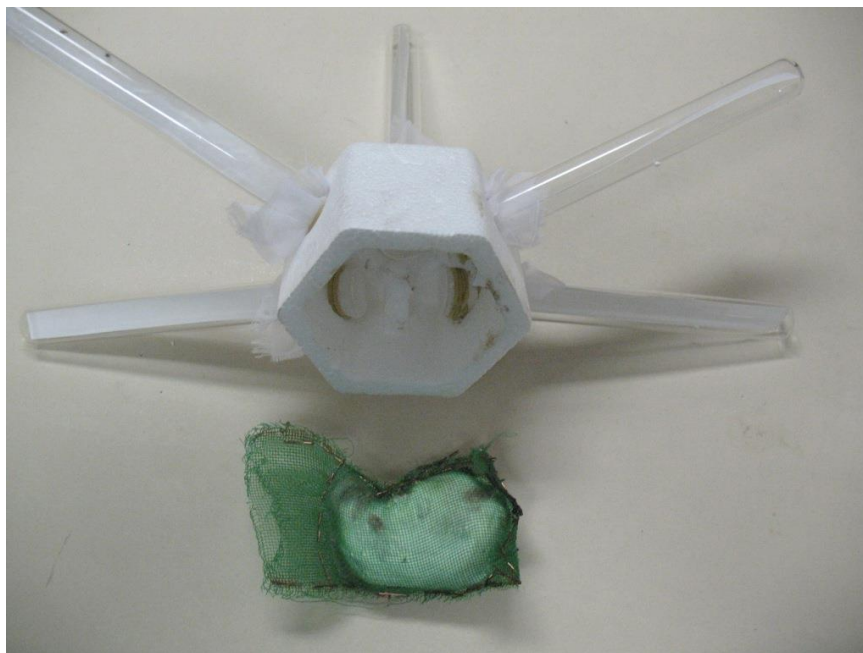


Figura 8. Aparato artificial para alimentação dos triatomíneos da espécie *Rhodnius nasutus*.

Imagem: Marcio Lopes

4.2.5 Atividade da substância e concentração letal

Para determinar a substância alvo foram testadas as substâncias encontradas majoritariamente no óleo, que são α - pinene, 1,8 - cineol e cariofileno. Elas foram testadas isoladamente e misturadas, mas apenas o cariofileno demonstrou atividade inseticida.

Para a concentração letal foram testadas diferentes dosagens (0,5 a 1 μ L) de cariofileno, onde foram determinadas CL₅₀ a 0,7 μ L e CL₉₀ a 0,9 μ L, em que cada 1 μ L continha 250 μ g de cariofileno.

Foram considerados mortos os insetos que não tiveram atividade motora própria autonomamente ou através da estimulação (WHO, 1994).

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol JSM 6390LV da Plataforma de Microscopia do Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ. Neste procedimento foram utilizados adultos de *R. nasutus* oriundos de ninfas de 5º estágio utilizadas nos testes pertencentes ao grupo controle puro e os do grupo tratado com a substância que apresentaram alterações morfológicas. Estes foram individualizados e as partes a serem estudadas foram colocadas em fita dupla face, presas a um suporte metálico com 1,3cm de diâmetro (*stub*) e posteriormente pulverizadas com ouro para a visualização no microscópio eletrônico, sem a necessidade de fixação e desidratação devido a rigidez do exoesqueleto dos insetos. As micrografias obtidas no microscópio foram transferidas diretamente ao computador, para posterior análise.

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O microscópio eletrônico de transmissão utilizado foi o modelo Jeol JEM 1011 da Plataforma de Microscopia do Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ. Neste procedimento foram utilizadas as glândulas salivares, o estômago e o intestino de cinco triatomíneos *R. nasutus* adultos separados do grupo controle puro e cinco de cada concentração do grupo tratado com a substância, esses foram dissecados e as partes para serem estudadas foram submetidas ao processo de fixação em Glutraldeído 2,5% em tampão Cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2. e em seguida pós-fixados em Tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão. A seguir foram desidratados em série crescente de etanol (de 50 a 100%), sendo posteriormente emblocados em resina epóxi (Epon) e levados a estufa por 72 h a 60 °C, para polimerização. Após o material foi devidamente catalogado, e os cortes foram obtidos por ultramicrotomia, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo para a visualização ao microscópio eletrônico. As micrografias obtidas no microscópio foram transferidas diretamente ao computador, para posterior análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Luxemburgia nobilis* sobre *Rhodnius nasutus*

O presente estudo mostrou que a utilização de biflavonoides de *L. nobilis*, nas concentrações de 10, 25 e 50% apresentou influência na taxa média de peso (mg) antes e depois da alimentação.

A média de perda de peso para o grupo controle puro foi no total de 15 mg, nos três dias observados. Para o grupo controle com metanol e as demais concentrações 10, 25, e 50% foram observados os seguintes valores 18,8; 18,3; 19,8 e 8,4 mg, respectivamente (Figura 9). No acompanhamento durante a semana, o grupo controle puro (15 mg) apresentou perda de peso superior apenas quando comparado com a concentração 50% (8,4 mg), demonstrando ser inferior ao controle metanol e às concentrações 10 e 25% que apresentaram 18,8; 18,3; 19,8mg, respectivamente, tendo todos apresentado a maior perda nas primeira 24 h (Figura 9). Estes resultados corroboram os encontrados por Gonçalves *et al.* (1997), que relataram que na fase ninfal, a perda de peso é mais sensível após 24h da alimentação do inseto, quando comparado as demais horas (48, 72h etc.). Bem como Lopes (2011), que também observou que após 24h da alimentação a perda de peso foi maior quando comparado às próximas horas para *R. nasutus*.

Cailleaux *et al.* (2011) observaram que a resistência à falta de alimentação por um longo período de tempo constitui uma importante estratégia de sobrevivência, uma vez que, em ocasiões adversas ou de privação alimentar por diferentes fatores, estes são capazes de sobreviver. Logo, estes dados podem sugerir que a capacidade dos triatomíneos de sobreviverem a longos períodos sem alimentação pode ser utilizado como mecanismo de escape a desinsetização, assim podendo abrigar-se até que termine a concentração letal, conforme relatado por Perlowagora-Szumlevicz (1969) para *Triatoma infestans* (Klug, 1834).

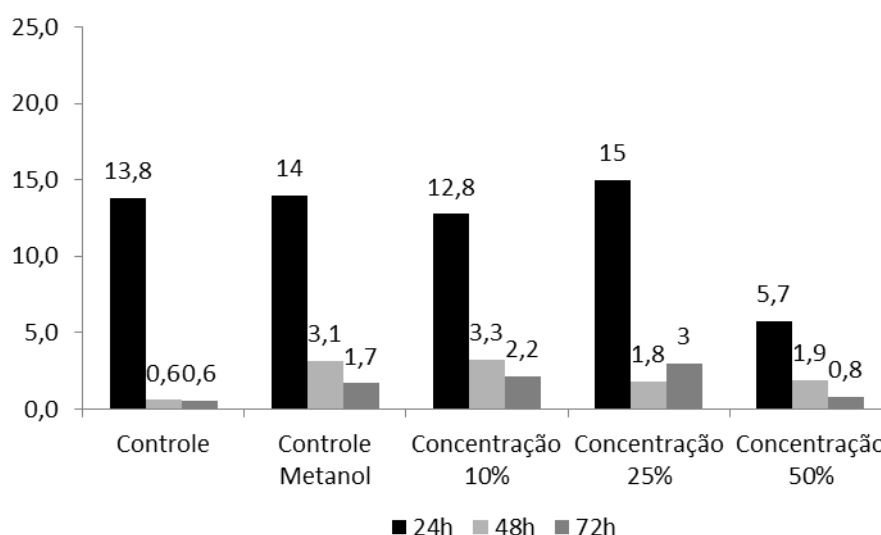


Figura 9. Média de perda de peso (mg) de *Rhodnius nasutus*, entre os grupos controle (puro e com metanol) e tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, criados em laboratório e alimentados em camundongos.

Para a quantidade de sangue ingerido (mg) o grupo controle puro mostrou-se superior na ingestão em sete das dezessete semanas de duração do experimento, sendo elas 2^a, 3^a, 4^a, 9^a, 10^a, 11^a e 14^a, tendo apresentado diferença significativa quando comparado com o grupo tratado nas seguintes semanas, 1^a, 3^a, 4^a, 8^a e 12^a (Tabela 1a, 1b e 1c). O grupo controle puro apresentou 184 mg no total, tendo ingerido uma maior quantidade de sangue quando comparado a todas as concentrações do grupo tratado. No grupo tratado, a concentração 50% demonstrou ser a mais eficaz na inibição de ingestão sanguínea por apresentar apenas 102 mg de sangue ingerido. Estes resultados corroboram os encontrados por Rocha *et al.* (2004), onde observaram um total de 183,2 mg de ingestão sanguínea para *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 e se aproxima dos resultados relatados por Silva & Silva (1989), que observaram para *R. nasutus* uma média de 162,8 mg para ninfas de 5^o estágio e 64,7 mg para os adultos, ambos para insetos não tratados. Lopes (2011) encontrou uma média de 169,9 mg no total de sangue ingerido por *R. nasutus* no grupo controle puro e assim como em todas as concentrações do grupo tratado com *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke demonstraram ser menores do que no grupo controle. Bem como Mello *et al.* (2007), que observaram que a espécie *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) tratada topicamente com óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* obteve uma alimentação decrescente com o aumento da concentração e que o grupo controle puro alcançou a maior quantidade de ingestão sanguínea.

No período de desenvolvimento de *R. nasutus* (ninfa de 5^o estágio / adulto) o grupo controle puro apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) em relação à concentração 25 e 50%, sendo este de 22,4 dias. O grupo controle com metanol e o grupo tratado nas concentrações 10, 25 e 50% não diferenciaram entre si, apresentando duração de 27,1, 26, 31,2 e 31,7 dias, respectivamente (Tabela 2). Os resultados encontrados neste estudo para o grupo controle puro são confirmados pelos resultados encontrados por Braga *et al.* (1999), que relataram que o período de desenvolvimento de ninfa de 5^o a adulto em insetos não tratados foi de 23 dias para *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927. Assim como nas pesquisas de Arévalo *et al.* (2007), que encontraram resultados próximos para o mesmo período de desenvolvimento, onde obtiveram um mínimo de 25 dias para *Rhodnius colombiensis* Moreno, Jurberg & Galvão, 1999 e de 23 dias para *Rhodnius prolixus* Stal, 1872, ambos insetos não tratados. Bem como observado por Lopes (2011) em *R. nasutus*, onde a longevidade demonstrou-se crescente, de acordo com o aumento da concentração (2, 3, 4%) de *P. amapa*. Estes resultados demonstram que o tratamento com o biflavonoide nas concentrações 10, 25 e 50% gerou um aumento gradativo do tempo de desenvolvimento de *R. nasutus* de acordo com o aumento da concentração.

Tabela 1a: Diferença de peso (mg) de *Rhodnius nasutus* tratados com diferentes concentrações (10, 25 e 50%) de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, antes e após a alimentação (1ª a 5ª semana), em condições de laboratório.

Grupo (Tratamentos)	1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana		5ª semana	
	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.
Controle puro	31,4± 39,4ab	0-149	16,2±27,8 a	0-129	13,5±25,8a	0-116	11,5±26,2 a	0-109	2,6±6,6 a	0-36
Controle metanol	39,4± 45,7a	0-163	8,8±17,7 a	0-71	10,7±18,1ab	0-66	3,3±8,2 b	0-43	2,4±9,6 a	0-67
10%	33,9 ± 42a	0-138	15,2±31,9 a	0-139	5,7± 15,4ab	0-76	3,6± 8,8ab	0-37	4,7 ± 16,2a	0-74
25%	38,6 ± 41,7a	0-138	15,2 ±29,5 a	0-155	7,7 ± 16,5ab	0-73	7,8± 18,9ab	0-93	5,5 ± 14a	0-82
50%	15,5 ± 25,8b	0-125	11,9 ±26,3a	0-102	3,7 ± 8,8b	0-42	6,6±17,1 ab	0-90	4,9 ± 16,2a	0-93

Sendo χ a média, DP o desvio padrão e I.V. o intervalo de variação (amplitude).

Letras distintas apresentam diferenças significativas.

Tabela 1b: Diferença de peso (mg) de *Rhodnius nasutus* tratados com diferentes concentrações (10, 25 e 50%) de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, antes e após a alimentação (6ª a 10ª semana), em condições de laboratório.

Grupo (Tratamentos)	6ª semana		7ª semana		8ª semana		9ª semana		10ª semana	
	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.
Controle puro	5,9±11,3a	0-51	10,5±22,2a	0-86	8,3±17,8a	0-74	5,9±13,2a	0-42	11,5±18,6a	0-55
Controle metanol	5,8±11,8a	0-45	12,8±22,7a	0-87	0,4±0,5ab	0-1	5,1±14,3a	0-56	2±3,8a	0-11
10%	4,2±17,9a	0-110	8,1±17,8a	0-86	10,8±13,3ac	0-41	0,8±3,4a	0-15	1,3±2,9a	0-9
25%	8,9±14,8a	0-68	6,1±12,9a	0-55	4,5±11,1a	0-52	3,8±9,1a	0-33	10,1±4,4a	0-86
50%	9,5±23,5a	0-91	4,6±13,9a	0-66	7,2±13,5a	0-45	3,6±0,9a	0-15	4,6±9,3a	0-33

Sendo χ a média, DP o desvio padrão e I.V. o intervalo de variação (amplitude).

Letras distintas apresentam diferenças significativas.

Tabela 1c: Diferença de peso (mg) de *Rhodnius nasutus* tratados com diferentes concentrações (10, 25 e 50%) de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, antes e após a alimentação (11^a a 17^a semana), em condições de laboratório.

Grupo (Tratamentos)	11 ^a semana		12 ^a semana		13 ^a semana		14 ^a semana		15 ^a semana		16 ^a semana		17 ^a semana	
	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.
Controle puro	25,4±26a	1-59	5,7±4,9a	1-11	4±3,1a	2-10	19,4±23,5a	0-53	5,3±2,9a	2-7	-	-	-	-
Controle metanol	14,8±22,9a	0-57	17,6±11,2ab	0-27	10±17,3a	0-30	18,3±22,4a	0-47	0,3±0,5a	0-1	0±0a	0-0	0,3±0,6a	0-1
10%	16,6±20,8a	0-59	6,9±13,3ac	0-36	1,7±4,1a	0-11	5,3±12,3a	0-33	0,4±0,9a	0-2	6,6±12,6a	0-29	1±1,4a	0-2
25%	13,6±22,9a	0-87	1±1,7a	0-5	21,2±25,7a	0-79	13,1±22,6a	0-76	4,8±8,9a	0-28	0±0a	0-0	1,2±3,3a	0-10
50%	1,9±4,9a	0-14	12,7±21a	0-51	4±8,9a	0-20	4±8a	0-16	11,5±4,9a	8-15	-	-	-	-

Sendo χ a média, DP o desvio padrão e I.V. o intervalo de variação (amplitude).

Letras distintas apresentam diferenças significativas.

Tabela 2: Desenvolvimento de *Rhodnius nasutus* (ninfa de 5º estágio / adulto), tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, em condições de laboratório.

Grupo (Tratamentos)	Desenvolvimento de ninfa de 5º estágio a adulto (dias)	
	$\chi \pm DP$	I.V.
Controle puro	22,5 \pm 10,2 a	7-51
Controle Metanol	27,1 \pm 16,4 ab	2-102
10%	26,0 \pm 15,7 ab	1-86
25%	31,2 \pm 21,9 b	3-107
50%	31,7 \pm 13,9 b	2-60

Sendo χ a média, DP o desvio padrão e I.V. o intervalo de variação (amplitude).
Letras distintas apresentam diferenças significativas

Para a longevidade dos adultos, o grupo controle puro não apresentou diferença significativa em nenhum dos casos, assim como não foi observada diferença entre as concentrações do grupo tratado.

Considerando a longevidade dos adultos, o grupo controle puro apresentou 29,6 dias em média, obtendo uma longevidade superior ao grupo controle com metanol que apresentou 26 dias e igualmente ao grupo tratado, onde as concentrações 10, 25, e 50% apresentaram 25,4, 25,2 e 24,7 dias, respectivamente (Tabela 3). Diferenciando do analisado por Rocha *et al.* (1997), onde encontraram uma média de 64 dias para *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 em insetos não tratados. Assim como o observado por Lopes (2011), que observou que a longevidade dos adultos de *R. nasutus* era crescente com aumento da concentração de *P. amapa*. Isso demonstra que o tratamento com o biflavonoide nas concentrações 10, 25 e 50% gerou uma leve diminuição na longevidade dos insetos adultos de acordo com o aumento da concentração.

Tabela 3: Longevidade dos adultos de *Rhodnius nasutus*, tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, em condições de laboratório.

Grupo (Tratamentos)	Longevidade dos adultos (dias)	
	$\chi \pm DP$	I.V.
Controle	29,6 \pm 17,7 a	11-79
Controle metanol	26,0 \pm 15,7 a	3-101
10%	25,4 \pm 16,1 a	11-91
25%	25,2 \pm 24,5 a	7-98
50%	24,7 \pm 17,8 a	1-80

Sendo χ a média, DP o desvio padrão e I.V. o intervalo de variação (amplitude).
Letras distintas apresentam diferenças significativas.

Com relação à mortalidade das ninfas, o controle puro apresentou diferença significativa ($P < 0.001$) quando confrontado com o grupo controle metanol e com a concentração 50% do grupo tratado. Na taxa de mortalidade das ninfas, o grupo tratado e o grupo controle metanol obtiveram um percentual de sobrevivência inferior à do grupo controle.

Neste estudo a mortalidade dos adultos deformados dos triatomíneos tratados com as diferentes concentrações de biflavonoide foi de 34, 48 e 67%, respectivamente para as concentrações 10, 25, e 50%. O grupo controle e metanol não apresentaram qualquer adulto com alterações morfológicas, mas foi contabilizada a mortalidade dos adultos (Tabela 4).

Tabela 4: Mortalidade das ninfas de 5º estágio e de adultos com e sem alterações morfológicas de *Rhodnius nasutus*, tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, em condições de laboratório.

Grupo (Tratamentos)	Mortalidade de ninfa	Mortalidade de adultos sem deformidade		Mortalidade de adultos deformados	
	%	Nº absoluto	%	Nº absoluto	%
Controle puro	25	67	100	0	0
Controle metanol	48	47	100	0	0
10%	35	39	66	20	34
25%	44	26	52	24	48
50%	60	12	33	24	67

Rocha *et al.* (2001), observaram 21% de mortalidade em *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 de 5º estágio não tratados com substância e mantidos com temperatura (28°C) e umidade (70%) controladas. Em Lopes (2011) o grupo controle está de acordo com o presente estudo apresentando 28% de mortalidade de insetos que não chegaram à fase adulta, mas diferenciando-se do grupo tratado, onde o mesmo autor observou a mortalidade decrescente em relação ao aumento da concentração de *P. amapa*. Estes dados foram confirmados pelos estudos de Cabral *et al.* (2000), onde os grupos tratados de *R. prolixus* com lignoides e neolignoides, apresentaram um crescimento gradativo da mortalidade de acordo com o aumento da dosagem da substância, diferenciando de Castro *et al.* (2012) que observaram que a mortalidade dos *R. prolixus* tratados topicamente com Physalin B não diferenciou do grupo controle.

Carvajal *et al.* (2010) observaram a maior mortalidade de 50% das ninfas de 5º estágio de *Rhodnius pallescens* Barber, 1932, *R. prolixus* e *Rhodnius colombiensis* Moreno Mejía, Galvão & Jurberg, 1999 tratados com extratos hidroalcoólicos de folhas de *Solanum macranthum* Dunal e não apresentando adultos com deformidade, assim diferenciando desse estudo que alcançou maior mortalidade e causou deformidades.

O dendrograma (figura 10) demonstra que a mortalidade das ninfas de 5º estágio de *R. nasutus* tratadas com as concentrações 25% é similar ao da concentração de 50%, com um índice de similaridade de 85% entre estas. Já o grupo controle puro apresentou uma similaridade de 89%, quando comparada com o grupo controle metanol e ao grupo de concentração de 10%, mas estes estando mais próximos entre si com 94% de similaridade.

Isto evidencia que o grupo controle puro, o grupo controle metanol e ao grupo da concentração de 10% estão em um grupo diferente do grupo da concentração de 25 e 50% devido ao baixo nível de similaridade que demonstrou ser de apenas 74%.

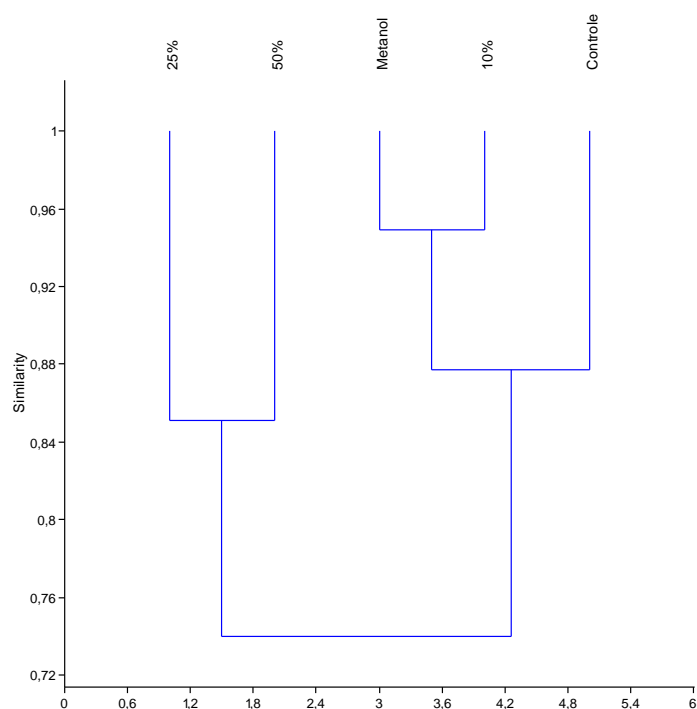


Figura 10. Dendrograma demonstrando a relação de mortalidade ninfal de *Rhodnius nasutus*, entre os grupos controle (puro e com metanol) e os grupos tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, sob condições de laboratório.

O grupo controle puro e o grupo controle com metanol não apresentaram adultos com deformidades, contudo foram observados adultos de *R. nasutus* com alterações morfológicas no grupo tratado com a substância em todas as concentrações. Houve diferença significativa ($P < 0,001$) em todas as concentrações do grupo tratado quando comparado com o grupo controle puro e com o grupo controle com metanol para as deformidades nas pernas, onde apresentaram para as concentrações 10, 25 e 50% um percentual de 27,1, 28 e 44,4%, respectivamente. Para a deformidade em asas e pernas simultaneamente foi visto que apenas a concentração 25% do grupo tratado apresentou diferença ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo controle puro e grupo controle metanol. No entanto, as demais deformidades não foram observadas diferenças significativas quando correlacionado o grupo controle puro ou ao grupo controle com metanol com o grupo tratado (Tabelas 5a e 5b). Os resultados deste estudo corroboram os resultados obtidos por Jurberg *et al.* (1984), onde 52% das ninfas de *R. prolixus* tratadas topicamente com Precoceno II nas dosagens 25 e $30\mu\text{L}/1\mu\text{L}$ de acetona, apresentaram deformidades na muda subsequente ao tratamento. Assim como o observado por Jurberg *et al.* (1986) para *T. infestans* tratados topicamente com Precoceno II nas dosagens 200, 300 e $400\mu\text{L}/1\mu\text{L}$ de acetona, que também apresentaram alterações morfológicas. Em ambos os estudos as regiões deformadas foram equivalentes a esse trabalho.

Já Cabral *et al.* (2000), não observaram alterações morfológicas em nenhum dos grupos de *R. prolixus* tratados topicamente com lignoide e neolignoide.

Tabela 5a: Deformidades nos adultos de *Rhodnius nasutus*, tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, em laboratório.

Grupo (Tratamentos)	Cabeça		Pernas		Asas	
	N° absoluto	%	N° absoluto	%	N° absoluto	%
Controle puro	0	0	0	0	0	0
Controle metanol	0	0	0	0	0	0
10%	1	1,7	16	27,1	1	1,7
25%	2	4	14	28	2	4
50%	1	2,7	16	44,4	1	2,7

Tabela 5b: Deformidades simultâneas em adultos de *Rhodnius nasutus*, tratados com diferentes concentrações de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, em laboratório.

Grupo (Tratamentos)	Cabeça/Pernas		Asas/Pernas		Asas/Abdômen		Asas/Abdômen/Pernas	
	N° absoluto	%	N° absoluto	%	N° absoluto	%	N° absoluto	%
Controle puro	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle metanol	0	0	0	0	0	0	0	0
10%	0	0	0	0	1	1,7	1	1,7
25%	1	2	5	10	0	0	0	0
50%	2	5,5	1	2,7	2	5,5	1	2,7

Através da microscopia eletrônica de varredura, foi observado que o grupo controle não apresentou nenhuma forma de deformidade, enquanto que o grupo tratado apresentou deformidades na cabeça, pernas, asas, abdome, inserção das asas, ente outras concomitantemente (Figuras 10 - 17). As deformidades encontradas nas pernas e asas causadas pelo biflavonoide (Lophirona B) de *L. nobilis* provavelmente dificultariam a locomoção e a dispersão (terrestre e aérea). Da mesma forma, as deformidades no abdome, cabeça e aparelho bucal possivelmente dificultariam a capacidade reprodutiva e a alimentação dos adultos de *R. nasutus*. Segundo Brenner *et al.* (2000), a capacidade de dispersão dos triatomíneos é um fator importante na epidemiologia destes vetores.

Os resultados encontrados corroboram os estudos de Lopes (2011), que também relatou alterações morfológicas nas pernas, asas, abdome e cabeça em adultos de *R. nasutus* tratados com o PALAM de *P. amapa*.

Por microscopia eletrônica de transmissão, foi observado que o grupo controle (puro e metanol) não apresentou nenhuma alteração no epitélio, mas todas as concentrações do grupo tratado com biflavonoide (Lophirona B) de *L. nobilis* apresentaram alterações no epitélio. Pelo epitélio do grupo tratado não ter apresentado organização celular, o resultado não pode ser conclusivo (Figuras 19 - 23). Sugere-se que a substância foi à causadora das alterações porque somente no grupo tratado que foi observado.

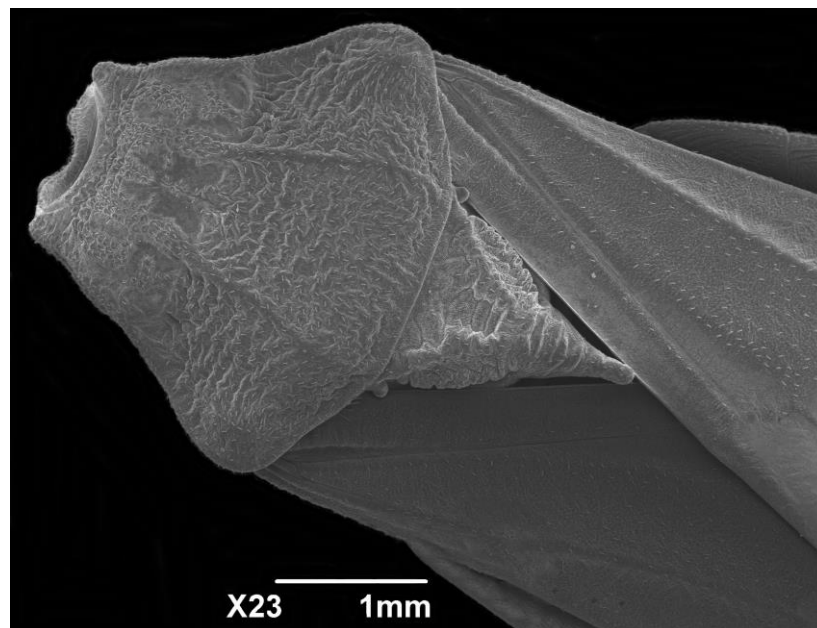


Figura 11. Micrografia eletrônica de varredura da visão dorsal do tórax de *Rhodnius nasutus* pertencente ao grupo controle, sem deformidades.

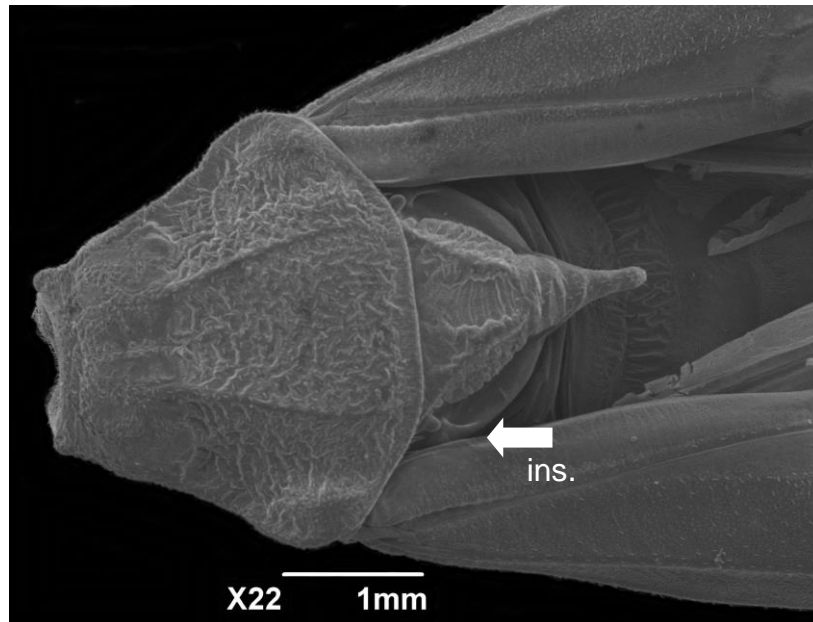


Figura 12. Micrografia eletrônica de varredura da visão dorsal do tórax de um adulto de *Rhodnius nasutus* pertencente ao grupo tratado com diferentes concentrações de biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, com deformidade na inserção das asas (ins.).

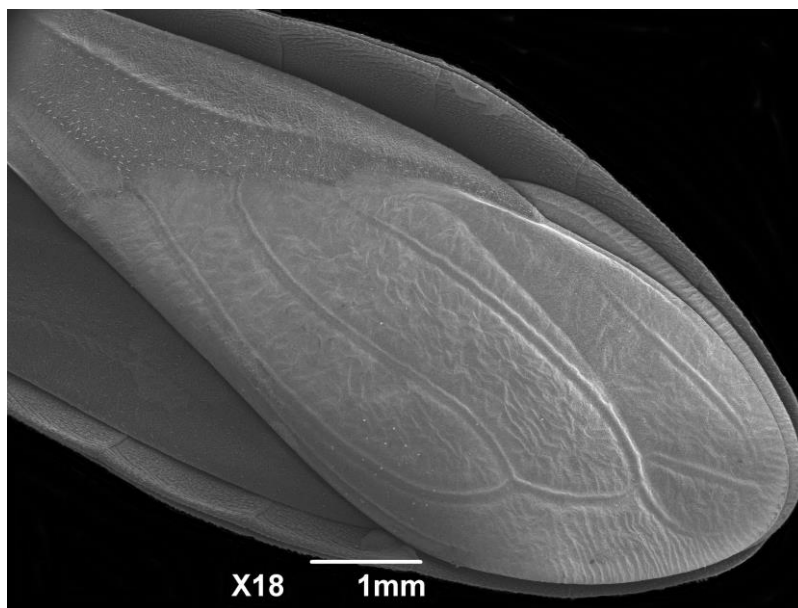


Figura 13. Micrografia eletrônica de varredura da visão da região posterior do abdômem de *Rhodnius nasutus* pertencente ao grupo controle, sem deformidades.

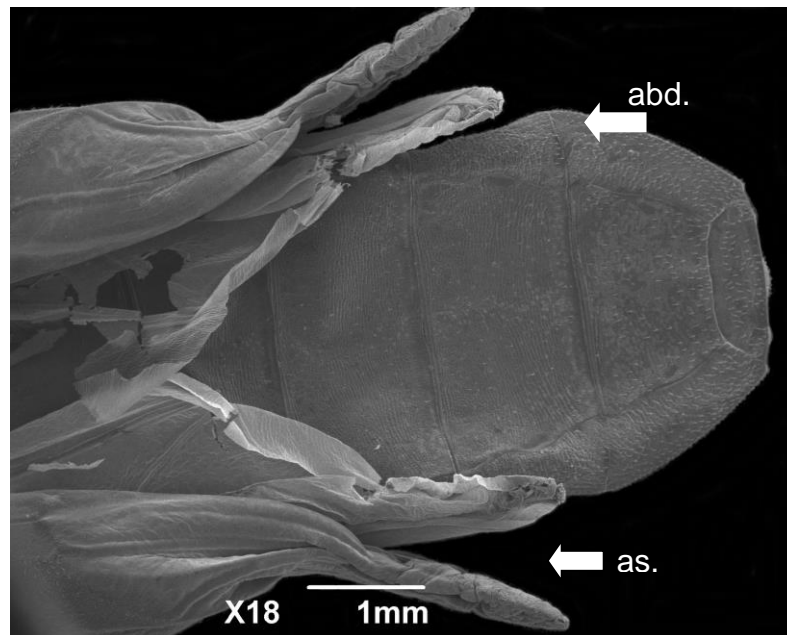


Figura 14. Micrografia eletrônica de varredura da visão da região posterior de *Rhodnius nasutus* adulto pertencente ao grupo tratado com biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, com deformidades nas asas (as.) e abdômen (abd.).

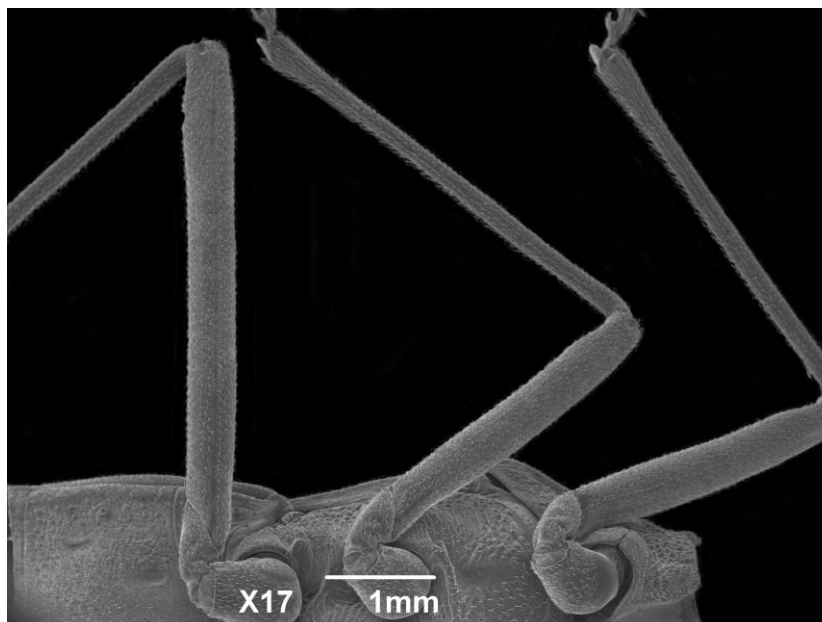


Figura 15. Micrografia eletrônica de varredura da visão das pernas do adulto de *Rhodnius nasutus* pertencente ao grupo controle, sem deformidades.

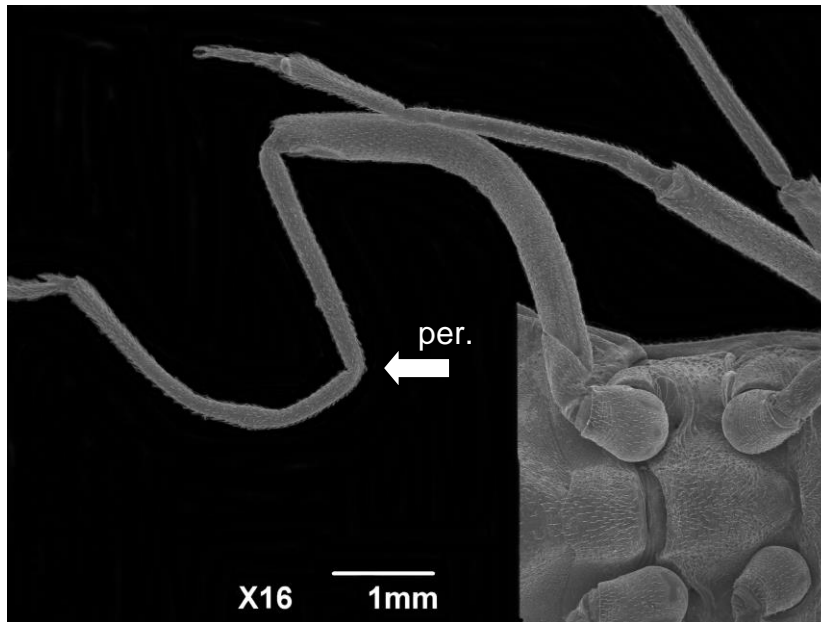


Figura 16. Micrografia eletrônica de varredura da visão das pernas do adulto de *Rhodnius nasutus* pertencente ao grupo tratado com biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, com deformidades nas pernas (per.).

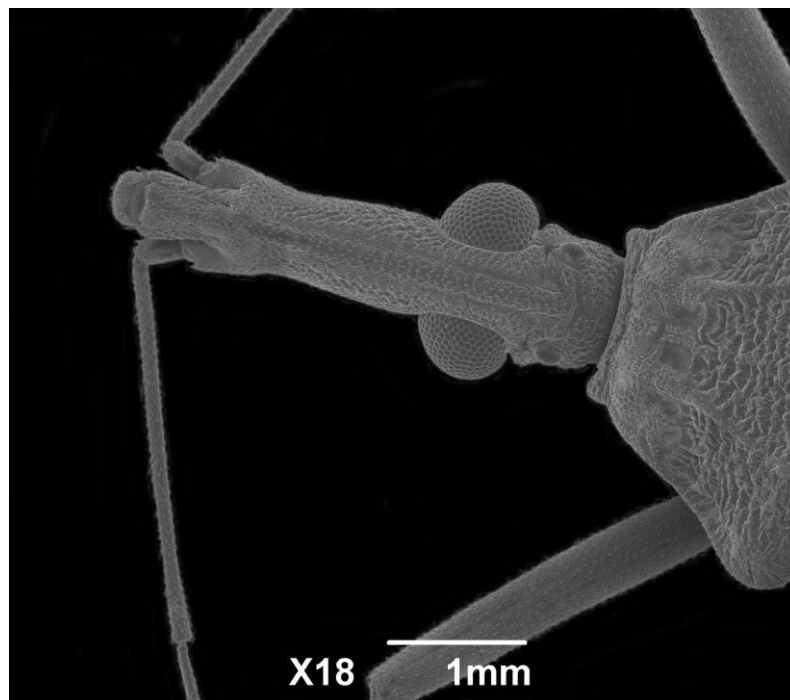


Figura 17. Micrografia eletrônica de varredura da visão lateral do adulto de *Rhodnius nasutus* pertencente ao grupo controle, sem deformidades.

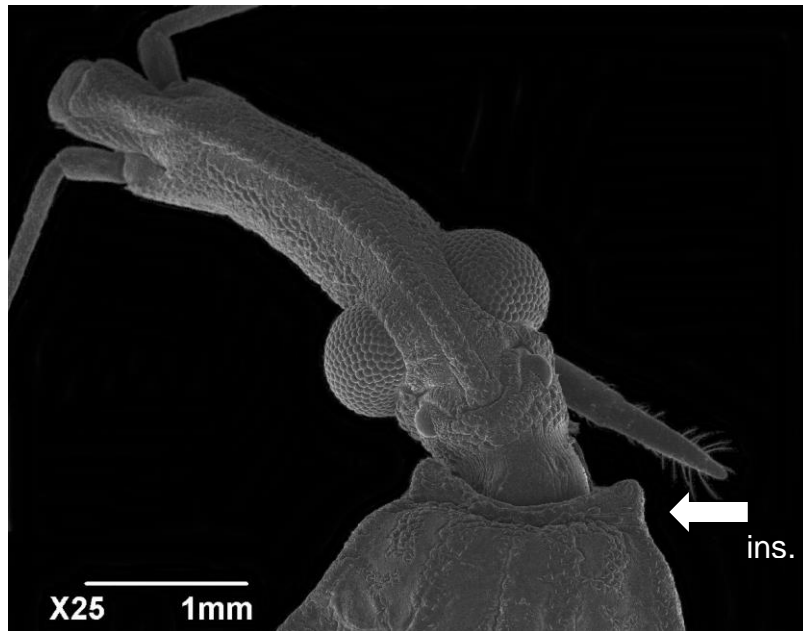


Figura 18. Micrografia eletrônica de varredura da visão dorsal do adulto de *Rhodnius nasutus* adulto pertencente ao grupo tratado com biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*, com deformidade na inserção da cabeça (ins.).

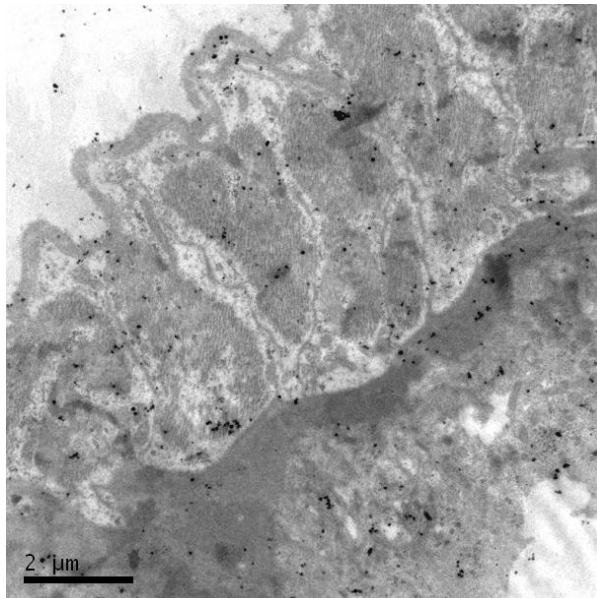


Figura 19. Micrografia eletrônica de transmissão do estômago do adulto de *Rhodnius nasutus* pertence ao grupo controle (Puro).

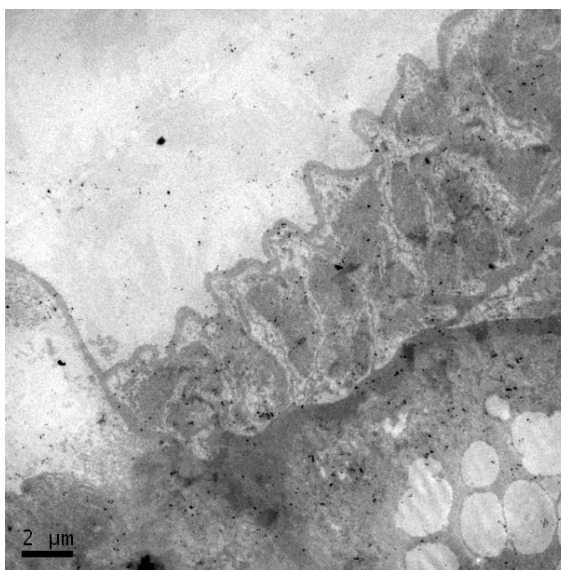


Figura 20. Micrografia eletrônica de transmissão do estômago do adulto de *Rhodnius nasutus* pertence ao grupo controle (Metanol).

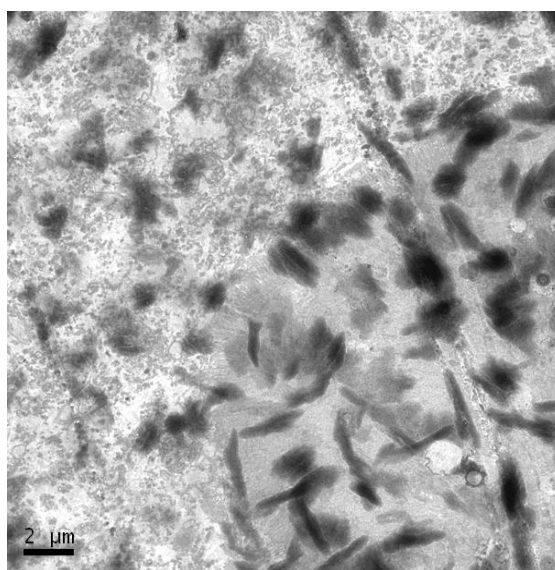


Figura 21. Micrografia eletrônica de transmissão do estômago do adulto de *Rhodnius nasutus* pertence ao grupo tratado (10%) com biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*.

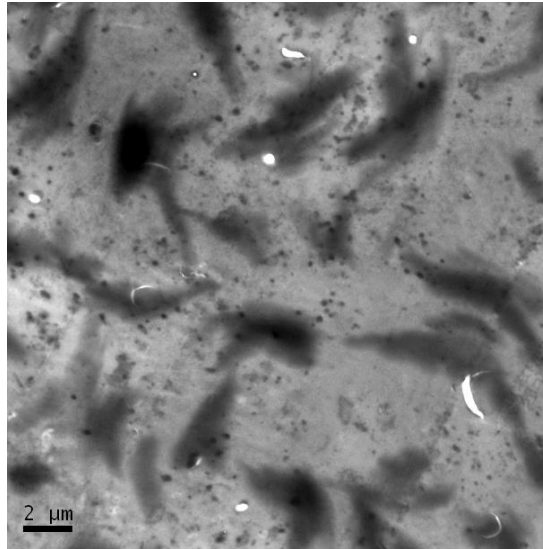


Figura 22. Micrografia eletrônica de transmissão do estômago do adulto de *Rhodnius nasutus* pertence ao grupo tratado (25%) com biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*.

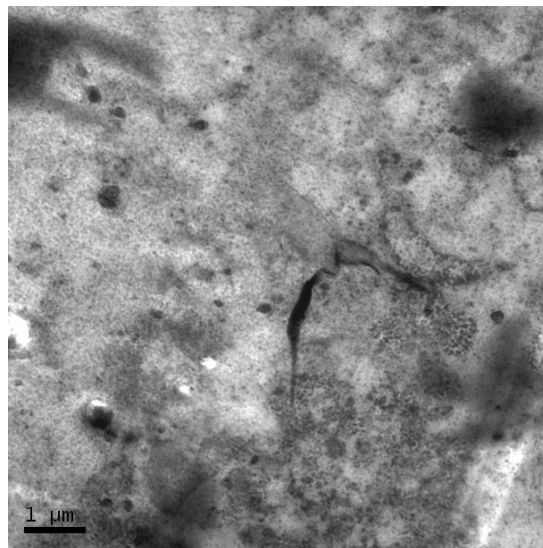


Figura 23. Micrografia eletrônica de transmissão do estômago do adulto de *Rhodnius nasutus* pertence ao grupo tratado (50%) com biflavonoide de *Luxemburgia nobilis*.

5.2 *Myrciaria floribunda* sobre *Rhodnius nasutus*

Este estudo mostrou que a utilização do óleo essencial de *Myrciaria floribunda*, nas concentrações 137,5µg (MF1) e 275µg (MF2), diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO) causou influência na taxa média de peso (mg) antes e depois da alimentação, quando comparou-se o grupo controle puro com o grupo controle DMSO e com todas as concentrações do grupo tratado, em condições de laboratório.

A média de perda de peso do grupo controle puro foi a menor dentre as concentrações testadas nos dias acompanhados, obtendo um total de 4,8 mg. O grupo controle DMSO e as demais concentrações apresentaram os seguintes valores 5,5, 6,6 e 23,1 mg, respectivamente (Figura 24). No acompanhamento do grupo tratado durante a semana a concentração 275µg (MF2) apresentou a maior perda de peso dentre todos os grupos, alcançando um total de 23,1mg em média (Figura 24).

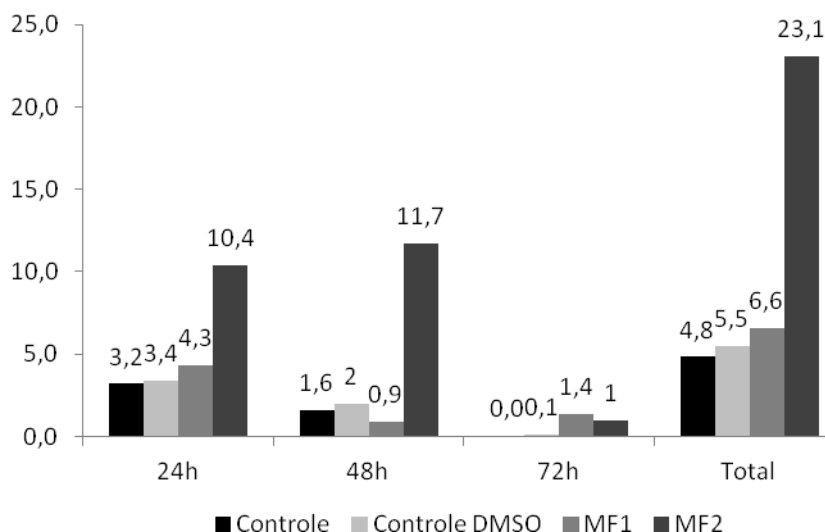


Figura 24. Relação da média de perda de peso (mg) de *Rhodnius nasutus*, entre os grupos controle (puro e metanol) e tratados com diferentes concentrações (137,5µg = MF1 e 275µg = MF2) do óleo essencial de *Myrciaria floribunda*, criados em laboratório e alimentados em camundongos.

Segundo observado por Gonçalves *et al.* (1997), para *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 e mencionado por Lopes (2011) para *R. nasutus* onde observaram que na fase ninfal, após 24h da alimentação do inseto, a perda de peso é mais sensível se comparado com as demais horas. Foi também observado no presente estudo que após 24h da alimentação a perda de peso é maior quando comparado às próximas horas (48, 72 etc.) para *R. nasutus*. Estes resultados podem sugerir que a capacidade dos triatomíneos de sobreviverem a longos períodos sem alimentação pode ser um mecanismo de escape à desinsetização, assim os insetos podem se refugiar até que termine a dose letal (Perlowagora-Szumlevicz, 1969). Assim podendo sugerir que a capacidade dos triatomíneos de sobreviverem a longos períodos sem alimentação, aumente as chances de ocorrer uma re-colonização pelos indivíduos restantes, indicando deste modo que a transmissão da doença continue (Cortez & Gonçalves, 1998).

Para a quantidade de sangue ingerido o grupo controle puro mostrou-se superior na ingestão no somatório de todas as semanas e apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo tratado nas seguintes semanas, 1^a, 3^a, 4^a, 8^a e 12^a (Tabela 6a, 6b e 6c). O grupo controle apresentou 183,9 mg no total, tendo ingerido uma maior quantidade de sangue quando comparado ao grupo controle DMSO (119,2 mg) e as concentrações 137,5µg (MF1) e 275µg (MF2) do grupo tratado 85,2 e 85 mg, respectivamente. No grupo tratado a concentração MF2 demonstrou ser a mais eficaz na inibição de ingestão sanguínea por apresentar apenas 85 mg de sangue ingerido. Corroborado por Mello *et al.* (2007), que

observaram que a espécie *R. prolixus* tratada topicamente com óleo essencial de *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire obteve uma alimentação inversamente proporcional ao aumento da concentração e que o controle alcançou a maior quantidade de ingestão sanguínea. Bem como Lopes (2011), que observou que a espécie *R. nasutus* tratada topicamente com látex de *P. amapa* apresenta uma menor ingestão sanguínea com o aumento da concentração da substância.

O tempo de desenvolvimento de ninfa de 5º estágio a adulto de *R. nasutus* para o grupo controle puro e controle com DMSO apresentaram diferença significativa em relação às concentrações do grupo tratado, tendo eles apresentado 43,1 e 42,6 dias, respectivamente. As concentrações 137,5µg (MF1) e 275µg (MF2) do grupo tratado não apresentaram diferença significativa entre si, mas apresentaram um leve decréscimo na média dos dias de desenvolvimento, 31,8 e 31,5 dias, respectivamente (Tabela 7). Confirmado por Rocha *et al.* (2001), que observaram um período de desenvolvimento de ninfa de 5º estágio a adulto em insetos não tratados sendo de 40 dias para *Rhodnius robustus* Larrouse, 1927. Assim como nas pesquisas de Silva & Silva (1989), onde para o mesmo período de desenvolvimento obtiveram uma média de 40,3 dias para *R. nasutus*, ambos os sexos de insetos não tratados. Diferenciando de Lopes (2011), que demonstrou a longevidade do *R. nasutus* crescente quando relacionado ao aumento da concentração de *P. amapa*.

Isto ratifica que tratamento com o óleo essencial gerou uma diminuição gradativa no tempo de desenvolvimento de *R. nasutus* de acordo com o aumento da concentração do óleo essencial de *M. floribunda*.

Tabela 6a: Diferença de peso (mg) de *Rhodnius nasutus* tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* antes e após a alimentação (1ª a 5ª semana), em condições de laboratório.

Grupo (Tratamento)	1ª semana		2ª semana		3ª semana		4ª semana		5ª semana	
	$\chi \pm SD$	I.V.	$\chi \pm SD$	I.V.	$\chi \pm SD$	I.V.	$\chi \pm SD$	I.V.	$\chi \pm SD$	I.V.
Controle puro	10,8 ± 24,5a	0 - 114	7,8 ± 12,7ab	0 - 55	16,1 ± 25,6a	0 - 104	28,9 ± 39,6a	0 - 124	2,6 ± 5,6ab	0 - 24
Controle DMSO	8,8 ± 15,9a	0 - 54	7,8 ± 15,6ab	0 - 58	21,7 ± 35,8a	0 - 140	14,5 ± 20,6ab	0 - 89	5,7 ± 7,1a	0 - 29
MF1	12 ± 19,1a	0 - 103	13 ± 15,1a	0 - 73	14,6 ± 17,2a	0 - 101	2,2 ± 1,8b	0 - 11	1 ± 0,4b	0 - 2
MF2	10,6 ± 12,6a	0 - 74	0 ± 0b	0 - 0	8,3 ± 3,7a	0 - 25	6 ± 1,5b	0 - 12	4,5 ± 0,7a	2 - 7

Sendo χ a média, DP o desvio padrão e I.V. o intervalo de variação (amplitude).
Letras distintas apresentam diferenças significativas.

Tabela 6b: Diferença de peso (mg) de *Rhodnius nasutus* tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* antes e após a alimentação (6ª a 10ª semana), em condições de laboratório.

Grupo (Tratamento)	6ª semana		7ª semana		8ª semana		9ª semana		10ª semana	
	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.
Controle puro	12 ± 22,6a	0 - 107	6 ± 7,2a	0 - 35	7,1 ± 9,1a	0 - 39	8,1 ± 9,8ac	0 - 46	7,7 ± 7,9a	0 - 35
Controle DMSO	3,6 ± 5,4b	0 - 27	7,8 ± 10,8a	0 - 58	2 ± 2,5b	0 - 15	1,2 ± 1,3b	0 - 8	10,3 ± 5,5a	0 - 28
MF1	2,4 ± 2,1b	0 - 12	27,5 ± 10,5b	0 - 66	1,5 ± 0,1b	1 - 2	11 ± 0c	11 - 11	0 ± 0b	0 - 0
MF2	2,5 ± 0,1b	2 - 3	6,9 ± 0,8c	66 - 72	0 ± 0b	0 - 0	36 ± 6,3d	12 - 60	0 ± 0b	0 - 0

Sendo χ a média, DP o desvio padrão e I.V. o intervalo de variação (amplitude).
Letras distintas apresentam diferenças significativas.

Tabela 6c: Diferença de peso (mg) de *Rhodnius nasutus* tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Myrciaria floribunda* antes e após a alimentação (11^a a 16^a semana), em condições de laboratório.

Grupo (Tratamentos)	11 ^a semana		12 ^a semana		13 ^a semana		14 ^a semana		15 ^a semana		16 ^a semana	
	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.	$\chi \pm DP$	I.V.
Controle puro	11,3 ± 15,2a	0 - 70	9,8 ± 12,6a	0 - 69	17 ± 10,6a	0 - 53	5,3 ± 3a	0 - 16	1,5 ± 0,6a	0 - 4	13,3 ± 23a	0 - 40
Controle DMSO	2,8 ± 1,4b	0 - 9	5,2 ± 3,9b	0 - 24	6,75 ± 4,1b	0 - 26	3,6 ± 1,6a	0 - 11	14,9 ± 4,2b	9 - 37	2,5 ± 3,5b	0 - 5
MF1	0 ± 0b	0 - 0	0 ± 0c	0 - 0								
MF2	0 ± 0b	0 - 0	10,5 ± 2,7a	0 - 21								

Sendo χ a média, DP o desvio padrão e I.V. o intervalo de variação (amplitude).
Letras distintas apresentam diferenças significativas.

Tabela 7: Média do tempo de desenvolvimento de ninfa de 5º estágio a adulto de *Rhodnius nasutus*, tratados com diferentes concentrações (137,5µg = MF1 e 275µg = MF2) do óleo essencial de *Myrciaria floribunda*, alimentadas em camundongos, em condições de laboratório.

Grupo (Tratamentos)	Desenvolvimento de 5º estágio a adulto (dias)	
	$\chi \pm DP$	I.V.
Controle puro	43,1 ± 17,7 a	16 - 79
Controle DMSO	42,6 ± 22,5 a	7 - 97
MF1	31,8 ± 15,5 b	19 - 58
MF2	31,5 ± 19,7 b	29 - 34

Sendo χ a média, DP o desvio padrão e I.V. o intervalo de variação (amplitude).
Letras distintas apresentam diferenças significativas

Em relação a longevidade dos adultos de *R. nasutus*, o grupo controle puro apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle com DMSO e com as diferentes concentrações do grupo tratado, tendo eles apresentado 31,5, 26,1, 19,6 e 19 dias, respectivamente. As concentrações 137,5µg (MF1) e 275µg (MF2) do grupo tratado não diferenciaram entre si, mas apresentaram um pequeno decréscimo nos dias de desenvolvimento (Tabela 8).

Tabela 8: Longevidade dos adultos de *Rhodnius nasutus*, tratados com diferentes concentrações (137,5µg = MF1 e 275µg = MF2) do óleo essencial de *Myrciaria floribunda*, em condições de laboratório.

Grupo (Tratamentos)	Longevidade dos adultos (dias)	
	$\chi \pm DP$	I.V.
Controle puro	31,5 ± 8,6 a	19 - 56
Controle DMSO	26,1 ± 9,5 b	12 - 70
MF1	19,6 ± 0,7 c	17 - 21
MF2	19 ± 0,3 c	18 - 20

Sendo χ a média, DP o desvio padrão e I.V. o intervalo de variação (amplitude).
Letras distintas apresentam diferenças significativas.

Esse resultado demonstrou que o grupo tratado apresentou uma menor longevidade do adulto quando comparado ao grupo controle (puro e DMSO), diferenciando assim do estudo de Jurberg *et al.* (1986), que observaram que as concentrações de Precoceno II apresentavam maior longevidade do adulto quando comparado ao grupo controle. Assim como para os estudos de Lopes (2011), que também observou que as concentrações de *P. amapa* aplicado topicamente em *R. nasutus* demonstravam maior longevidade que o grupo controle (puro e metanol).

Isso demonstra que o óleo essencial de *Myrciaria floribunda* levou a uma diminuição do período de desenvolvimento dos triatomíneos tratados nas concentrações 137,5µg (MF1) e 275µg (MF2).

Na mortalidade das ninfas de 5° estágio, o grupo controle puro e o controle com DMSO não apresentaram diferença entre si, mas apresentaram diferença significativa ($P < 0,001$) quando confrontados com o grupo tratado em ambas as concentrações. Para o grupo tratado foi observado que a mortalidade das ninfas logo após a aplicação da concentração 137,5µg (MF1) foi de 57% em menos de 60 segundos e no período durante o experimento morreram mais 20% e para a concentração 275µg (MF2) morreram 83% das ninfas em menos de 60 segundos e apenas 10% no período durante o experimento (Tabela 9). Os resultados encontrados neste estudo corroboram os resultados encontrados por Avelar-Freitas *et al.* (2012) que observaram um aumento gradativo da mortalidade das ninfas de *R. nasutus*, conforme o aumento das concentrações de *Ageratum fastigiatum*, assim como nas pesquisas de Carneiro *et al.* (2013), que também observaram o aumento da mortalidade das ninfas de *R. neglectus* conforme a concentração de *Annona coriacea* aumentava. Diferenciando Castro *et al.*, (2012), que relataram que a mortalidade de *R. prolixus* tratados topicamente com Physalin B não apresentou diferença do grupo controle.

Carvajal *et al.* (2010) observaram a maior mortalidade das ninfas de 5° estágio de *Rhodnius pallescens* Barber, 1932, *R. prolixus*, *Rhodnius colombiensis* Moreno Mejía, Galvão & Jurberg, 1999 tratados com *Solanum macranthum* em 24h, diferenciando desse estudo que demonstrou um tempo máximo de 60 segundos.

Tabela 9: Mortalidade de ninfas de 5° de *Rhodnius nasutus* estágio durante o experimento e em menos de 60 segundos (% e número absoluto), tratados com diferentes concentrações do óleo essencial de *Myrciaria floribunda*, sob condições de laboratório.

Grupo (Tratamentos)	Mortalidade de ninfas durante o experimento		Mortalidade de ninfas em menos de 60 segundos	
	Número absoluto	%	Número absoluto	%
	Controle puro	11	37	0
Controle DMSO	15	50	0	0
MF1	6	20	17	57
MF2	3	10	25	83

O dendrograma (figura 25) demonstra um índice de similaridade de 85% para a mortalidade das ninfas quando se comparou o grupo controle puro, com o grupo controle com DMSO. Já a mortalidade do grupo tratado nas concentrações 137,5µg (MF1) e 275µg (MF2) apresentou um índice 89% de similaridade entre elas.

Isto evidencia que o grupo controle puro e com controle DMSO estão no mesmo grupo e separados das concentrações 137,5µg (MF1) e 275µg (MF2) do grupo tratado devido ao baixo nível de similaridade que demonstrou ser de apenas 66%.

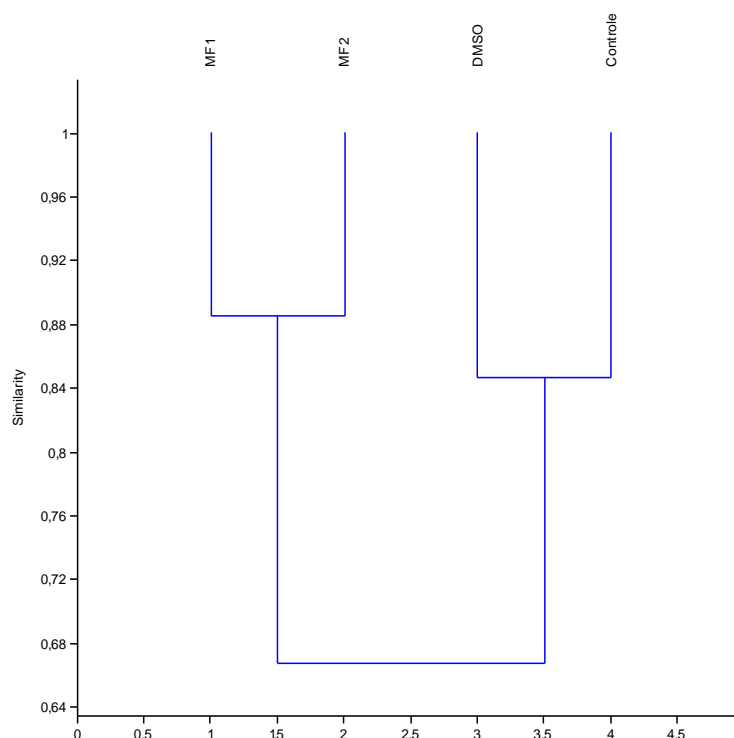


Figura 25. Dendrograma demonstrando a relação de mortalidade das ninfas de *Rhodnius nasutus*, entre o grupo controle (puro e com DMSO) e os grupo tratado com diferentes concentrações (137,5 μ g (MF1) e 275 μ g (MF2)) do óleo essencial de *Myrciaria floribunda*, sob condições de laboratório.

Na busca de encontrar o local de atuação da substância foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura, onde não foram observadas alterações morfológicas para todos os grupos estudados como observados nas figuras de 26 a 29. Podendo assim descartar que a mortalidade encontrada esteja relacionada a alguma estrutura complexa, como por exemplo, o colabamento das traqueias, mas levantando a hipótese que a mortalidade pode estar relacionada à lise celular. Corroborando as pesquisas de Cabral *et al.* (2000), que não observaram alterações morfológicas em nenhum dos grupos de *R. prolixus* tratados topicamente com lignoide e neolignoide e ainda, diferenciando dos estudos de Lopes (2011), que observou alterações morfológicas através de microscopia eletrônica de varredura em *R. nasutus* tratados com *P. amapa*.



Figura 26. Micrografia eletrônica de varredura do espiráculo do adulto de *Rhodnius nasutus* pertencente ao grupo controle puro.

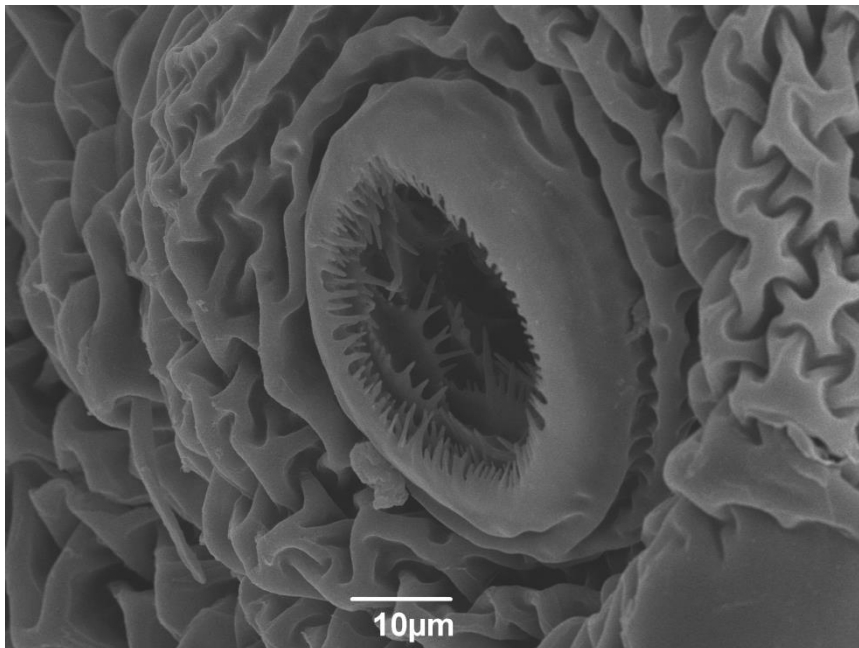


Figura 27. Micrografia eletrônica de varredura do espiráculo do adulto de *Rhodnius nasutus* pertencente ao grupo tratado com óleo essencial de *Myrciaria floribunda*.

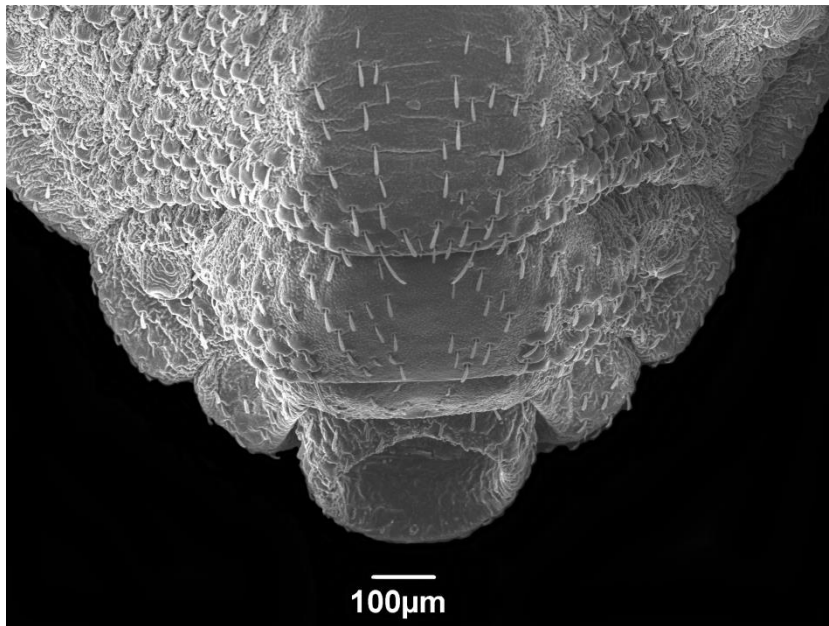


Figura 28. Micrografia eletrônica de varredura da genitália do adulto de *Rhodnius nasutus* pertencente ao grupo controle puro.

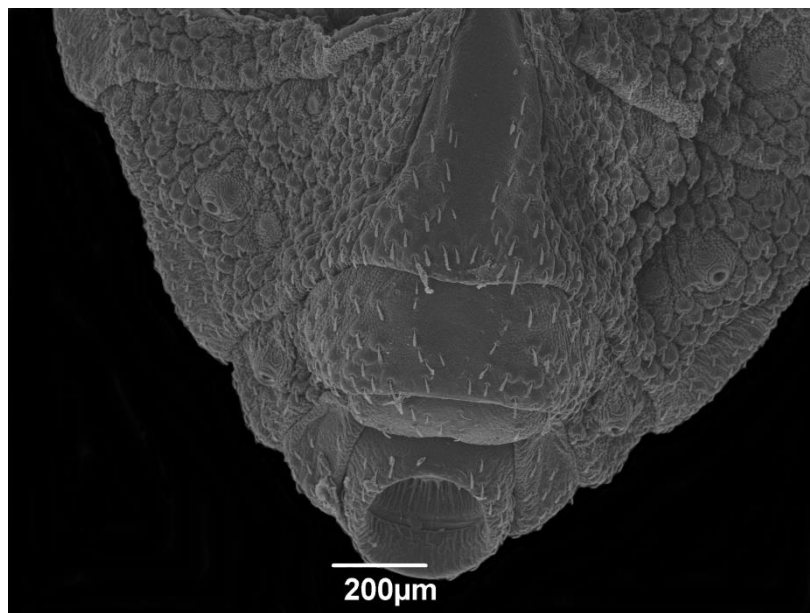


Figura 29. Micrografia eletrônica de varredura da genitália do adulto de *Rhodnius nasutus* pertencente ao grupo tratado com óleo essencial de *Myrciaria floribunda*.

7. CONCLUSÕES

1- A quantidade de sangue ingerido foi menor para os grupos tratados com o biflavonoide (Lophirona B) de *L. nobilis* e o óleo essencial de *M. floribunda*, porque ambos os grupos apresentaram um decréscimo de acordo com o aumento da concentração. Confirmando que as substâncias influenciaram na ingestão sanguínea de *R. nasutus*.

2- A perda de peso de ninfas de *R. nasutus* sofreu influência nas duas substâncias, tendo o biflavonoide (Lophirona B) apresentado a maior perda nas primeiras 24h e o óleo essencial apresentou um crescimento gradativo de acordo com o aumento da concentração. Demonstrando que as substâncias influenciaram na perda de peso dos insetos.

3- O tempo de desenvolvimento de ninfas de 5º estágio a adulto demonstrou alteração quando tratado com ambas as substâncias, tendo biflavonoide (Lophirona B) apresentado um aumento no período de desenvolvimento e o óleo essencial apresentado um decréscimo no período de desenvolvimento.

4- A longevidade dos adultos foi alterada em ambas as substâncias, tendo o biflavonoide (Lophirona B) apresentado um decréscimo gradativo de acordo com o aumento da concentração de Lophirona B e o óleo essencial apresentou um aumento gradual de acordo com o aumento da concentração. Demonstrando que as substâncias influenciaram na longevidade dos adultos.

5- A taxa de mortalidade das ninfas para o biflavonoide (Lophirona B) apresentou um aumento gradativo de acordo com o aumento da concentração da substância. Isso pode indicar que a utilização de concentrações mais altas podem ser promissoras no controle de *R. nasutus*. Entretanto, a taxa de mortalidade das ninfas para o óleo essencial foi alta para as concentrações testadas e com um tempo máximo de mortalidade de 60 segundos. Isso indica que a substância possui atividade inseticida.

6- As alterações morfológicas nas pernas e asas causadas pelo biflavonoide (Lophirona B) de *L. nobilis* provavelmente dificultariam a locomoção e a dispersão (terrestre e aérea) assim tornando estes insetos alvos fáceis aos predadores em campo. Assim como as deformidades no abdome, cabeça e aparelho bucal possivelmente dificultariam a capacidade reprodutiva e a alimentação dos adultos de *R. nasutus*. As deformidades ocorreram apenas no grupo tratado, assim podendo afirmar que esta substância causou as alterações morfológicas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1- Foram testadas apenas três concentrações do biflavonoide (Lophirona B), tornando-se necessárias à realização de mais pesquisas com outras concentrações da substância para alcançar os objetivos pendentes, bem como encontrar a concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀).

2- Foram realizados apenas microscopia de varredura para encontrar o local de atuação do óleo essencial, necessitando assim de mais estudos, como a realização de microscopia de transmissão e histologia para alcançar o objetivo pendente. Contudo para o óleo essencial foi encontrado a substância ativa e a concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, J.E. História natural da doença de Chagas no Estado do Ceará. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, pp. 341, 1987.

APEL, M.A., LIMA, A.E.L., SOUZA, A., CORDEIRO, I., YOUNG, M.C.M., SOBRAL, M.E.G., SUFFREDINI, I.B., MORENO, P.R.H. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the Atlantic Rain Forest (São Paulo - Brazil). *Pharmacologyonline* v. 3: p. 376-383, 2006.

APG (The Angiosperm Phylogeny Group). An Ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Missouri Bot. Garden*. V. 85: p. 531-553, 1998.

ARÉVALO, A, CARRANZA, J.C., GUHL, F., CLAVIJO, J.A., VALLEJO, G.A. 2007. Comparación del ciclo de vida de *Rhodnius colombiensis* Moreno, Jurberg & Galvão, 1999 y *Rhodnius prolixus* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomédica*; v. 27, n. 1: p. 119-29, 1999.

ARGOLO, A.M., FELIX, M., PACHECO, R., COSTA, J. Doenças de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. *Editora Imperial Novo Milênio*. Rio de Janeiro - RJ, p. 29 - 33, 2008.

AVELAR-FREITAS, B.A., DIAS, J.V.L., TIBÃES, G.G., ROCHA, C.A., BAHIA-OLIVEIRA, G.H., GRAEL, C.F.F., PIRES, H.H.R. The effect of *Ageratum fastigiatum* extract on *Rhodnius nasutus*, vector of Chagas disease. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2012.

BARROSO, G.M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, UFV: MG, 1986.

BENTO, D.N.C., FARIAS, L.M., GODOY, M.F., ARAÚJO, J.F. Epidemiologia da doença de Chagas na zona rural do município de Teresina- Piauí, Brasil. *Rev. da Soc. Bras. de Medicina Tropical*. V. 25: p. 51 - 58, 1992.

BENTO, D.N.C., FREITAS, M., PINTO, A.S. Epidemiologia da doença de Chagas nos municípios de Castelo do Piauí e Pedro II, Estado do Piauí, Brasil. *Rev. Soc. Bras. de Medicina Tropical*. V. 22: p. 73 – 79, 1989.

BRAGA, M.V., PRATA, K.C., BRAZIL, R.P. Biology of Nymphs of *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Hemiptera: Reduviidae), Fed on Pigeon or on Swiss Mouse Blood in Laboratory Conditions. *Rev. Brasil. Biol.*, v. 59, n. 1: p. 91-94, 1999.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A. & NETO, M.B. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2ª ed. *Ed. Guanabara Koogan*, pp. 431, 2000.

CABRAL, M.M.O., GARCIA, E.S., KELECOM, A. Lignanes from the Brazilian *Melia azedarach*, and their activity in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 90, n. 6: p. 759 – 763, 1995.

CABRAL, M.M.O., GARCIA, E.S., REMBOLD, H., DE SIMONE, S.G., KELECOM, A. Anti-moulting activity in Brazilian *Melia azedarach*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 1: p. 117 – 118, 1996.

CABRAL, M.M.O., KELECOM, A., GARCIA, E.S. Effects of the lignan, pinoresinol on the moulting cycle of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*, and of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Fitoterapia*, v. 70, p. 561 – 567, 1999.

CABRAL, M.M.O., KOLLIEN, A., KLEFFMANN, T., AZAMBUJA, P., GOTTLIEB, O.R., GARCIA, E.S., SCHAUB, A.G. *Rhodnius prolixus*: Effects of the neolignan burchellin on *in vivo* and *in vitro* diuresis. *Parasit. Research*, v. 86: p. 710 – 716, 2000.

CABRAL, M.M.O., SCHAUB, G.A., AZAMBUJA, P., GOTTLIEB, O.R., GARCIA, E.S. 1998b. Lignans and neolignans as insect growth regulators of *Rhodnius prolixus*: a study of *Trypanosoma cruzi* development. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 93 suppl. II, 319.

CAILLEAUX, S.R.P., CUNHA, V., VERLY, S., JUNIOR, V.D.L., JURBERG, J. Resistência ao jejum de *Rhodnius stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) em condições de laboratório. *Rev Pan-Amaz Saude*, v. 2, n. 2: p. 39 – 43, 2011.

CARNEIRO, A.P., PEREIRA, M.J.B., GALBIATI, C. Biocide activity of *Annona coriacea* seeds extract on *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae). *Rev. Biol. Trop.* v. 61, n. 1: p. 419 - 427, 2013.

CARVAJAL, J.E.H., ORJUELA, Y.F., VALLEJO, G.A. Evaluación de la actividad insecticida de *Solanum macranthum* (Dunal) sobre ninfas de los estadios IV y V de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius colombiensis*. *Revista Cubana de Farmacia*. V. 45, n. 1: p. 71-78, 2010.

CASTRO, D.P., MORAES, C.S., GONZALEZ, M.S., RIBEIRO, I.M., TOMASSINI, T.C.B., AZAMBUJA, P., GARCIA, E.S. Physalin B inhibits *Trypanosoma cruzi* infection in the gut of *Rhodnius prolixus* by affecting the immune system and microbiota. *Journal of Insect Physiology*. v. 58: p. 1620 – 1625, 2012.

CORTÉZ, M.G.R., GONÇALVES, T.C.M. Resistance to starvation of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) under laboratory conditions (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 93, n. 4: p. 549-554, 1998.

COSTA LIMA, A.M. *Insetos do Brasil*, 2º tomo, Hemípteros. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional. Pp. 351, 1940.

DAHLGREN, R.M.T. A revised system of classification of the angiosperms. *Bot. J. Linn. Soc.* V. 80, n. 2: p. 91-124, 1980.

DIÁRIO DO PARÁ. Desenvolvido por Empresa de Jornalismo - Diário do Pará. Apresenta textos sobre doença de Chagas. Disponível em: <http://www.diariodopara.com.br>. Acessado em: 5 mar. 2014, 2010.

DIAS, J. C. P. Ecological aspects of the vectorial control of Chagas' disease in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, v. 10, n. 2: p. 352-359, 1994.

DIAS, J.C.P., Epidemiologia *In*: Brener, Z., Andrade, Z.A. & Neto, M.B. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2ª ed. Ed. Guanabara Koogan, pp. 431, 2000.

DIOTAIUTI, L.G. Ecology of *Rhodnius nasutus* (Stal 1859) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada of the Araripe, Ceará, Brazil. *Dissertação de Mestrado* - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa René Rachou. Belo Horizonte, 2007.

EMBRAPA. Desenvolvido por Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. Apresenta textos sobre bioinseticidas. Disponível em: <http://www.cpa.embrapa.br>. Acessado em: 13 mai. 2010.

FERES, F. O Gênero *Luxemburgia* A. St.-Hil. (Ochnaceae) - revisão taxonômica e estudo cladístico. *Tese de Mestrado*, Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2011.

FUNASA. *Controle de Vetores - procedimentos de segurança*. 1º Ed., Brasília, Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde – Ascom/Pre/FUNASA, p. 15-21, 2001.

GALVÃO, C., CARCAVALLO, R., ROCHA, D.S., JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily *Triatominae* Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, v. 202: p. 1-36, 2003.

GONÇALVES, T.C.M., CUNHA, V., OLIVEIRA, E., JURBERG, J. Alguns aspectos da biologia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, em condições de laboratório (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n. 2: p. 275-280, 1997.

HARMATHA J., NAWROT J. Comparison of the feeding deterrent activity of some sesquiterpene lactones and a lignan lactone towards selected insect storage pests. *Biochemical Systematic and Ecology*, v. 12, n. 1: p. 95 – 98, 1984.

JOLY, A.B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*, 12º Ed., São Paulo, Cia Editora Nacional, pp. 777, 1988.

JURBERG, J., COSTA, J.M., GONÇALVES, T.C.M., GARCIA, E.S., DE AZAMBUJA, P. 1986. Alterações biomorfológicas causadas pela aplicação de Precoceno II em ninfas de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 81(2): 171-184.

JURBERG, J., COSTA, J.M., GONÇALVES, T.C.M., GARCIA, E.S., DE AZAMBUJA, P. Efeitos morfológicos de Precoceno II em ninfas *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera - Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4: p. 397-407, 1984.

- LANDRUM, L.R. & KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, v. 49, n. 4: p. 508-536, 1997.
- LENT & WYGODZINSKY. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. History*, p. 163:123 - 520, 1979.
- LIMA, M.M., SARQUIS, O. Is *Rhodnius nasutus* (Hemiptera; Reduviidae) changing its habitat as a consequence of human activity? *Parasit. Research*, v. 102: p. 797 - 800, 2007.
- LIMA, M.M., COUTINHO, C.F.S., GOMES, T.F., OLIVEIRA, T.G., DUARTE, R., BORGES-PEREIRA, J., BÓIA, M.N., SARQUIS, O. Risk Presented by *Copernicia prunifera* Palm trees in the *Rhodnius nasutus* distribution in a Chagas disease-endemic area of the Brazilian northeast. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, n. 5, p. 750 – 754, 2008.
- LIMBERGER, R.P., SOBRAL, M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, v. 27: p. 916-919, 2004.
- LIN, Y.M., FLAVIN, M.T., SCHURE, R., CHEN, F.C., SIDWEL, R., BARNARD, D.L., HUFFMAN, J.H., KERN, E.R. 1999. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta medica*, v. 65, n. 2 p. 120-125.
- LOPES, M.B.P. Bioatividade do Látex de *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae) Sobre o Desenvolvimento de *Rhodnius nasutus* (Stål, 1859) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Monografia de especialização*, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - IOC), 2011.
- LÓPEZ, A.; BICERRA, E.; DÍAZ, E. Perfil ecológico de cuatro rodales de camu camu árbol *Myrciaria floribunda* (H. West. ex Willd) O. Berg. en Ucayali. *Ecología Aplicada*. v. 5, n.1, p. 45-52, 2006.
- MACRAE, W.D., TOWERS, G.H.N. Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, v. 23, n. 6: p. 1207-1220, 1984.
- MALDONADO CAPRILES J.M. Systematic catalogue of the Reduviidae of the world (Insecta: Heteroptera). *University of Puerto Rico*. (Mayaguez). pp. 694, 1990.
- MATSUI, K., MUNAKATA, K. The structure of piperenone, a new insect antifeeding substance from *Piper futokadzura*. *Tetr. Letters*, v. 24: p. 1905-1908, 1975.
- MELLO, C.B., UZEDA, C.D., BERNARDINO, M.V., MENDONÇA-LOPES, D., KELECOM, A., FEVEREIRO, P.C.A., GUERRA, M.S., OLIVEIRA, A.P., ROCHA, L.M., GONZALEZ, M.S. Effects of the essential oil obtained from *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) on the development of *Rhodnius prolixus* nymphae. *Braz J. Pharmacogn.* v.17, n. 4, 2007.
- MESSANGA, B.B., KIMBU, S.F., SONDEGAM B.L., BODO, B. Triflavonoids of *Ochna calodendron*. *Phytochemistry*, v. 59, p. 435, 2002.

MIYAZAWA M., FUKUYAMA, M., YOSHIO, K., KATO, T., ISHIKAWA, Y. Biologically active components against *Drosophila melanogaster* from *Podophyllum hexandrum*. *J.Agric. Food Chem.* v. 5, 108 -110, 1999.

OLIVEIRA, M.C.C. Constituintes Químicos de *Luxemburgia nobilis*. *Tese de mestrado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), 2000.

PEREIRA, N.P., MENDONÇA, P.P., TRIDICO, L.M., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Descrição do cariótipo de *Triatoma vandae* (Triatominae, Heteroptera). In: *56º Congresso Brasileiro de Genética*, Casa Grande Hotel Resort- Guarujá-SP, 2010.

PERONDINI, A.L.P. Biologia de *Triatoma brasiliensis*. II. Observações sobre utogenia. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 9: p. 63 – 70, 1975.

PERLOWAGORA-SZUMLEVICZ A. Estudo sobre a biologia do *T. infestans* o principal vetor da doença de chagas - Importância de algumas de suas caract. biológicas no planejamento de esquemas de combate a esse vetor. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Tropicais*, v. 21: p. 117 – 159, 1969.

PÍCON, C., DELGADO DA LA FLOR F., TRUEBA, C.P. Descripciones de camu camu. INIPA- *Programa Nacional de Cultivos Tropicales*. (Informe técnico número 8). Lima, Perú, pp. 55, 1987.

PINEDO, M., LINARES, C., MENDOZA, H., ANGUIZ, R. Plan de mejoramiento genético de camu camu. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. Iquitos, Perú, pp. 52, 2004.

PLANTEMED. Apresenta textos sobre plantas medicinais. Disponível em: http://www.plantamed.com.br/div/plantas_medicinais_acre. Acessado em: 26 jun. 2010.

REY, L. *Parasitologia*. 4º Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 312-313, 2008.

RASSI, A.JR., RASSI, A., MARIN-NETO, J.A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 104, n. 1, p. 152-158, 2009.

RIBEIRO, J.E.L. S., HOPKINS, M.J.G., VICENTINI, A., SOTHERS, C.A., COSTA, M.A.S., BRITO, J.M., SOUZA, M.A.D., MARTINS, L.H.P., LOHMANN, L.G., ASSUNÇÃO, P.A.C.L., PEREIRA., SILVA, C.F., MESQUITA, M.R., PROCÓPIO, L.C. Flora da Reserva Ducke: *Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. Manaus: Editora INPA. p. 816, 2002.

ROCHA DS, FONSECA AH, COSTA FA, JUBERG J, GALVÃO C. Desenvolvimento de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872, alimentado através de membrana de silicone e em camundongos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4: p. 553-558, 1997.

ROCHA, D.S., JURBERG, J., CARCAVALLO, R.U., CUNHA, V., GALVÃO, C. Influence of the temperature and humidity on the biology of *Rhodnius neglectus* Lent,

1954 in laboratory conditions. *Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical*, v. 34, n. 4: p. 357-363, 2001.

ROCHA, D.S., SANTOS, C.M., CUNHA, V., JURBERG, J., GALVÃO, C. Ciclo Biológico em Laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), Potencial Vektor Silvestre da Doença de Chagas na Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, n. 6: p. 591-595, 2004.

RUSSEL, G.B., SING, P., FENEMORE, P.G. Insect-control chemical from plants. III. Toxic lignans from *Libocedrus bidwillii*. *Aust. J. Biol. Sci.*, p. 99 -103, 1976.

SANTOS, E.D. Fenologia e Biometria de Frutos de Cambuí (*Myrciaria floribunda* O.Berg.) de Populações Nativas e Cultivadas em Alagoas. *Dissertação de mestrado em Agronomia na Universidade Federal de Alagoas*, Rio Largo - AL, 2010.

SCHOFIELD, C. J. The biosystematics of Triatominae. In Biosystematics of Haematophagous Insects. Systematics Association special, v. 37, p. 284–312, 1988.

SCHOFIELD, C. J., & Galvão, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, v. 110, n. 2-3, p. 88–100, 2009.

SILVA, I.G., SILVA, H.H. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3: p. 377-382, 1989.

SILVEIRA, A.C. Current situation with Chagas disease vector control in the Americas. *Cad. Saúde Pública*, v.16, n. 2, 2000.

SOARES, M.J.S., FILHO, P.N.S. & BENTO, D.N.C. Estudo do ciclo evolutivo do *Rhodnius nasutus* Stal, 1859, em laboratório. *Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical*. v. 28, n. 2: p. 113 -116, 1995.

SOKAL, R.R., ROHLF, F.J. Principios y metodos estadísticos en la investigación biológica. 1ª. Ed. **H. Blume ediciones**, Madrid, España, p. 220 – 223, 1979.

STOKA, A.M.. Ecdysteroids, juvenile hormones and metamorphosis in triatominae. *Chaga's Disease Vectors*. v. 3: p. 71-94, 1987.

THI, A., MARTIN, M.T., THI, R.G., VUIDEPOT, I., SONDEGAM, B.L., BODO, B. Lophiroflavans B and C, Tetraflavonoids of *Lophira alata*, *Phytochemistry*, v. 31, n. 10 p. 3595-3599, 1992.

UNICEF-UNDP. World Bank. WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Chagas' disease. Oc. Disponível em: <http://who.int/tdr/dw/chagas2008.html>. Acesso em 08 de Marc. 2014. ISBN, 2008

WHO. Protocolo de evolución de efecto de insecticida contra triatominos. Taller sobre la evolución de efecto de insecticida contra triatominos. *World Health Organization*, Buenos Aires, Argentina, 1994.

WHO. TDR Strategic direction: Chagas Disease. *World Health Organization*, Geneva, Switzerland. TDR, p. 6, 2002.