

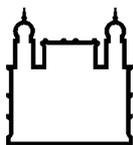
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Vigilância e Controle de Vetores

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE TRIATOMÍNEOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA SOBREVIVÊNCIA DO INSETO VETOR *Rhodnius prolixus* (HEMIPERA: HETEROPTERA: REDUVIIDAE, STÅL, 1859) E NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDAE, CHAGAS 1909) EM SEU HOSPEDEIRO INVERTEBRADO.

SEBASTIÃO CLEBSON DE MACEDO ANUNCIAÇÃO

Rio de Janeiro
Abril de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores

SEBASTIÃO CLEBSON DE MACEDO ANUNCIÃO

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE TRIATOMÍNEOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA SOBREVIVÊNCIA DO INSETO VETOR *Rhodnius prolixus* (HEMIPERA: HETEROPTERA: REDUVIIDAE, STÅL, 1859) E NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDAE, CHAGAS 1909) EM SEU HOSPEDEIRO INVERTEBRADO.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Vigilância e Controle de Vetores

Orientador (es): Dr^a. DANIELE PEREIRA DE CASTRO
Dr. MARCELO SALABERT GONZALEZ

RIO DE JANEIRO

Abril de 2022

de Macedo Anunciação, Sebastião Clebson.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE TRIATOMÍNEOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA SOBREVIVÊNCIA DO INSETO VETOR *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae, Stål, 1859) E NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae, Chagas 1909) EM SEU HOSPEDEIRO INVERTEBRADO. / Sebastião Clebson de Macedo Anunciação. - Rio de Janeiro, 2022.

65 f.; il.

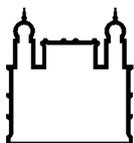
Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores, 2022.

Orientadora: Daniele Pereira de Castro.

Co-orientador: Marcelo Salabert Gonzalez.

Bibliografia: f. 60-66

1. *Triatoma vitticeps*. 2. doença de Chagas. 3. barbeiros. 4. *Trypanosoma cruzi*. 5. óleos essenciais. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores

AUTOR: SEBASTIÃO CLEBSON DE MACEDO ANUNCIÇÃO

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE TRIATOMÍNEOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA SOBREVIVÊNCIA DO INSETO VETOR *Rhodnius prolixus* (HEMIPERA: HETEROPTERA: REDUVIIDAE, STÅL, 1859) E NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDAE, CHAGAS 1909) EM SEU HOSPEDEIRO INVERTEBRADO.

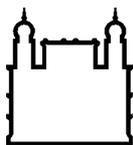
ORIENTADOR (ES): Dr^a. DANIELE PEREIRA DE CASTRO
Dr. MARCELO SALABERT GONZALEZ

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos José de Carvalho Moreira - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz)
Prof. Dr. Cristina Maria Giordano Dias (Secretaria Estadual de Saúde)
Prof. Dr. Maria Denise Feder (Universidade Federal Fluminense)
Prof. Dr. Simone Caldas Teves (Instituto Oswaldo Cruz)
Prof. Dr. Marise Maleck de Oliveira Cabral (Universidade Severino Sombra-USS)

Rio de Janeiro, 14 de abril de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado profissional em Vigilância e Controle de Vetores de **Sebastião Clebson de Macedo Anuniação**, sob orientação da Dr^a. Daniele Pereira de Castro. Ao décimo quarto dia do mês de abril de dois mil e vinte e dois, realizou-se às nove horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado profissional intitulada: "Distribuição geográfica de triatomíneos no estado do Rio de Janeiro e efeito de óleos essenciais na sobrevivência do inseto vetor *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae, Stål, 1859) e no desenvolvimento do parasito *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae, Chagas 1909) em seu hospedeiro invertebrado", no programa de Pós-graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Controle/Manejo Integrado de Vetores, na linha de pesquisa: Controle e manejo integrado de vetores. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Carlos José de Carvalho Moreira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Cristina Maria Giordano Dias– SES/RJ, Dr^a. Maria Denise Feder – UFF/RJ, e como suplentes: Dr^a. Simone Caldas Teves- IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Marise Maleck de Oliveira - Universidade de Vassouras/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado profissional. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Vigilância e Controle de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. A Coordenadora do Programa Dr^a. Daniele Pereira de Castro, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora, Rio de Janeiro, 14 de abril de 2022.

Dr. Carlos José de Carvalho Moreira (Presidente da Banca):

Dr^a. Daniele Pereira de Castro (Coordenadora do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

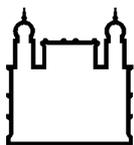
Aos meus pais, Dejair e Nilceia, pelo incentivo e amor em todos os momentos da minha vida. À minha esposa Elaine Luna, pelo seu amor e por estar sempre ao meu lado e aos meus filhos Mayara Luna e Matheus Luna.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar saúde e muita força para superar todas as dificuldades durante toda a trajetória do mestrado. A esta instituição e todo seu corpo docente, além da direção e administração do programa de pós-graduação do IOC que me proporcionaram as condições necessárias para que eu alcançasse meus objetivos. Um agradecimento todo especial a minha orientadora Daniele Castro, por toda sua atenção, dedicação e esforço para que eu pudesse ter confiança e segurança na realização deste trabalho. Meus agradecimentos aos técnicos do setor de vigilância ambiental dos municípios de Petrópolis (Biólogo Dione stock), Trajano de Moraes (Saulo Pacheco) e Paraty (André), onde foram feitos os trabalhos de coletas dos triatomíneos. Agradeço de coração ao meu amigo do Ministério da Saúde José Luis da Silva, que nos disponibilizou os dados para que o trabalho de coleta no estado do RJ pudesse ser realizado. Ao Dr. Marcelo Gonzalez da Universidade Federal Fluminense pela orientação e colaboração. Aos pesquisadores Leandro Rocha da Universidade Federal Fluminense e Ana Claudia Amaral de Farmanguinhos, pela colaboração e fornecimentos dos óleos essenciais e preparação das emulsões para os testes nos triatomíneos. A Ana Clara Brito de Farmanguinhos que ajudou na realização de alguns ensaios de atividade inseticida dos óleos essenciais. A Dra. Thaiane Verly e Dra. Constança Britto pelos ensaios de infecção dos triatomíneos. Aos companheiros da pós-graduação e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes nas minhas lembranças, nos bons e maus momentos que passamos durante esses anos de curso.

Agradeço também a minha esposa, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, quero agradecer também aos meus filhos, Matheus Luna e Mayara Luna, que embora não tivessem conhecimento disto, mas iluminaram de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos. E não deixando de agradecer de forma grata e grandiosa meus pais, a quem eu rogo todas as noites a minha existência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio ao Programa de Pós-graduação de Vigilância e Controle de Vetores. Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) pelo apoio e todos os funcionários da Secretaria Acadêmica (SEAC) pela disponibilidade e atenção em ajudar. À Fiocruz e às agências de fomento (FAPERJ, CNPq) pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LABFISI). A toda equipe do LABFISI pelo incentivo e ajuda.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE TRIATOMÍNEOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA SOBREVIVÊNCIA DO INSETO VETOR *Rhodnius prolixus* (HEMIPERA: REDUVIIDAE, STÅL, 1859) E NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDAE, CHAGAS 1909) EM SEU HOSPEDEIRO INVERTEBRADO.

Resumo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM VIGILÂNCIA E CONTROLE DE VETORES

Sebastião Clebson de Macedo Anunciação

A doença de Chagas (ou tripanossomíase americana), é uma doença negligenciada causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, sendo o inseto vetor, triatomíneo, o principal meio de transmissão da doença. O número de casos de doença de Chagas via infecção oral tem aumentado, através de consumo de alimentos contaminados com inseto ou fezes de inseto infectado. Portanto, a vigilância entomológica e o controle do inseto vetor são as intervenções mais eficazes. Em relação ao controle, a busca por novos produtos com diferentes modos de ação se torna necessária para evitar o desenvolvimento de populações resistentes. Nesse trabalho realizamos uma triagem de óleos essenciais puros ou em emulsão via aplicação tópica e de contato, buscando os que apresentassem maior atividade biológica sobre a sobrevivência, ecdise, fagoinibição e infecção por *T. cruzi* em ninfas de 5 estágio de *Rhodnius prolixus*. Além disso, foram realizadas coletas de triatomíneos em localidades com notificações de presença de inseto vetor e análise de infecção dos insetos coletados. Analisamos também os dados constantes dos registros no LACEN/SES/RJ e do IOC (Fiocruz), sobre a presença de triatomíneos e de infecção por *T. cruzi* nesses insetos. Dos óleos essenciais analisados, o NEO (930µg/inseto) causou mortalidade em 58,5% dos insetos infectados e tratados. Em relação à taxa de fagoinibição, os tratamentos dos insetos com OLA e VMFS2 causaram 44% e 100% de inibição da alimentação sanguínea, respectivamente. A taxa de ecdise dos insetos infectados tratados com MF2FS e OLA causaram redução das taxas para até 0% e 27,3%, respectivamente. O óleo essencial OLA causou 45,5% de má formação em adultos após ecdise. Em relação à infecção de *T. cruzi*, o tratamento dos insetos com o solvente etanol diminuiu a quantidade de parasitos por inseto e o óleo essencial NEO diluído em acetona reduziu significativamente a infecção por parasitos em todas as concentrações testadas. Essa triagem pode indicar este óleo essencial com potencial para o controle do inseto vetor ou no controle da infecção do flagelado agente etiológico da doença de Chagas. Em relação à coleta de triatomíneos no estado do Rio de Janeiro, Petrópolis foi o município com maior quantidade de vetores capturados, com presença de adultos e ninfas e infecção positiva por *T. cruzi*. Dos dados de registro da SES e do IOC, Petrópolis é também o município com maior quantidade de insetos coletados e maior número de insetos positivos para infecção por *T. cruzi*. A espécie de triatomíneo predominante foi *Triatoma vitticeps* seguido de *Panstrongylus geniculatus*. O intradomicílio foi o ambiente predominante dos triatomíneos encontrados. Os dados obtidos por essa análise podem contribuir para o melhor entendimento da distribuição de vetores de *T. cruzi* pelos municípios do Rio de Janeiro e, assim, nortear as ações de vigilância em saúde pela SES do RJ junto aos municípios, alertando para a necessidade de melhoria das ações destinadas à vigilância e controle da doença de Chagas.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE TRIATOMÍNEOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA SOBREVIVÊNCIA DO INSETO VETOR *Rhodnius prolixus* (HEMIPERA: REDUVIIDAE, STÅL, 1859) E NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITO *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDAE, CHAGAS 1909) EM SEU HOSPEDEIRO INVERTEBRADO.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN SURVEILLANCE AND VECTOR CONTROL

Sebstião Clebson de Macedo Anunciação

Chagas disease (or American trypanosomiasis) is an infection caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, and the insect vector, triatomine, is the main means of disease transmission. The number of cases of Chagas disease via oral infection has increased, through consumption of food contaminated with insects or infected insect feces. Therefore, entomological surveillance and vector insect control is the most effective intervention. Regarding control, the search for new products with different modes of action is necessary to avoid the development of resistant populations. In this work we screened essential oils diluted in solvents or as emulsions through topical application and contact treatment, looking for those with higher activity on survival, ecdysis, phagoinhibition of *Rhodnius prolixus* nymphs, treated, and the effect on infection of the *T. cruzi* parasite in the insect vector. In addition, we collected triatomines in localities with reported presence of the insect vector and analyzed the infection of the collected insects. Also, we analyzed the data of presence of triatomines and infection of these insects from the records in the SES and the IOC. Of the essential oils analyzed, NEO (930µg/insect) caused 58.5% mortality in infected and treated insects. Regarding phagoinhibition rate, the treatments of insects with OLA and VMFS2 caused 44% and 100% inhibition of blood feeding. The ecdysis rate of the infected insects treated with MF2FS and OLA caused reduction of the rates to as low as 0% and 27.3%, respectively. OLA essential oil caused 45.5% malformation of adults after ecdysis. Regarding *T. cruzi* infection, treatment of insects with the solvent ethanol decreased the number of parasites per insect and the essential oil NEO diluted in acetone reduced the infection of parasites in all concentrations tested. This screening may indicate the essential oil with the greatest potential to control the insect vector or to control infection of the Chagas disease parasite. Regarding the collection of triatomines in the state of Rio de Janeiro, Petrópolis was the municipality with the highest quantity of captured vectors, with the presence of adults and nymphs and positive infection by *T. cruzi*. From the SES and IOC registry data, Petrópolis is also the municipality with the largest number of insects collected and the highest number of positive insects for *T. cruzi* infection. The predominant triatomine species was *Triatoma vitticeps* followed by *Panstrongylus geniculatus*. And the intra-household was the predominant environment of the triatomines found. The data obtained from this analysis can contribute to a better understanding of the distribution of *T. cruzi* vectors in the municipalities of Rio de Janeiro. Thus, it can guide the actions of health surveillance by the SES in the municipalities and bring an alert for greater actions aimed at Chagas disease, which is a neglected disease.

ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 A doença de Chagas.....	15
1.1.1 Os Triatomíneos como vetores do <i>Trypanossoma cruzi</i>	17
1.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> e desenvolvimento no hospedeiro invertebrado	18
1.2 Controle de triatomíneos.....	20
1.2.2 Produtos naturais como controle de vetores e prevenção da transmissão de patógenos	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS PARTE 1	24
3.1 Triatomíneos e alimentação.....	24
3.2 Obtenção dos produtos naturais.....	24
3.3 Tratamentos dos insetos com os produtos naturais.....	25
3.4 Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> e infecção dos insetos.....	27
3.5 Fagoinibição, Mortalidade e Metamorfose.....	27
3.6 Contagem de Infecção de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
4. RESULTADOS PARTE 1	29
4.1 Mortalidade.....	29
4.2 Fagoinibição.....	33
4.3 Metamorfose.....	34
4.4 Infecção	388
5. DISCUSSÃO PARTE 1	43
6. MATERIAL E MÉTODOS PARTE 2	45
6.1 Coleta de triatomíneos	45
6.2 Identificação taxonômica de triatomíneos coletados.....	45

6.3 Diagnóstico de infecção por <i>T. cruzi</i>	46
6.4 Levantamento de registros de triatomíneos do estado do Rio de Janeiro	46
7. RESULTADOS PARTE 2	48
7.1 Coleta de triatomíneos no estado do Rio de Janeiro.....	48
7.2 Análise dos registros de triatomíneos da Secretaria de Saúde do Estado.....	50
8. DISCUSSÃO PARTE 2	55
9. CONCLUSÕES	58
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 2. Diferenciação da posição das antenas na cabeça dos diferentes gêneros de triatomíneos.....	17
Figura 3. Ciclo do <i>Trypanosoma cruzi</i> no inseto vetor.....	20
Figura 4. Porcentagem de mortalidade de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com diferentes solventes.....	29
Figura 5. Porcentagem de mortalidade de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com diferentes óleos essenciais.....	30
Figura 6. Porcentagem de mortalidade de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com óleo essencial PILO.....	30
Figura 7. Porcentagem de mortalidade de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com óleo essencial NEO.....	30
Figura 8. Porcentagem de ecdise de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com diferentes óleos essenciais.....	34
Figura 9. Porcentagem de ecdise de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com óleo essencial de PILO e NEO.....	35
Figura 10. Porcentagem de ecdise de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com diferentes solventes.....	35
Figura 11. Quantidade de parasitos em <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com óleo essencial de PILO e NEO.....	39
Figura 12. Quantidade de parasitos em <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com diferentes solventes.....	40
Figura 13. Quantidade de parasitos em <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com óleo essencial de PILO e NEO diluídos em acetona.....	41
Figura 14. Quantidade de parasitos em <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica com óleo essencial de LICA, OLA e VMFS2.....	42

Figura 15. Armadilha tipo Noireau.....	45
Figura 16. Coleta de triatomíneos em Trajano de Moraes-RJ.....	48
Figura 17. Coleta de triatomíneos em Petrópolis-RJ Triatomíneos- Petrópolis.....	49
Figura 18. Mapa dos municípios com registro de triatomíneos com <i>T. cruzi</i> no RJ.....	53
Figura 19. Mapa dos municípios com triatomíneos positivos com <i>Trypanosoma cruzi</i> por regiões do estado.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diluições e concentrações (mg/mL) dos óleos essenciais utilizados nos ensaios de tratamento de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Tabela 2. Porcentagem de mortalidade de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por aplicação tópica ou contato de diferentes óleos essenciais.....	32
Tabela 3. Porcentagem de <i>Rhodnius prolixus</i> que não alimentaram após tratamento de ninfas de quinto estágio com óleos essenciais.....	33
Tabela 4. Porcentagem de ecdise de ninfas de quinto estágio de <i>Rhodnius prolixus</i> após tratamento com óleos essenciais.....	36
Tabela 5. Porcentagem de má formação de adultos de <i>Rhodnius prolixus</i> após tratamento de ninfas de quinto estágio com óleos essenciais.....	37
Tabela 6. Registro dos municípios com registro de triatomíneos no estado do RJ.....	38
Tabela 7. Dados de espécies de triatomíneos, estágio de desenvolvimento, infecção para <i>Trypanosoma cruzi</i> e ambiente onde foi capturado em coletas realizadas em municípios do estado do Rio de Janeiro registrados na Secretaria Estadual de Saúde de 2008 a 2021.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACEs	Agentes de controle de endemias
BHI	caldo cérebro e coração ou brain heart infusion
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DC	doença de Chagas
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTUs	Unidades de Tipagem Discretas
EpiSUS	Programa de Treinamento em Epidemiologia Aplicada aos Serviços do Sistema Único de Saúde
GPA	Gerencia de Pesquisa em Antropozoonoses
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LABFISI	Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos
LABIMDOE	Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LIVEDIH	Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde - World Health Organization
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PBS	tampão fosfato salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
PIT	postos de identificação de triatomíneos
SES	Secretaria de Estado de Saúde
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
UFF	Universidade Federal Fluminense
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

1. INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana é uma doença potencialmente fatal, causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), Chagas (1909, 1911). Doença considerada de grande importância para a saúde pública mundial. Segundo dados da OMS (Organização Mundial de Saúde) estima-se que existam 75 milhões de pessoas em risco, com 6 a 7 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* e 14.000 mortes anuais em todo o mundo, especialmente em 21 países da América Latina que é uma região endêmica¹ (WHO, 2020). A DC já foi exclusivamente das Américas do Sul e Central, no entanto nas últimas décadas o padrão epidemiológico da DC vem mudando devido ao fluxo migratório, proporcionando aumento dos números de infecção por *T. cruzi* nos Estados Unidos, Canadá, alguns países da África, Mediterrâneo oriental e Pacífico Ocidental e em muitos países europeus¹. A estimativa do Ministério da Saúde (MS) é que no Brasil 1,9 milhões de pessoas são portadores crônicos da doença. Em 2017, foram confirmadas 4,5 mil mortes, sendo superadas apenas por doenças infecciosas como (HIV) Vírus da Imunodeficiência Humana e tuberculose². Em 2020, foram confirmados 146 casos de DC no Brasil, com mortalidade de 2% (3/146). Todos os óbitos ocorreram no estado do Pará. O maior número de casos foi registrado na região norte do país³. A DC apresenta quadro infeccioso, com fase aguda e crônica apresentando altas taxas de morbimortalidade em países endêmicos, entre eles o Brasil. A OMS reconhece a DC como uma doença negligenciada⁴.

Em 2006, o Brasil foi certificado pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) por ter eliminado o principal inseto transmissor do *T. cruzi* (*Triatoma infestans*) no país e pela melhoria na qualidade da coleta de sangue nos hemocentros, diminuindo o número de casos da transmissão nas últimas duas décadas⁵.

Apesar da diminuição de casos de DC, via transmissão pela picada e da eliminação do principal inseto vetor, *T. infestans* no país em 2006⁶, ocorre atualmente o aumento do número de casos de infecção oral, através de consumo de alimentos contaminados, principalmente no Norte do Brasil, Venezuela, Bolívia e Colômbia⁷.

As formas de infecção da DC causadas pelo agente etiológico *T. cruzi*, são pela picada do inseto vetor, por contaminação oral, por transmissão congênita, transfusão de sangue, acidente de laboratório e transplante. A infecção humana pelo inseto vetor ocorre quando o triatomíneo vetor pica o hospedeiro e defeca próximo ao local da picada, por onde o parasito

penetra através da pele ferida¹. O triatomíneo infectado pode também ser o responsável pela contaminação oral, na qual fezes do inseto ou o próprio inseto é macerado junto com o alimento que é ingerido pelos humanos (Fig. 1).

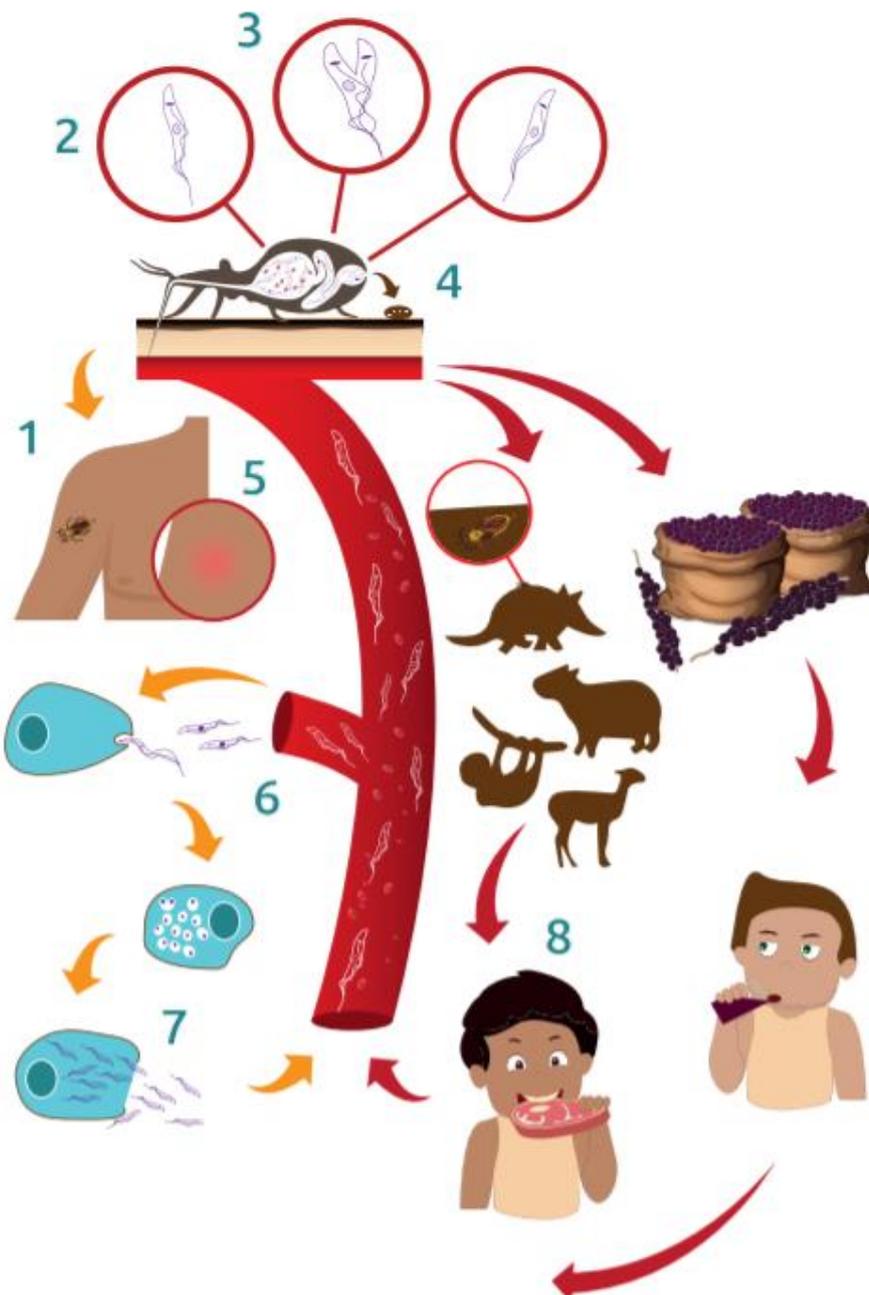


Figura 1. Ciclo do *Trypanosoma cruzi*. Ao picar o hospedeiro vertebrado infectado, o triatomíneo (1) ingere formas tripomastigotas; (2) no intestino médio posterior ocorre uma diferenciação e estas formas se tornam epimastigotas, capazes de se multiplicar (3), no intestino posterior *T. cruzi* se diferencia novamente na forma infectiva tripomastigota e é eliminado pelas fezes; (4). Ao se coçar, o hospedeiro vertebrado pode carrear as fezes até o local da picada, permitindo a entrada do parasito na ferida; (5). O *T. cruzi*, invade as células e se diferencia em formas amastigotas (sem flagelo), que também se multiplicam (6) até que arrebentam as células, entram na corrente sanguínea e se diferenciam em formas tripomastigotas que podem encontrar outras células ou serem ingeridas novamente por um triatomíneo (7). As fezes dos insetos também podem contaminar alimentos, ou carne mal passada de animais contaminados e transmitir o parasita (8). Imagem retirada De Meis & Castro (2017)⁸

1.1.1 Os Triatomíneos como vetores do *Trypanossoma cruzi*

A subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) é a única com capacidade de transmissão da DC, podendo albergar um complexo grupo de protozoários parasitos. A subfamília Triatominae é representada por 157 (154 existentes e 3 fósseis), e 2 sub-espécies compostas por cinco tribos⁹. Em duas dessas tribos (Rhodniini e Triatomini) são encontrados os três gêneros de importância médica (*Panstrongylus*, *Triatoma*, *Rhodnius*) (Fig. 2). Os triatomíneos são conhecidos popularmente por: barbeiro, chupão, procotó¹⁰. Os triatomíneos são insetos hematófagos, que se alimentam de sangue de animais mamíferos, aves e outros animais¹¹, em todos os estágios de desenvolvimento¹².

Assim como todos os insetos, possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. A cabeça dos triatomíneos é dividida em três regiões distintas: anteocular (anterior aos olhos), ocular, e pós-ocular. Nessa região estão presentes também as antenas, clipeo, genas, jugos, labro, rostro (aparelho bucal) olhos compostos e ocelos. De acordo com a posição das antenas e onde estão inseridas (tubérculos anteníferos) determinam-se os gêneros dos triatomíneos (Fig. 2). Outras regiões também úteis para definir os gêneros de triatomíneos são definidas a partir das proporções das regiões anteocular, ocular e pós-ocular; entre segmentos das antenas e do rostro; e entre as genas e o clipeo¹³.

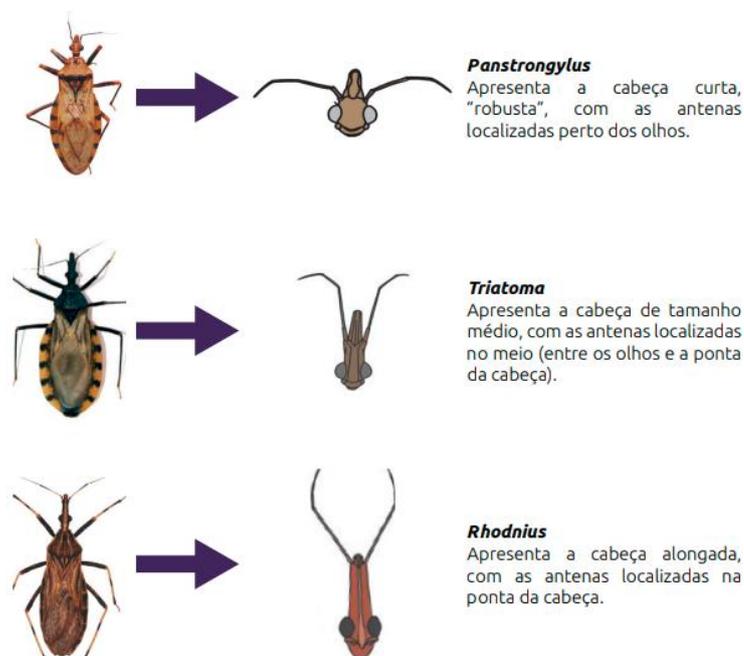


Figura 2. Diferenciação da posição das antenas na cabeça dos diferentes gêneros de triatomíneos. Imagem retirada de Meis & Castro (2017)⁸

Do momento da eclosão do ovo até a fase de adulto, os triatomíneos passam por cinco estádios de ninfas, que se diferenciam dos adultos por possuírem olhos menores, ausência de ocelos, ausência de asas e desenvolvimento incompleto das genitálias interna e externa. As ninfas de 4º e 5º estádios apresentam também tecas alares, (esboço das futuras asas)¹⁴. De acordo com o boletim divulgado em 2015 pelo II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, no Brasil foram registrados três gêneros e 15 espécies de triatomíneos de importância médica entre os anos de 2007 e 2011: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma maculata*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma sordida*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pictipes*, *Triatoma rubrovaria* e *Triatoma vitticeps*¹⁵.

De acordo com as coletas realizadas por Silveira (1984) em 1.942 municípios, em 18 estados brasileiros e mais distrito federal, vetores infectados e colonização domiciliar, as principais espécies de triatomíneos vetores do *T. cruzi* foram: *T. infestans*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. sordida* e *T. pseudomaculata*¹⁴.

No estado do Rio de Janeiro *T. vitticeps* é a principal espécie encontrada infectada com *T. cruzi*, tendo sido encontrados 465 triatomíneos no distrito de Triunfo em Santa Maria Madalena, região Serrana do Rio de Janeiro¹⁶. Porém em São Fidelis, município da região do Norte Fluminense, foram encontrados *P. geniculatus* em uma residência no intradomicílio¹⁷. A distribuição do *T. vitticeps* se restringe aos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia, com alto índice de domiciliação dessa espécie relatado nos estados de Minas Gerais e Bahia¹⁸. Nesses vetores, coletados entre os anos de 1989 e 1995, observou-se elevadas taxas de infecção por *T. cruzi*, além de relatos sobre a invasão e colonização do ambiente domiciliar¹⁹. Recentemente foi comprovado em estudo de Sangenis et al (2015)²⁰, casos da DC no Estado do RJ, cujo vetor incriminado foi *T. vitticeps*. Ainda de acordo com as informações no portal da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), no município de Mangaratiba no estado do Rio de Janeiro em, 2012 foram encontrados *T. pseudomaculata* com altas taxas de infecção natural²¹.

1.1.2 Trypanosoma cruzi e desenvolvimento no hospedeiro invertebrado

O protozoário do *T. cruzi* pertence ao reino Protista; sub-reino Protozoa; filo Sarcocystophora; ordem Kinetoplastida; família Trypanosomatidae; gênero *Trypanosoma*¹⁸.

As diferentes cepas de *T. cruzi* foram definidas a partir de parâmetros como: perfil parasitêmico, morfologia, virulência, patogenicidade e tropismo tissular. Atualmente, a diversidade biológica, bioquímica e genética das cepas de *T. cruzi* foram definidas a partir de

inúmeras abordagens ao longo dos anos para caracterização populacional de subgrupos de *T. cruzi*, e esses subgrupos foram definidos como: zimodemas, esquisodemas, biodemas, atualmente Unidades de Tipagem Discretas (DTUs). DTUs são “conjuntos de estoques geneticamente mais relacionados entre si, e que são identificáveis por marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos comuns”²². O gênero *Trypanosoma* são heteroxenos de vertebrados, sendo transmitidos por insetos hematófagos. O ciclo biológico dos tripanosomatídeos apresenta mudanças nas formas celulares, graças ao complexo fenômeno de diferenciação celular. O pleomorfismo é evidenciado durante a transição entre os meios de vida no vertebrado e invertebrado, mas pode ocorrer também dentro do mesmo vertebrado. As formas celulares são: epimastigotas, tripomastigotas, amastigotas²³.

O protozoário *T. cruzi* tem a capacidade de infectar muitos hospedeiros vertebrados entre eles: humanos, animais silvestres e domésticos, e invertebrados como os triatomíneos. O parasito da DC possui diferentes funções morfológicas e funcionais, alternando entre estágios que passam por divisão binária e as formas não replicativas e infectantes²⁴. No sangue dos mamíferos o parasito apresenta-se nas formas de tripomastigotas (flagelada) apresentando acentuada motilidade e nos tecidos encontram-se as formas amastigotas (sem flagelo externo ao corpo celular). No trato digestivo do inseto vetor ocorre a diferenciação do parasito dando origem as formas infectantes nas fezes do inseto vetor²⁵.

O processo infeccioso no hospedeiro invertebrado ocorre quando formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (estágio replicativo), no intestino médio posterior e se aderem às membranas perimicrovilares das células intestinais (Fig. 3). Em seguida, os parasitos migram para o intestino posterior ou reto, onde se aderem à camada cerosa da cutícula através de interações hidrofóbicas (Fig. 3). Nesta fase os epimastigotas se diferenciam para tripomastigota metacíclico, forma não replicativa e infecciosa, sendo eliminados pelas fezes ou urina no momento da alimentação sanguínea²⁴ (Fig. 3).

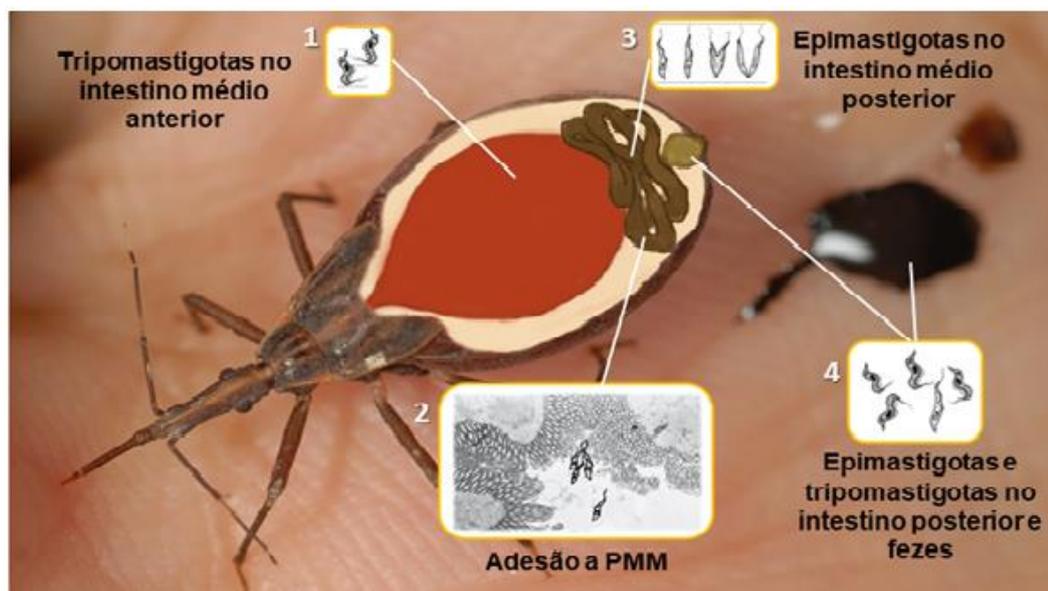


Figura 3. Ciclo do *Trypanosoma cruzi* no inseto vetor. PMM: membrana perimicrovilar. Adaptado de Azambuja et al²⁵ (2016).

1.2 Controle de triatomíneos

De acordo com as diretrizes do MS, publicadas na portaria regulamentadora de execuções e financiamento nº 1.378/13, das ações de vigilância e controle da DC visam: interrupção da transmissão da DC por meio vetorial e pela transfusão de sangue; detecção, notificação, investigação e tratamento dos casos agudos e congênitos e, assistência aos pacientes chagásicos crônicos²⁶. Em relação à vigilância entomológica da DC, a rotina das atividades entomológicas preconizada pelo ministério da saúde, seja na vigilância ativa como na passiva, são executadas no ambiente domiciliar. Essa atividade também sofreu a redução dos trabalhos de campo com o surgimento da pandemia por COVID-19. A atividade de busca ativa programada é preconizada para áreas com fauna triatomínica com risco de domiciliação e visa a necessária implantação de postos de identificação de triatomíneos (PIT) além do fortalecimento da educação em saúde.³

No Brasil os principais grupos de inseticidas usados no controle de vetores são: organofosforados, carbamatos e peritróides²⁷. Os inseticidas podem ser de ação química ou biológica, podendo causar morte ou impedir o desenvolvimento do inseto. O princípio ativo dos inseticidas pode ser de origem sintético ou natural com variadas formulações e técnicas de aplicação, como: spray, iscas, difusão de liberação lenta²⁸.

O uso indiscriminado de inseticidas sintéticos no controle vetorial causa algumas preocupações quanto sua à toxicidade e possíveis impactos ambientais. Alguns desses efeitos descritos são: toxicidade para humanos e mamíferos em geral, peixes e aves, contaminação do

solo, água e ar e, ocorrência de resistência fisiológica do inseto²⁹. O fenômeno de resistência aos inseticidas ocorre a partir do resultado de uma modificação genética que proporciona alterações fisiológicas, morfológicas ou comportamentais de uma população³⁰.

1.2.2 Produtos naturais como controle de vetores e prevenção da transmissão de patógenos

Os metabólitos secundários de plantas geralmente apresentam marcante atividade biológica e possuem estrutura complexa, baixo peso molecular e encontram-se em menor concentração que os metabólitos vegetais primários. Os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica nos metabólitos secundários são: óleos essenciais, quinonas, taninos, alcaloides, cumarinas, flavonoides³¹. Estas substâncias apresentam especial interesse por sua capacidade de atuação específica sobre organismos alvos e ausência ou mínima atividade biológica para organismos não alvos, além do baixo impacto ambiental associado à sua aplicação, o que as qualifica para utilização em programas integrados para o controle de vetores de patógenos causadores de doenças e pragas agrícolas³².

Estudos realizados por Moraes et al (2020)³³, demonstraram que óleos essenciais das espécies *Cinnamodendron dinisii* e *Siparuna guianensis*, apresentaram atividade tripanosomicida *in vitro* contra *T. cruzi* em concentrações de 282,93 e 209,30 µg/mL, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). Foi sugerido pelos autores do grupo que a atividade desses óleos estaria relacionada a terpenos oxigenados presentes em pequena quantidade em ambas as espécies vegetais. Em outro estudo realizado por Souza et al³⁴ (2018). óleos essenciais de *Alpinia zerumbet* e *Alpinia vittata*, apresentaram efeitos de mortalidade e fago-inibição em *Rhodnius nasutus*. Os principais constituintes encontrados foram o terpineno-4-ol e monoterpeno b-pineno.

Em *R. prolixus*, alguns óleos essenciais apresentam grande potencial de ação como inseticida, afetando sua sobrevivência. O tratamento tópico do óleo essencial da planta *Zanthoxylum tingoassuiba* causa alta mortalidade dos percevejos *Dysdercus peruvianus* e *Oncopeltus fasciatus* e do barbeiro *R. prolixus*, além disso altera a ecdise em *D. peruvianus* e *R. prolixus*.³⁵ O óleo essencial de outra espécie do mesmo gênero, *Zanthoxylum caribaeum* causou mortalidade em *R. prolixus* em três diferentes tipos de aplicação, tópica, oral e contato. Além do efeito de mortalidade esse óleo essencial também causou paralisia e má-formação dos adultos de *R. prolixus*.³⁶ Os óleos essenciais de *A. zerumbet* e *A. vittata* após aplicação tópica na concentração de 125 µg/mL induzem alta mortalidade (73% e 83%, respectivamente) sobre ninfas de quinto estágio de *Rhodnius nasutus*³⁴. Os óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus*

e *Citrus sinensis* apresentaram atividade inseticida sobre ninfas de primeiro estágio e não em ninfas de quinto estágio de *R. prolixus*³⁷.

Em alguns casos os princípios ativos isolados dos óleos essenciais podem exercer um maior efeito biológico do que o óleo essencial, como foi observado por Figueiredo et al (2017)³⁸, nesse estudo os autores observaram que os constituintes carvacrol e timol aplicados isoladamente em *R. prolixus* foram mais eficientes do que o óleo essencial de *Lippia sidoides*. A dose letal 50 em ninfas de *R. prolixus* tratados com o óleo essencial foi de 54,4 mg/cm² enquanto o tratamento com carvacrol e timol apresentaram LC₅₀ de 32,98 e 9,38 mg/cm², respectivamente.

Óleos essenciais apresentam características físicas e químicas diferentes entre si, embora alguns constituintes químicos e atividades biológicas sejam semelhantes³⁵. Tais compostos químicos também apresentam características com efeito subletais importantes no comportamento dos insetos³⁹. Os pesticidas originados de óleos essenciais, apresentam várias vantagens importantes já que devido a sua característica volátil e efeito residual mínimo, os impactos no meio ambiente são menores se comparados com os pesticidas sintéticos comercializados atualmente, uma vez que as populações de insetos predadores, polinizadores e parasitoides são menos afetadas. Outra vantagem dos pesticidas a base de óleo essenciais é a respeito da resistência, que se desenvolve mais lentamente devido às complexas misturas de constituintes que apresentam esses óleos⁴⁰.

Da mesma forma, a continuidade das ações de vigilância entomológica associadas as ações educativas, em paralelo a busca por estratégias de controle, são importantes na prevenção de novos focos de transmissão vetorial da doença de Chagas. Grande parte dos agentes químicos possui ação sobre o sistema nervoso dos insetos. Já os produtos de origem natural, atuam em geral sobre o comportamento dos insetos (repelência, atração, fago-inibição entre outros), e na sua fisiologia, como no sistema neuroendócrino (modulando a produção de hormônios de desenvolvimento), sistema reprodutor entre outros³¹.

No presente trabalho fizemos uma triagem de emulsões e óleos essenciais extraídos de diferentes plantas avaliando os efeitos fisiológicos em triatomíneos infectados e efeito na infecção do parasito no vetor. Adicionalmente, investigamos a presença de triatomíneos e sua infecção em diferentes cidades do estado do Rio de Janeiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos de óleos essenciais na sobrevivência e fisiologia de *Rhodnius prolixus* e no desenvolvimento do parasita *Trypanosoma cruzi* neste vetor invertebrado. Levantar a ocorrência das espécies de triatomíneos no estado do RJ.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar os efeitos da aplicação dos óleos essenciais com potencial inseticida em *Rhodnius prolixus* por aplicação tópica ou de contato;
- Verificar os efeitos da aplicação dos óleos essenciais com potencial de fago-inibição em *Rhodnius prolixus* por aplicação tópica ou de contato;
- Verificar os efeitos da aplicação dos óleos essenciais com potencial de alterar a ecdise de *Rhodnius prolixus* por aplicação tópica ou de contato;
- Verificar os efeitos da aplicação dos óleos essenciais com potencial inibição do desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* em *Rhodnius prolixus* por aplicação tópica ou de contato;
- Realizar o levantamento da presença de triatomíneos em municípios do estado do Rio de Janeiro no período de 2018 a 2021;
- Pesquisar a infecção por *Trypanosoma cruzi* nos triatomíneos coletados e capturados no estado do Rio de Janeiro.

Para facilitar a leitura e compreensão dos dados obtidos, separamos o material e métodos e resultados em duas partes. A parte 1 está relacionada com os ensaios de triagem de óleos essenciais e seus efeitos em *Rhodnius prolixus* e no desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi*. E a parte 2 estão a metodologia e resultados relacionados com as coletas e análises de dados de registro de triatomíneos e infectividade desses vetores no estado do Rio de Janeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS PARTE 1

3.1 Triatomíneos e alimentação

Foram utilizadas ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* provenientes da colônia do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LABFISI) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Essa colônia é mantida em condições controladas de temperatura e umidade (28°C e 60%) e alimentadas periodicamente com sangue desfibrinado de coelho em sistema artificial segundo a descrição de Garcia et al⁴¹. As ninfas foram coletadas randomicamente após a muda e mantidas em jejum por 15 a 20 dias. Após este período, foram alimentadas no mesmo sistema em sangue de coelho citratado por aproximadamente 40 minutos, tempo suficiente para que insetos de quinto estágio façam uma boa alimentação saturante.

O sangue de coelho citratado foi fornecido pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) que segue os princípios de ética sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IOC com número de protocolo L-019/17.

3.2 Obtenção dos produtos naturais

Os óleos essenciais foram extraídos através de hidrodestilação em aparelho de Clevenger. O nome das espécies das plantas utilizadas para obtenção dos diferentes óleos essenciais, bem como os métodos de preparo das emulsões não serão detalhados nesta dissertação para garantir os direitos de registro e de patentes e, portanto, daremos códigos as espécies usadas. Os óleos essenciais LICA, MF2FS e OLA foram fornecidos pela Dra. Ana Claudia Amaral do Laboratório de Produtos Naturais de Farmanguinhos/FIOCRUZ. Os óleos OLA e VMFS2 foram também preparados em emulsão de água pelo laboratório citado acima. Emulsões são definidas como um sistema heterogêneo, termodinamicamente instável, a partir da associação de substâncias lipofílica com hidrofílica, sendo que uma das fases fica descontinuada e dispersa em gotículas, envolta em agentes tensoativos emulsificantes⁴². Os óleos essenciais PILO e NEO foram fornecidos pelo Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais, Departamento de Tecnologia Farmacêutica, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense (UFF) em colaboração com o Prof. Dr. Leandro Machado Rocha.

3.3 Tratamentos dos insetos com os produtos naturais

Aplicação tópica:

Aplicamos 2 μ L de solução de óleos essenciais diluídos em diferentes solventes (DMSO, etanol e acetona) e em diferentes concentrações no dorso dos insetos 30 minutos antes da alimentação. Em seguida os insetos foram colocados para alimentação com sangue contendo ou não parasitos. O grupo controle (C) recebeu 2 μ L de solvente utilizado na diluição dos produtos naturais e o grupo branco (B) não recebeu solvente⁴³. Os óleos essenciais foram primeiramente diluídos 2x ou 5x, 10x, 100x e 1000x com uma pequena variação entre os ensaios, como detalhado na Tabela 1. O peso de cada óleo essencial foi aferido para cálculo da concentração em mg/mL (Tabela 1). Alguns óleos essenciais foram preparados em emulsão e então diluídos como apresentado na Tabela 1. Posteriormente os insetos tratados foram colocados em estufa com temperatura e umidade controlada (28°C e 60%) durante 45 dias. Para avaliação biológica dos insetos aos efeitos dos óleos essenciais, foram considerados parâmetros como: inibição da alimentação, mortalidade, deformação, ecdise e infecção.

Aplicação por contato:

O volume de 1mL de cada concentração de óleo essencial OLA (Tabela. 1) foi aplicado em papel de filtro com tamanho de 176 cm² e então foram colocados para secagem por 30 minutos em local arejado. Esse papel impregnado com óleo essencial foi dobrado e colocado dentro dos frascos de vidro. Ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* após a alimentação e infecção com sangue contendo *T. cruzi*, foram colocadas nesses recipientes de vidro contendo o papel impregnado com o óleo essencial. Os insetos do grupo controle foram colocados em recipientes de vidro contendo papel de filtro embebido com o solvente. Os recipientes foram colocados em estufa em temperatura de 28° e 60% de umidade durante 45 dias para observação e avaliação biológica⁴⁴.

Tabela 1. Diluições e concentrações da solução (mg/mL) dos óleos essenciais e por inseto (µg), dos óleos essenciais ou suas emulsões utilizadas nos ensaios de tratamento das ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Óleo essencial	Peso	Diluições / Concentração da solução (mg/mL) / Concentração por inseto (µg em 2µL)			
		2x	10x	100x	1000x
PILO	100ul=86,3mg	2x	10x	100x	1000x
		431,5	86,3	8,6	0,86
		863,0	172,6	17,3	1,7
NEO	10uL = 9,3mg	2x	10x	100x	1000x
		465	93,0	9,3	0,9
		930,0	186,0	18,6	1,9
LICA	10uL = 11,5mg	5x	10x	100x	1000x
		230,0	115,0	11,5	1,2
		460,0	230,0	23,0	2,3
OCE	10uL = 8,7mg	5x	10x	100x	1000x
		174,0	87,0	8,7	0,9
		348,0	174,0	17,4	1,7
MF2FS	11uL = 42,2mg	5x	10x	100x	1000x
		767,3	383,6	38,4	3,8
		1534,5	467,3	76,7	7,7
OLA	100uL = 89,3mg	5x	10x	100x	1000x
		178,6	89,3	8,9	0,9
		357,2	178,6	17,9	1,8
OLA (emulsão)	50 mg/mL	-	10x	100x	1000x
	Água	50	5	0,5	0,05
		100,0	10,0	1,0	0,1
VMFS2 (emulsão)	50 mg/mL		10x	100x	1000x
	DMSO		5	0,5	0,05
			10,0	1,0	0,1
VMFS2 (emulsão)	50 mg/mL	-	5x	10x	
	Acetone	50	10	5	
		100,0	20,0	10,0	

3.4 Cultivo de *Trypanosoma cruzi* e infecção dos insetos

A cepa de *T. cruzi* Dm28c foi mantida em meio *brain heart infusion* (BHI) em incubadora a 27°C. Para infecção dos insetos, alíquotas dos parasitos foram coletadas de meios de cultivo em fase exponencial de crescimento. Os insetos previamente tratados com óleos essenciais via aplicação tópica ou de contato foram infectados com *T. cruzi* através de alimentação artificial com sangue de coelho citratado e inativado, contendo 1×10^7 epimastigotas/mL de sangue. Os insetos dos grupos-controle e branco foram alimentados com sangue inativado e parasitos, sendo que no grupo-controle os insetos foram tratados com o solvente utilizado para diluir os óleos essenciais.

3.5 Fagoinibição, Mortalidade e Metamorfose

Após tratamento dos insetos com os óleos essenciais e alimentação/ infecção como descrito na seção 3.3, estes foram avaliados quanto ao repasto sanguíneo. A alimentação sanguínea foi oferecida para cada grupo em um período de 30 minutos, tempo suficiente para um repasto saturante. Em seguida, os insetos foram contados e classificados pela distensão abdominal e separados em grupos de alimentação saturante, ou parcial ou nenhuma alimentação. Para os insetos que não se alimentaram ou não fizeram uma alimentação saturante oferecemos a alimentação sanguínea novamente por três tentativas. Contabilizamos os insetos que não se alimentaram, e os insetos com alimentação saturante foram utilizados nos ensaios posteriores.

A mortalidade e fagoinibição dos insetos tratados e infectados descritos acima, foi avaliada uma vez por semana por um período total de 30 a 40 dias. Os insetos foram separados em três frascos para cada tratamento, cada frasco contendo dez insetos. Nesse prazo de 30 a 40 dias foi também avaliada a porcentagem de muda em cada grupo de tratamento, observando-se a presença de insetos com deformações corpóreas. Os dados obtidos foram comparados estatisticamente em teste One Way Anova ou teste T no programa Graphpad Prism.

3.6 Contagem de Infecção de *Trypanosoma cruzi*

A quantificação de parasitos nos insetos tratados com os diferentes óleos essenciais em diferentes dosagens e formas de aplicação foi realizada através da dissecação de intestino médio posterior e intestino posterior após 30 a 45 dias de infecção. Esses compartimentos foram dissecados e homogeneizados em 200µL de tampão fosfato salina (PBS) e então contados em

câmara de Neubauer utilizando microscópios ópticos de contraste de fase. Os dados obtidos foram comparados estatisticamente no programa Graphpad Prism. Primeiramente foram feitos testes de normalidade e em seguida, os testes One Way Anova com pós teste Kruskal Wallis (não paramétrico).

4. RESULTADOS PARTE 1

4.1 Mortalidade

De acordo com as análises os diferentes solventes, acetona, etanol, DMSO e PBS, não tiveram efeito na mortalidade de insetos infectados com *T. cruzi* quando comparados aos insetos do grupo sem solvente, branco (Fig. 4).

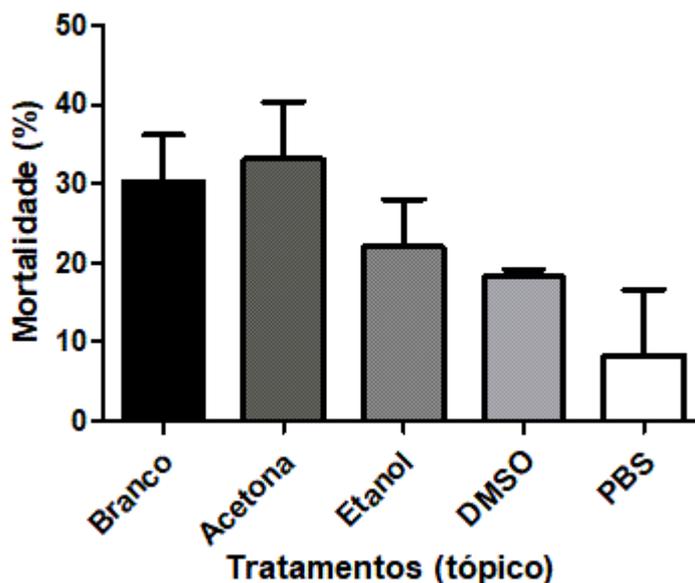


Figura 4. Porcentagem de mortalidade de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com diferentes solventes. Insetos analisados entre o período de aplicação dos solventes até 40 dias após a infecção. Média de porcentagem de mortalidade de 4 experimentos, cada experimento com N de 10 a 20 insetos. One Way ANOVA ($ns = p > 0,05$).

Na figura 5 observa-se a porcentagem de mortalidade de insetos infectados e tratados por aplicação tópica com os diferentes óleos essenciais e emulsões. De acordo com esses resultados pode-se observar que alguns óleos essenciais como NEO, LICA, OLA, MF2FS e VMFS2 (em emulsão) tem um efeito de mortalidade acima de 40 % e maior do que os grupos controle (diferentes solventes – acetona, etanol, DMSO e PBS) e branco (sem solvente).

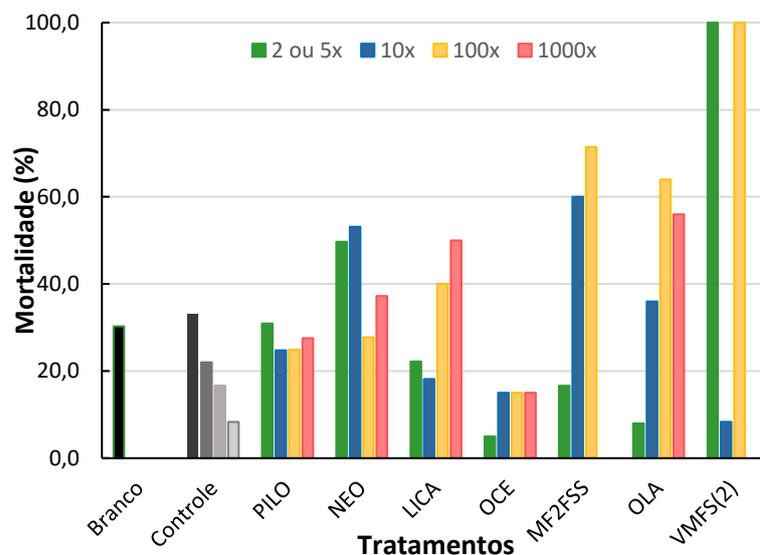


Figura 5. Porcentagem de mortalidade de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com diferentes óleos essenciais. Controle: acetona, etanol, DMSO e PBS. Insetos analisados entre o período de aplicação dos solventes até 40 dias após. Porcentagem de mortalidade em cada experimento, com N de 10 a 20 insetos. Para alguns tratamentos não foi possível realizar mais do que um ensaio de mortalidade.

Com os óleos essenciais de PILO e NEO, foi possível repetir os ensaios 4 vezes com PILO e 5 vezes com NEO, podendo assim analisá-los como mais critério. Na figura 6 pode-se observar que o óleo essencial de PILO não tem efeito de mortalidade nos insetos infectados com *T. cruzi* tratados por aplicação tópica.

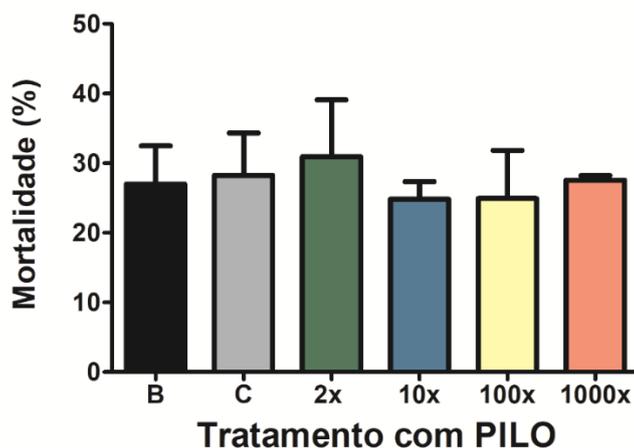


Figura 6. Porcentagem de mortalidade de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com óleo essencial PILO. B: branco; C: acetona; 2x; 10x; 100x; 1000x: diluições. Insetos analisados entre o período de aplicação dos solventes até 40 dias após. Média da porcentagem de mortalidade de 4 experimentos, com N de 20 a 30 insetos. One Way ANOVA ($ns = p > 0,05$).

O tratamento de *R. prolixus* infectados com o óleo essencial NEO por aplicação tópica resultou em diferença estatística na diluição de 2x em etanol em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$ Fig. 7). Nessa diluição o óleo essencial NEO foi aplicado a uma concentração final de 930 μg por inseto e teve média de porcentagem de mortalidade de 58,48%. Já o grupo de insetos controle tratados com etanol obtiveram mortalidade média de 28,23% (Fig. 7).

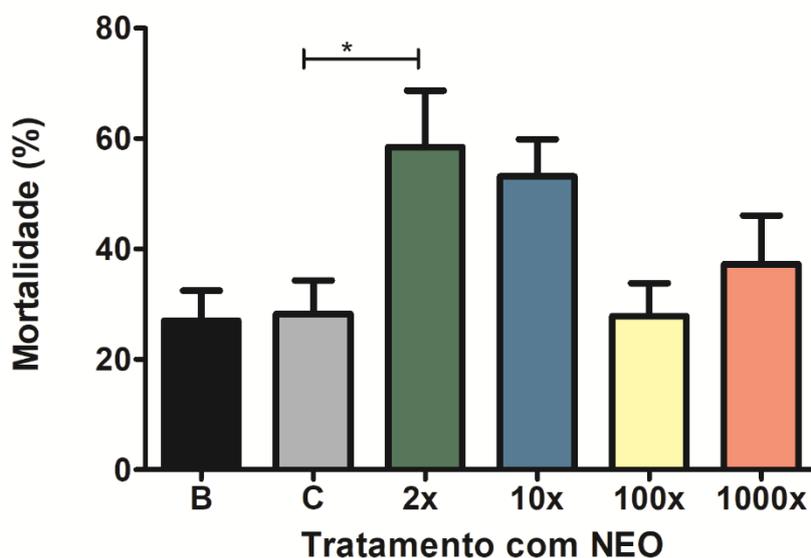


Figura 7. Porcentagem de mortalidade de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com óleo essencial NEO. B: branco; C: etanol; 2x; 10x; 100x; 1000x: diluições. Insetos analisados entre o período de aplicação dos solventes até 40 dias após. Média da porcentagem de mortalidade de 6 experimentos, com N de 20 a 30 insetos. One Way ANOVA (* $p < 0,05$).

O tratamento com os óleos essenciais LICA, MF2FS, OLA, OCE e VMFS2 (em emulsão) descritos na tabela a seguir não foi possível repetir mais de uma vez e, portanto, não foi possível fazer análise estatística. Na tabela 2 estão descritos os resultados de porcentagem de mortalidade de 1 experimento com cada óleo essencial contendo 20 a 30 insetos para cada diluição.

Tabela 2. Porcentagem de mortalidade de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica de diferentes óleos essenciais.

Tratamentos	Solvente	Diluições / Mortalidade (%)			
Branco	-	30,3			
Controle	Acetona	33,2			
	Etanol	22,0			
	DMSO	16,7			
LICA	Acetona	5x	10x	100x	1000x
		22,2	18,2	40,0	50,0
OCE	Etanol	5x	10x	100x	1000x
		5,0	15,0	15,0	15,0
MF2FS	Acetona	5x	10x	100x	1000x
		16,7	60,0	71,4	0,0
OLA	Etanol	5x	10x	100x	1000x
		8,0	36,0	64,0	56,0
VMFS2 (emulsão)	DMSO	-	10x	100x	1000x
			0	16,7	8,3
VMFS2 (emulsão)	Acetona	Bruto	5x	10x	-
		100	8,3	100	

De acordo com os resultados preliminares podemos observar que o óleo de LICA teve porcentagem de mortalidade maiores que o grupo branco e controle nas diluições de 100 (40%) e 1000x (50%), ou seja nas menores concentrações (Tab. 2). Porém como não foi possível repetir o teste com esse óleo não podemos dizer se isso foi um erro experimental ou se realmente as menores doses causam maior mortalidade. O óleo essencial MF2FS também apresentou maior mortalidade nas diluições de 10x (60%) e 100x (71,4%) apesar de na maior concentração (5x) ter resultado em uma mortalidade de 16,7%. O óleo essencial OCE teve mortalidade menor que as do grupo branco e controle. O tratamento tópico dos insetos com OLA também resultou em mortalidade de 64 e 56% nas maiores diluições de 100 e 1000x, respectivamente. E a emulsão VMFS2 diluída em acetona causou mortalidade de 100% na concentração sem diluir (50mg/mL) e na de 10x diluída. Porém essa emulsão diluída em DMSO não causou mortalidades acima dos grupos branco e controle.

4.2 Fagoinibição

Observamos que o tratamento dos insetos com alguns óleos essenciais causou alteração no repleto repasto sanguíneo e optamos por quantificar a porcentagem de inibição da alimentação. Os óleos essenciais que demonstraram esse efeito foram MF2FS, OLA e VMFS2 (em emulsão). Na tabela a seguir estão representados os dados de porcentagem de insetos que não se alimentaram após tratamento por aplicação tópica dos óleos essenciais.

Tabela 3. Porcentagem de *Rhodnius prolixus* que não se alimentaram após tratamento de ninfas de quinto estágio com óleos essenciais.

Tratamento	Solvente	Branco	Controle	Fagoinibição (%) Diluições			
				5x	10x	100x	1000x
MF2FS	Acetona		73	50	60	50	100
OLA	Etanol	0	0	44	40	20	4
VMFS2				-	10x	100x	1000x
	DMSO		0	-	25	25	0
VMFS2				Bruto	5x	10x	-
	Acetona		20	75	33,3	100	-

MF2FS diluído em acetona causou alto efeito de inibição da alimentação em todas as diluições aplicadas topicamente nas ninfas de *R. prolixus*. Porém nesse ensaio o grupo controle tratado com o solvente acetona, também teve alta fagoinibição, 73% (Tab. 3). Já o óleo essencial OLA apresenta taxa de fagoinibição de 44 e 40% dos insetos tratados nas diluições de 5 e 10x. Na aplicação da emulsão VMFS2 diluída em DMSO observamos fagoinibição de 25% em ambas as diluições de 10 e 100x (Tab. 3). Essa mesma emulsão diluída em acetona apresentou porcentagens de inibição da alimentação maiores do que na outra diluição, sendo 75% sem diluir (50mg/mL) e 100% na diluição de 10x. O tratamento tópico de ninfas com óleos essenciais de OLA e VMFS2 (em emulsão) causaram inibição da alimentação sanguínea. A maior inibição observada foi com MF2FS em emulsão diluído em acetona (75 a 100%), seguido do óleo essencial OLA diluído em etanol (40 – 44%).

4.3 Metamorfose

Neste estudo avaliamos também os efeitos dos diferentes solventes na ecdise dos insetos tratado. Podemos observar no gráfico da figura 8 que, os diferentes solventes não tiveram efeito na ecdise dos insetos tratados. Outro efeito fisiológico em que muitos óleos essenciais possuem ação é na diminuição da taxa de ecdise dos insetos ou outros efeitos de má formação de adulto. Na figura 9 podemos observar que a maioria dos óleos essenciais não altera a taxa de ecdise em comparação com o grupo branco e controle. Porém o óleo essencial MF2FS e OLA via tópica resultaram em porcentagens de ecdise menores que em 40 % dos insetos (Fig. 9).

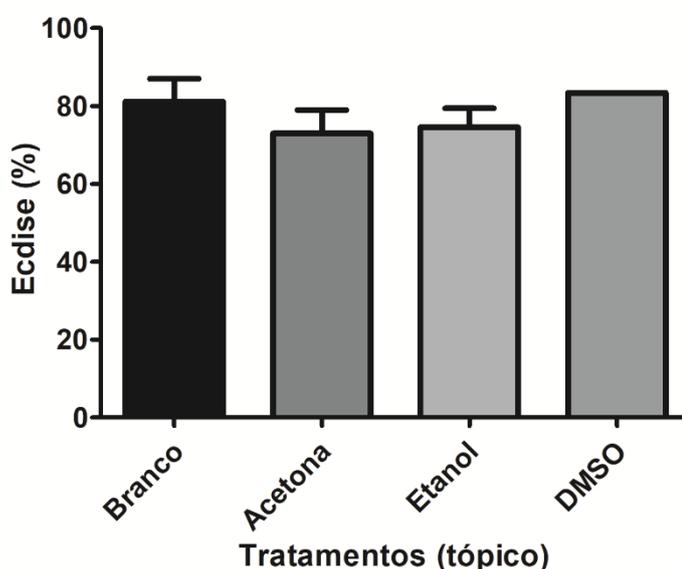


Figura 8. Porcentagem de metamorfose de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com diferentes solventes. Insetos analisados entre o período de aplicação dos solventes até 40 dias após. Média de porcentagem de ecdise de 4 experimentos, cada experimento com N de 10 a 20 insetos. One Way ANOVA (ns = $p > 0,05$)

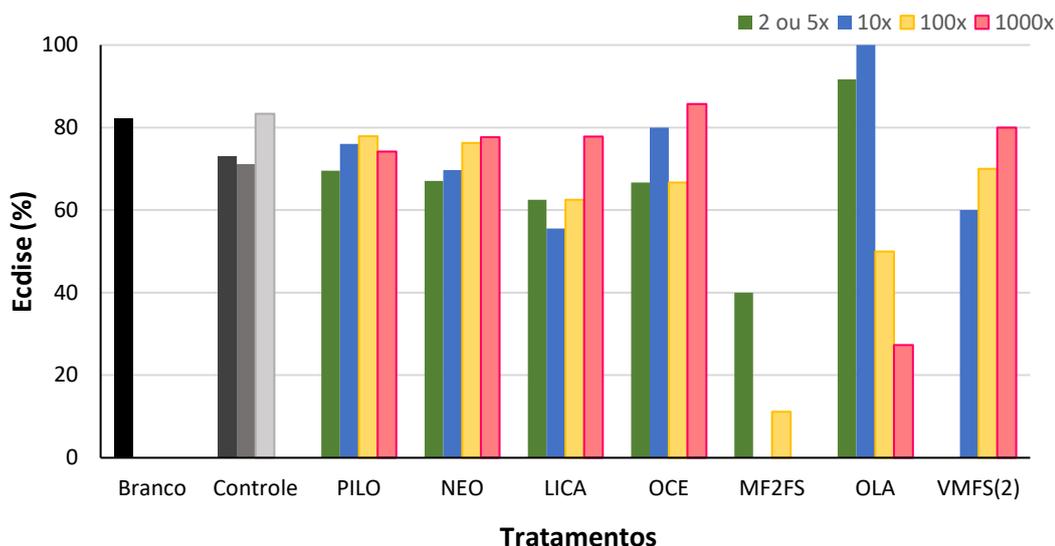


Figura 9. Porcentagem de metamorfose de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com diferentes óleos essenciais. Controle: acetona, etanol e DMSO. Insetos analisados entre o período de aplicação dos solventes até 40 dias após. Porcentagem de ecdise em cada experimento, com N de 10 a 20 insetos. Para alguns tratamentos não foi possível realizar mais do que um ensaio experimental.

Os óleos essenciais de PILO e NEO não alteraram a porcentagem de ecdise dos insetos infectados e tratados topicamente em todas as diluições utilizadas quando comparados com os grupos branco (B) e controle (C) tratados com o solvente etanol (Fig. 10).

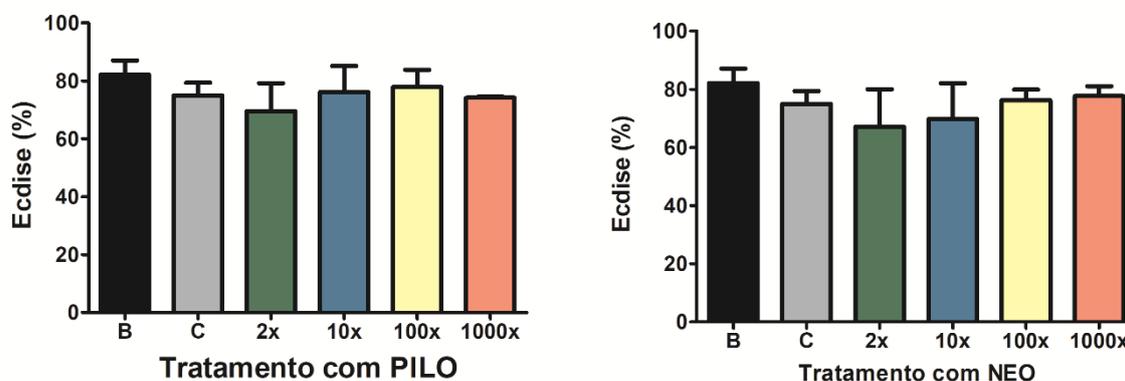


Figura 10. Porcentagem de metamorfose de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com óleo essencial de PILO e NEO. B: branco; C: acetona para PILO ou etanol para NEO; 2x; 10x; 100x; 1000x: diluições. Insetos analisados entre o período de aplicação dos solventes até 40 dias após. Média da porcentagem de ecdise de 6 experimentos, com N de 20 a 30 insetos. One Way ANOVA (ns $p > 0,05$).

Os demais resultados de óleos essenciais que não puderam ser ensaiados mais de uma vez estão dispostos na tabela 4. Destacam-se os óleos essenciais de MF2FS e OLA por aplicação tópica que demonstraram diminuição na porcentagem de ecdise dos insetos tratados. Com MF2FS as porcentagens de ecdise foram de 40, 0, 11 e 0% de ecdise dos insetos tratados nas diluições 5x, 10x, 100x e 1000x, respectivamente (Tab. 4). Apesar de não podermos fazer as análises estatísticas para esse óleo essencial podemos indicar como potencial para futuros ensaios. O óleo essencial OLA demonstrou alteração nas taxas de ecdise em comparação com os grupos branco e controle apenas nas diluições de 100 (50%) e 1000x (27,3%) e para comprovar esses efeitos novos ensaios deverão ser realizados. Não foi possível avaliar a porcentagem de ecdise para o tratamento com emulsão de VMFS2 em acetona, já que nesse grupo vários insetos morreram devido ao tratamento (Tab. 2).

Tabela 4. Porcentagem de metamorfose de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* após tratamento tópico com óleos essenciais.

Tratamentos	Solvente	Diluições / Ecdise (%)			
Branco	-	82,1			
Controle	Acetona	72,9			
	Etanol	71,1			
	DMSO	83,3			
LICA	Acetona	5x	10x	100x	1000x
		62,5	55,5	62,5	77,7
MF2FS	Acetona	5x	10x	100x	1000x
		40,0	0,0	11,1	0,0
OCE	Etanol	5x	10x	100x	1000x
		66,7	80,0	66,7	85,7
OLA	Etanol	5x	10x	100x	1000x
		91,7	100,0	50,0	27,3
VMFS2	-	10x	100x	1000x	
(emulsão)	DMSO		60,0	70,0	80,0
VMFS2*		Bruto	5x	10x	-
(emulsão)	acetona				

* no ensaio com VMFS2 tivemos pouca quantidade de insetos para analisar a taxa de ecdise devido a alta mortalidade observada antes.

Outra observação importante sobre a fisiologia de insetos tratados com diferentes produtos é a ocorrência de má formação de adultos. Nesse caso o inseto consegue fazer a ecdise, porém o adulto formado apresenta problemas de formação que impedem sua locomoção, voo ou reprodução. Nesse caso, apenas o óleo essencial OLA via aplicação tópica na diluição de 1000x apresentou uma taxa alta de má formação de adultos, 45,5%, em contraste com o grupo branco de 3,1% e os grupos controle com 0 e 13% de má formação (Tab. 5). Portanto, seria interessante analisar novamente esse óleo essencial com mais repetições para confirmar ou não o resultado observado aqui. A deformação dos insetos tratados com OLA em doses baixas, mas não em altas provavelmente foi causada devido à diluição do óleo essencial, que uma vez não matando o inseto, provocou a má formação (Tab. 5).

Tabela 5. Porcentagem de má formação de adultos de *Rhodnius prolixus* após tratamento de ninfas de quinto estágio com óleos essenciais (tratamento tópico).

Tratamentos	Solvente	Diluições / Ecdise (%)			
Branco	-	3,1			
Controle	Acetona	12,2			
	Etanol	0,0			
	DMSO	0,0			
PILO	Etanol	2x	10x	100x	1000x
		5,2	2,8	3,8	3,3
NEO	Etanol	2x	10x	100x	1000x
		2,6	2,8	4,7	1,4
LICA	Acetona	5x	10x	100x	1000x
		0,0	11,1	12,5	0,0
MF2FS	Acetona	5x	10x	100x	1000x
		0,0	0,0	0,0	0,0
OCE	Etanol	5x	10x	100x	1000x
		0,0	0,0	0,0	0,0
OLA	Etanol	5x	10x	100x	1000x
		0,0	0,0	16,7	45,5
VMFS2 (emulsão)	DMSO	-	10x	100x	1000x
			0,0	0,0	0,0

Na Tabela 6 colocamos os dados de efeitos fisiológicos do tratamento de ninfas de *R. prolixus* por contato de superfície impregnada com o óleo essencial OLA na forma bruta (50mg/mL), e diluição 10x, 100x e 1000x. Podemos observar na tabela 6, que o óleo essencial OLA causou mortalidade acima de 60%, sendo necessário repetir os testes para confirmação dos resultados (Tab. 6). Em relação à má formação de adultos e ecdise, o óleo essencial OLA, via contato, não acarretou a ocorrência de má formação e também não diminuiu a taxa de ecdise, ambos em comparação com o grupo controle. Como observamos alta taxa de mortalidade nesse tratamento, não foi possível realizar a contagem de parasitemia devido à baixa quantidade de insetos restantes ao longo da infecção por *T. cruzi*.

Tabela 6. Efeitos fisiológicos de ninfas de quinto estágio de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* após tratamento por contato com o óleo essencial OLA em emulsão e diluído em água.

Efeitos	Tratamentos		Diluições		
	Branco	Bruto	10x	100x	1000x
Mortalidade (%)	30,3	70,0	62,5	60,0	60,0
Ecdise (%)	82,1	75,0	75,0	100,0	57,0
Má formação (%)	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Infecção					

4.4 Infecção

Em relação à quantidade de parasitos que se desenvolveram após tratamento com os diferentes óleos essenciais em *R. prolixus*, os resultados diferiram quanto ao solvente testado. Inicialmente diluímos os óleos essenciais de NEO e PILO em acetona, mas em resultados preliminares parecia que o solvente acetona diminuía o número de parasitos nos insetos, não sendo um bom solvente para diluição. Portanto, passamos a diluir os óleos essenciais em etanol e fizemos várias repetições do ensaio dessa maneira. Porém ao final dos ensaios, tabulação dos dados e cálculo das diferenças estatísticas detectamos diminuição significativa de parasitos em insetos do grupo controle tratados com etanol ($p=0,0085$); (Fig. 11A, 11B e Fig. 12). As diferentes diluições de NEO e PILO em etanol não diferiram significativamente em relação à quantidade média de parasitos por inseto com o grupo controle tratado com etanol (Fig. 11).

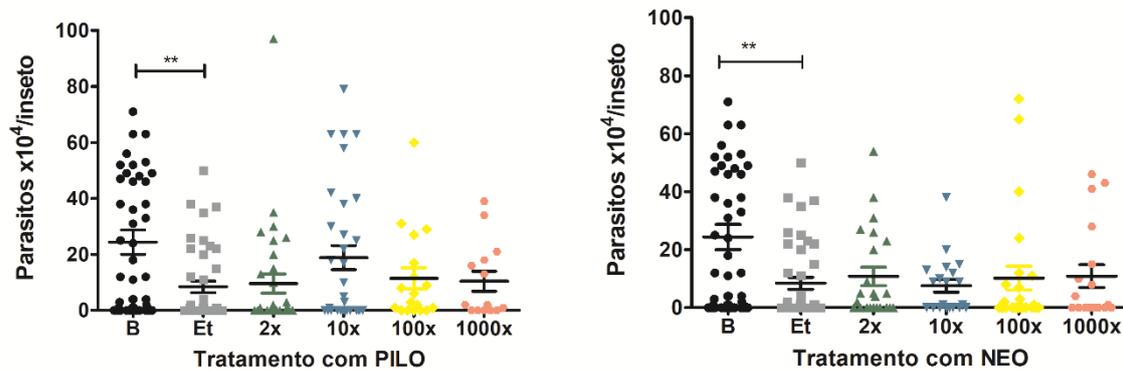


Figura 11. Quantidade de parasitos em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com óleo essencial de PILO e NEO diluído em etanol. Intestino médio posterior e intestino posterior de insetos analisados entre o período de 30 a 40 dias após tratamento e infecção. Média de número de contagem de parasitos de 6 experimentos, com N de 20 a 30 insetos. One Way ANOVA e Teste T Student (Mann-Whitney test) (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Na figura 12 podemos observar uma diminuição significativa de número médio de *T. cruzi* ($8,42 \times 10^4$) no intestino de *R. prolixus* tratados topicamente com $2 \mu\text{L}$ do solvente etanol ($p = 0,0085$) em comparação com o grupo branco sem tratamento ($24,38 \times 10^4$). Apesar do grupo de insetos tratados com o solvente acetona também ter diminuído o número médio de parasitos por inseto ($13,90 \times 10^4$) não detectamos diferença significativa em relação ao grupo branco. O grupo tratado com o solvente DMSO também não teve diferença significativa em relação ao grupo branco mas, tivemos um número baixo de insetos. Além disso, resultados não publicados de nosso laboratório indicaram efeito do solvente DMSO no desenvolvimento de parasitos no inseto. Portanto, seria importantíssimo um estudo mais detalhado sobre os efeitos dos diferentes solventes no desenvolvimento de *T. cruzi* em *R. prolixus*.

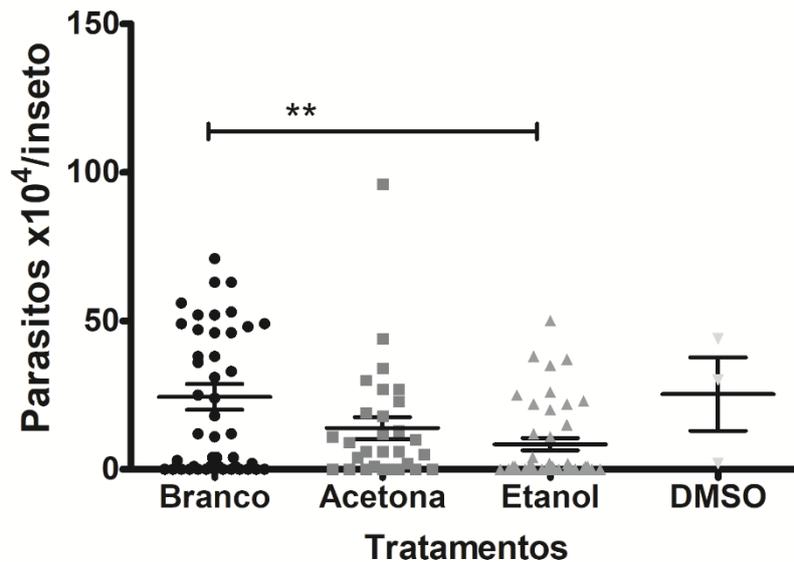


Figura 12. Quantidade de parasitos em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com diferentes solventes. Intestino médio posterior e intestino posterior de insetos analisados entre o período de 30 a 40 dias após tratamento e infecção. Média de número de contagem de parasitos de 4 experimentos, cada experimento com N de 10 a 20 insetos. Teste T Student (Mann-Whitney test) (** $p < 0,01$).

Nos ensaios com os óleos essenciais PILO e NEO diluídos em acetona, apesar de não termos feito tantas repetições experimentais, foi possível detectar o efeito sobre o desenvolvimento dos parasitos no vetor tratados com o óleo essencial NEO (Fig. 13). Todas as diluições testadas de NEO, de 2 a 1000x, que correspondem a 863 μg a 1,7 μg de óleo diluído aplicado topicamente por inseto, ocasionaram na diminuição significativa da quantidade de parasitos no intestino dos insetos tratados. No grupo branco, sem tratamento, o número médio de parasitos por inseto é de $24,4 \times 10^4$ por inseto. Já nos grupos tratados com NEO diluído em acetona as quantidades de parasitos foram de 3,4, 4,3, 2,6 e 1,9 $\times 10^4$ por inseto nas diluições de 2x, 10x, 100x e 1000x, respectivamente ($p < 0,05$; Fig. 13).

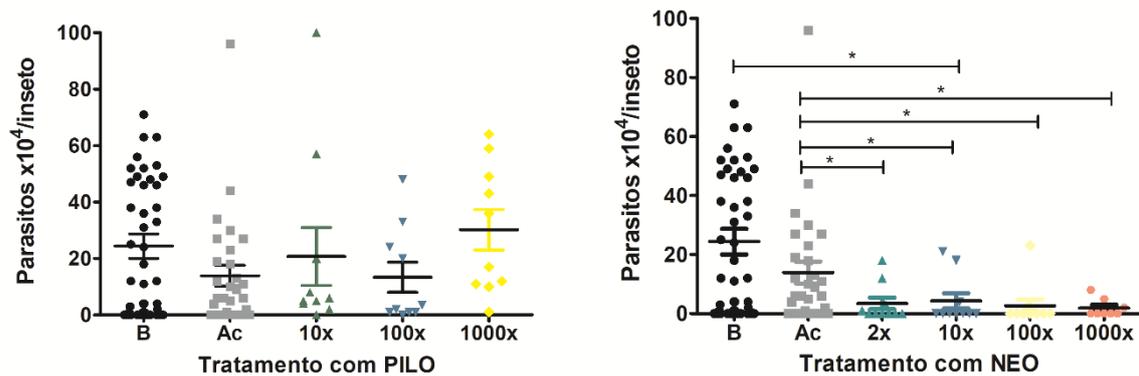


Figura 13. Quantidade de parasitos em *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com óleo essencial de PILO e NEO diluídos em acetona. B: branco; C: acetona; 2x; 10x; 100x; 1000x: diluições. Intestino médio posterior e intestino posterior de insetos analisados entre o período de 30 a 40 dias após tratamento e infecção. Média de número de contagem de parasitos de 2 experimentos com N de 10 a 30 insetos. One Way ANOVA e Teste T Student (Mann-Whitney test) (* $p < 0,05$).

Nos tratamentos com os óleos essenciais LICA, OLA e VMFS2 (em emulsão) não foi possível fazer mais de uma repetição experimental, mas analisamos preliminarmente os dados de número de parasitos na quantidade de insetos testados em cada experimento (Fig. 14). Em algumas concentrações o N de insetos foi de 3 devido a mortalidade ocorrida inicialmente no ensaio. Portanto, os resultados aqui discutidos são um indicativo de potencial de ação e devem ser repetidos. Nesse caso, podemos observar que o tratamento com os óleos essenciais LICA na diluição de 1000x em acetona ($0,83 \times 10^4$ parasitos/inseto) e OLA na diluição de 5x em etanol ($0,30 \times 10^4$ parasitos/inseto) diminui o número de parasitos por insetos em comparação com o grupo controle e tratados apenas com os solventes, acetona ($13,9 \times 10^4$ parasitos/inseto) e etanol ($8,43 \times 10^4$ parasitos/inseto) (Fig. 14).

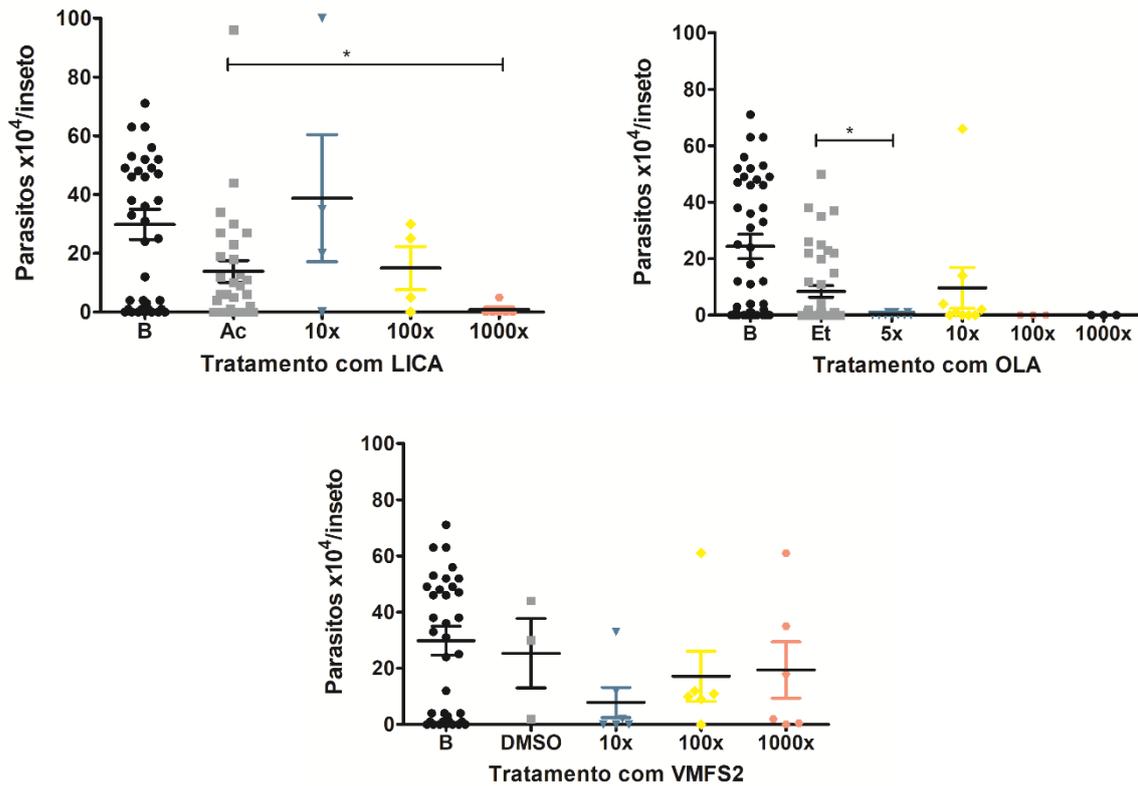


Figura 14. Quantidade de *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados por aplicação tópica com óleo essencial de LICA, OLA e VMFS2 (em emulsão). B: branco; Ac: acetona; Et: etanol; DMSO; 5x; 10x; 100x; 1000x: diluições.: dimetilsulfóxido. Intestino médio posterior e intestino posterior de insetos analisados entre o período de 30 a 40 dias após tratamento e infecção. Média de número de contagem de parasitos de 1 a 2 experimentos com N de 3 a 30 insetos. Teste T Student (Mann-Whitney test) (* $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO PARTE 1

A triagem de diferentes óleos essenciais e emulsões com atividade sobre a fisiologia do triatomíneo e na infecção pelo *T. cruzi* realizados nesse estudo foi capaz de identificar óleos essenciais com potencial ação de diminuição da sobrevivência, ecdise, alimentação sanguínea e infecção de *Trypanosoma cruzi* em *Rhodnius prolixus*.

Em relação à atividade na mortalidade em *R. prolixus* infectados com o parasito, destacamos o efeito do óleo essencial NEO diluído em etanol na concentração de 930 µg/inseto (2µL de 465mg/mL) que causou mortalidade acima de 50%. Outros óleos essenciais como LICA, MF2FS e OLA e as preparações em emulsão de VMFS2 e OLA também apresentaram porcentagens altas de mortalidade após tratamento, porém não foi possível comprovar esses resultados estatisticamente. Cabe destacar que VMFS2 (em emulsão) causou mortalidade em poucas horas após a aplicação tópica nos insetos infectados. Indicamos estes óleos citados acima com potencial para resultados positivos em futuros testes para controle desses vetores.

Em *Rhodnius*, alguns óleos essenciais apresentaram ação sobre a sobrevivência também de ninfas de quinto estágio por aplicação tópica como de *Alpinia zerumbet* (125 µg/mL), *Alpinia vittata* (125 µg/mL)³⁵, *Zanthoaxylum caribaeum* (bruto)³⁶ e *Pilocarpus spicatus* (1 e 0,5 µL/inseto)⁴⁵. As mortalidades encontradas com a aplicação tópica desses óleos essenciais foram de 73,3 e 83,3 para *A. zerumbet* e *A. vittata*, de 91,1 e 90,5 % para *P. sipicatus* e de 80 a 98% para *Z. caribaeum*. Apesar das taxas de mortalidade desses óleos essenciais serem altas podemos notar que foram testadas com o óleo essencial bruto sem diluição com exceção do óleo essencial das plantas do gênero *Alpinia* que foram testadas na diluição de 125 µg/mL utilizando o solvente DMSO³⁵.

Além de efeito na sobrevivência, observamos outros efeitos em ninfas de *R. prolixus*. O tratamento de ninfas topicamente com óleos essenciais de OLA e VMFS2 (em emulsão) causaram inibição da alimentação sanguínea. A maior inibição observada foi com MF2FS em emulsão diluído em acetona (75 a 100%), seguido do óleo essencial OLA diluído em etanol (40 – 44%). Os óleos essenciais da planta do gênero de *Alpinia* também apresentaram ação de fago-inibição por aplicação tópica em ninfas de quinto estágio de *R. nasutus*³⁴. Já o tratamento de ninfas de *R. prolixus* com o óleo essencial de *P. spicatus* via alimentação sanguínea ocasionou fago-inibição, porém, nesse caso o óleo essencial foi administrado diretamente no repasto sanguíneo⁴⁵.

Os óleos essenciais de OLA e MF2FS diminuíram a taxa de ecdise dos insetos, sendo MF2FS a maior diminuição na proporção de muda, com 40, 0, 11 e 10% de ecdise nas diluições 5x, 10x, 100x e 1000x, respectivamente. Já a taxa de ecdise de ninfas de *R. prolixus* dos grupos

branco e controle são maiores que 70%. O óleo essencial OLA diminuiu a taxa de ecdise para 50 e 27,3 % nas diluições 100 e 1000x e induziram alta taxa de adultos malformados (45,5%).

No estudo realizado por Tietbohl⁴⁶ (2019) com óleo puro de *Myrciaria floribunda* no desenvolvimento de *Rhodnius prolixus*, resultados semelhantes na ecdise dos insetos, onde nas diluições 500, 250 e 125 mg/mL induziram 0,5%, 0,5% e 1,1% respectivamente, dos insetos atingiram a fase adulta normal, resultando em 1,7% e 2,1% ($p > 0,05$) de mortalidade. Estes são conhecidos como inseticidas reguladores de crescimento (IGRs) e são amplamente utilizados no controle de insetos pragas agrícolas. Em *R. prolixus*, extrato de *Azadirachta indica* e seu princípio ativo azadiractina inibem a ecdise dos insetos. Azadiractina nas doses 1,0, 0,1 e 0,01 µg/mL reduziu a taxa de ecdise de ninfas de *R. prolixus* para 0, 0 e 15% respectivamente⁴⁷.

Os resultados demonstram que alguns óleos essenciais testados no presente estudo podem contribuir para a diminuição da taxa de transmissão do *T. cruzi*. Os óleos essenciais NEO e LICA diluídos em acetona e OLA em etanol diminuem a quantidade de parasitos infectando os insetos quando tratados topicamente. Esse efeito encontrado no nosso estudo é evidenciado nos estudos de Gonzales 1992, onde reduziu a quantidade de parasitos encontrados nas fezes do inseto, não pelo efeito do óleo no parasito, e sim pelo efeito do óleo na membrana perimicrovilar do inseto, fazendo com que o parasito não tenha sucesso na fixação no trato digestivo do hospedeiro invertebrado Gonzales⁴⁸ (1992). O óleo essencial de NEO apresentou resultado significativamente diferente do grupo controle (acetona), com média de parasitos por inseto abaixo de $4,3 \times 10^4$ em todas as diluições testadas. No grupo controle, o número de flagelados infectando os insetos foi em média de $13,9 \times 10^4$ parasitos/inseto. Importante destacar aqui o efeito também dos solventes no desenvolvimento dos parasitos, no qual o tratamento dos insetos com o solvente etanol reduziu a quantidade de parasitos para $8,4 \times 10^4$ enquanto no grupo branco sem tratamento de solventes a quantidade média de parasitos é de $24,4 \times 10^4$ parasitos por inseto. O efeito de produtos naturais no desenvolvimento de *T. cruzi* em *R. prolixus* foi também observado com os compostos azadiractina, extraído da planta *A. indica*⁴⁹ e fisalina, extraído da *Physalis angulata*⁴³.

6. MATERIAL E MÉTODOS PARTE 2

6.1 Coleta de triatomíneos

As coletas dos triatomíneos foram realizadas através da busca ativa ou passiva, foram escolhidos os locais com notificação da presença de triatomíneos na Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro. A busca ativa consistiu na investigação de vestígios da presença do inseto no domicílio ou peridomicílio, como fezes nas paredes, ovos eclodidos e exúvias, que podem confirmar a presença desses insetos no local. A busca passiva realizou-se através da utilização de armadilhas do tipo Noireau (Noireau 1999) com isca viva para atração do inseto afim de fazer o repasto sanguíneo. A captura com armadilha com isca animal ou Noireau, consistiu na utilização de um pote plástico, com uma tampa com tela de arame, envolto por uma fita adesiva dupla face, e no interior um pinto de uma semana de vida que servia de atrativo para os triatomíneos¹³(SISBIO 43394-1/2014).



Figura 15. Armadilha tipo Noireau.

Os triatomíneos capturados foram acondicionados em recipientes próprios de plástico, com papel comum sanfonado e forro na base e enviados para o Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE). O objetivo desse procedimento foi aumentar a sobrevivência dos insetos, garantindo a qualidade das análises de infectividade para *T. cruzi*.

6.2 Identificação taxonômica de triatomíneos coletados

A identificação taxonômica das espécies e dimorfismo sexual dos triatomíneos coletados nos municípios, foi realizado seguindo a chave dicotômicas dos autores Galvão¹⁴ (2014).

6.3 Diagnóstico de infecção por *T. cruzi*

O diagnóstico da infecção dos triatomíneos coletados nas visitas de campo foi realizado em colaboração com a Dra. Thaiane Verly e Dra. Constança Britto do LABIMDOE. Após a dissecação do intestino médio e ampola retal, as amostras de insetos de campo foram submetidas à separação de DNA por coluna de sílica. A análise de infectividade natural foi baseada na amplificação do material genético de *T. cruzi* e do triatomíneo, em formato duplex, pela PCR convencional, seguindo as Boas Práticas Laboratoriais para evitar contaminações. Foram utilizados controles negativos como amostra de inseto da colônia do LABFISI e não infectado por *T. cruzi* além de tubos com todos os reagentes, mas sem o DNA e outro contendo apenas água estéril⁴⁴.

6.4 Levantamento de registros de triatomíneos do estado do Rio de Janeiro

O levantamento dos dados de triatomíneos foi realizado a partir das informações dos registros da Gerência de Pesquisa em Antropozoonoses do Laboratório Central de Saúde Pública, (GPA/LACEN-RJ) da secretaria de estado de saúde do Rio de Janeiro (SES/RJ), repassadas em colaboração com a gerência técnica na pessoa do gerente José Luís da Silva. Além dos dados da GPA/LACEN-RJ, analisamos também os dados de registros de triatomíneos de um projeto de pesquisa chefiado pela Dra. Jacenir Mallet do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera (LIVEDIH) do IOC. Os dados registrados e analisados no presente projeto do LIVEDIH são do período de 2008 a 2021.

O estado do Rio de Janeiro fica localizado na região sudeste do Brasil, tendo uma área total de 43.750,426km², população estimada para 2021 de 17.463.349 pessoas, possui 92 municípios (IBGE, 2021)⁵⁰. Os seguintes municípios comunicaram a presença de triatomíneos, conforme demonstrado abaixo.

Cantagalo- Município da mesorregião centro fluminense do estado RJ, faz parte da mesorregião Centro-Norte Fluminense. De acordo com a estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população estimada em 2021, era de 20.163 habitantes, sua extensão territorial é de 747,210 Km², bioma mata atlântica (IBGE, 2021).

Itaperuna- Município da mesorregião do noroeste Fluminense no estado do RJ, sua população estimada em 2021, era de 104.354 habitantes, sua extensão territorial total é de 1.106,694 Km², distante 300Km da capital. (IBGE, 2021).

Mangaratiba- localizada na mesorregião metropolitana do estado, região da costa verde, sua população estimada em 2021 é de 45.941 habitantes, conforme estimativa do, sua

extensão territorial é de 367.606 km², bioma mata atlântica, 85Km distante da capital (IBGE, 2021).

Paraty- localiza-se no litoral sul fluminense, região da costa verde, sua população estimada em 2021, era de 44.175 habitantes, sua extensão territorial é de 924,296 Km², distante 258 Km da capital, bioma mata atlântica (IBGE 2021).

Petrópolis- Município da região Serrana do estado do RJ, sua população estimada para o ano de 2021, era de 307.144 habitantes, sua extensão territorial é de 791,144 Km², bioma Mata Atlântica (IBGE, 2021).

Porciúncula- Município da mesorregião Noroeste Fluminense, sua população estimada para o ano de 2021, era de 19.068 habitantes, sua extensão territorial é de 291,847 Km², distante da capital 673 Km da capital do estado do RJ, bioma mata atlântica (IBGE, 2021).

São Fidélis- município da região norte do estado, sua população estimada para o ano de 2021, era de 38.749 habitantes, de acordo com o IBGE, sua área é de 1034,833 Km², bioma Mata Atlântica (IBGE, 2021).

Santa Maria Madalena- Município da mesorregião centro fluminense, população estimada para o ano de 2021, era de 10.380 habitantes, bioma Mata Atlântica (IBGE, 2021).

Trajano de Moraes- município da mesorregião centro fluminense, sua população estimada para o ano de 2021, era de 10.653 habitantes, sua extensão territorial é de 591, 151 Km², bioma mata atlântica. Os dados referentes às cidades foram obtidos no site do (IBGE, 2021)⁵⁰.

Os mapas com os dados de notificações sobre a ocorrência de triatomíneos foram construídos utilizando o programa QGIS versão 3.16 e EXCEL 2019.

7. RESULTADOS PARTE 2

7.1 Coleta de triatomíneos no estado do Rio de Janeiro

Paralelamente aos ensaios de efeitos dos óleos essenciais na fisiologia e no desenvolvimento de *T. cruzi* em *R. prolixus*, fizemos uma pesquisa entomológica em alguns municípios do estado do Rio de Janeiro e analisamos os dados de registro de notificações de triatomíneos na Secretaria de Estado de Saúde (SES) do Rio de Janeiro.

Na visita técnica realizada no município de Trajano de Moraes, em março de 2020, com armadilha de isca viva e busca ativa nos imóveis, com relato de presença de triatomíneos em 2010, não foi encontrado nenhum triatomíneo. Nessa visita foram colocadas 20 armadilhas em 5 diferentes residências, localizadas em regiões urbanas e rurais, tanto no intradomicílio como no peridomicílio, o tempo estava bom, foi feito um dia de coleta nas residências (Fig. 16). De acordo com relato do coordenador da Vigilância Entomológica do município, em 2019, ano anterior a nossa visita, foi realizada aplicação de inseticida nos imóveis da localidade para eliminação do vetor da febre amarela (*Haemagogus*) dependendo do efeito residual do inseticida isso, possivelmente pode ter afetado a presença de triatomíneos. Na visita técnica foi também realizado um trabalho de sensibilização sobre a presença de triatomíneos envolvendo identificação, locais de abrigo, armazenamento e envio do material coletado.



Figura 16. Coleta de triatomíneos em Trajano de Moraes, Rio de Janeiro

Em Pedro do Rio, no município de Petrópolis, fizemos uma visita no dia 03 novembro de 2020 na residência de um morador que havia encontrado triatomíneos no peridomicílio perto

do canil uma semana antes da nossa visita, os insetos foram enviados LABIMDOE. O tempo estava nublado, temperatura 22.9°, 62% de umidade do ar. Durante a visita técnica não encontramos nenhum inseto vetor da DC através de busca ativa. A residência localiza-se em uma grande área onde antigamente funcionava uma pousada, atualmente só a residência principal recebe manutenção, permanecendo o restante dos imóveis abandonados e com muita mata ao redor, servindo como abrigo para diferentes animais e vetores, o imóvel está próximo a borda da mata de floresta atlântica. Os insetos coletados pelo morador (1 macho e 2 ninfas) foram levados para o Laboratório de Entomologia da SES para identificação taxonômica e a infecção foi avaliada pela Dra. Thaiane Verly do LABIMDOE. O adulto foi identificado como *Triatoma vitticeps* e o resultado do ensaio de PCR foi positivo para *T. cruzi* em 1 macho e 1 ninfa.

No mês de março de 2021, durante três dias, foi realizado um trabalho de busca ativa em outro imóvel com presença de triatomíneos no município de Petrópolis. Durante a busca neste imóvel foram encontrados 1 fêmea, 11 machos e 13 ninfas de triatomíneos no intradomicílio (Fig. 17). Os insetos adultos foram identificados taxonomicamente como da espécie *Triatoma vitticeps*. Todos os insetos encontrados foram enviados para o LABIMDOE, IOC para diagnóstico de infecção por *T. cruzi* através da técnica de PCR. Dessa coleta 4 machos mostraram-se positivos para *T. cruzi*.



Figura 17. Coleta de triatomíneos em Petrópolis, Rio de Janeiro. A- Funcionário da Secretaria Municipal de Saúde coletando triatomíneos no forro da residência. B- Triatomíneos coletados no local.

Ainda no ano de 2021, após a Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Paraty reportar-se ao setor de vigilância em saúde do estado, através da GPA/LACEN, realizamos uma visita técnica na localidade para verificar a ocorrência de triatomíneos. O local do registro de

triatomíneos é bem isolado, com uma vegetação altamente densa e a residência localizada bem próximo a borda da mata. Durante o trabalho de busca ativa, não foram encontrados triatomíneos, porém, o morador ressaltou que foi picado por triatomíneo já que, o mesmo tem conhecimento do inseto vetor. Foram repassadas as orientações ao morador para que, quando surgir outro inseto suspeito de ser o transmissor do patógeno causador da DC, o mesmo capture o inseto para envio a SMS do município.

Em todas as localidades visitadas, foi realizado trabalho de sensibilização da população local em relação aos cuidados e reconhecimento de triatomíneos. Também ressaltamos o procedimento de sempre comunicar aos agentes de controle de endemias (ACEs) a presença de inseto suspeito de ser vetor de importância médica.

7.2 Análise dos registros de triatomíneos da Secretaria de Saúde do Estado

De acordo com informações repassadas pela gerência técnica de entomologia da SES, há relatos de triatomíneos nos municípios descritos na Tabela 7. Nessa tabela constam também os insetos coletados nesse projeto de mestrado.

Tabela 7. Dados de espécies de triatomíneos, estágio de desenvolvimento, infecção para *Trypanosoma cruzi* e ambiente onde foi capturado em coletas realizadas em municípios do estado do Rio de Janeiro registrados na Secretaria Estadual de Saúde de 2008 a 2021.

Município	Espécie	Quant/estágio			Total	infecção			total	ambiente		period	Quant/coletas
		F	M	N		F	M	N		PERI/INTRA			
Itaperuna	<i>Triatoma. Vitticeps</i>		1		1				I		1	2017	1
Mangaratiba	<i>Triatoma. Tibiamaculata</i>	1			1				I		1	2020	
Paraty	<i>Panstrongylus gniculatus</i> <i>panstrongylus megistus</i> <i>Rhodnius domesticus</i>	8 1	2 1		10 2 1						5 1 1	2019/2021 2019 2019	5
Petrópolis	<i>Triatoma vitticeps</i>	28	41	280	349	11	10	3	24	3	346	2008/2021	8
Porciúncula	<i>Triatoma vitticeps</i>			2	2				I		1	2020	1
S. Maria Madalena	<i>Triatoma vitticeps</i>	2			2	3	1		I	5	2	2008/2020	2
Tota		40	45	282	368	14	11	3	24	8	358		18

M: macho; F: Fêmea; N: ninfa; I: indeterminado; PERI: peridomicílio; INTRA: intradomicílio.

Diante da análise desses dados podemos observar que o município em que se realizou o maior número de coletas de triatomíneos foi em Petrópolis, com um total de 8 coletas no período de 2008 a 2021. Nos municípios Paraty e Santa Maria Madalena realizaram-se 5 e 2 coletas, nos períodos de 20019 a 2021 e de 2008 a 2020, respectivamente (Tab. 7). As regiões político-administrativas do estado do Rio de Janeiro representadas nesses dados registrados de notificação de triatomíneos entre 2008 e 2021 na SES foram: Noroeste Fluminense (Itaperuna), Costa Verde (Mangaratiba e Paraty), Metropolitana (Petrópolis) e Serrana (Santa Maria Madalena). Faltando apenas as regiões: Norte Fluminense, Baixadas Litorâneas, Médio Paraíba e Centro-Sul Fluminense com registros da presença de triatomíneos.

O município no qual foi encontrado o maior número de triatomíneos nos registros da SES foi Petrópolis com um total de 349 insetos incluindo adultos e ninfas, todos classificados como *T. vitticeps*, sendo a maioria encontrados no ambiente de intradomicílio. O segundo município do estado do Rio de Janeiro com maior quantidade de triatomíneos notificados foi Paraty com 12 insetos, sendo 10 da espécie *P. geniculatus*, 1 *P. megistus* e 1 *R. domesticus*, todos encontrados no intradomicílio (Tab. 7).

A espécie de triatomíneo com maiores registros de notificação no estado do Rio de Janeiro é *T. vitticeps*, com total de 354 exemplares coletados em 4 diferentes municípios, seguido por *P. geniculatus* com 10 exemplares encontrados em um único município. Apenas um exemplar de *P. megistus*, *R. domesticus* e *T. tibiamaculata* foram encontradas apenas em um município cada (Tab. 7).

Em relação ao estágio de desenvolvimento dos insetos capturados a maioria encontrada consistiu em ninfas, seguidas de machos e fêmeas com 282, 45 e 40 indivíduos, respectivamente. Apesar do grande número de ninfas encontradas no total, estas estavam presentes apenas nos municípios de Petrópolis e Porciúncula. Já o estágio adulto (fêmea ou macho) foi encontrado em quase todos os municípios com registro, com exceção de Porciúncula onde apenas ninfas foram encontradas (Tab. 7).

O resultado da presença de insetos infectados para *T. cruzi* foi interessante já que de todos os municípios com exemplares analisados em nenhum município obteve-se resultado totalmente negativo. Importante frisar que nem todas as coletas foram enviadas para análise de infecção e que nem todos os exemplares coletados foram analisados. Mesmo essa análise não sendo total podemos notar uma alta quantidade de insetos positivos para presença do parasito (Tab. 7). O município de Petrópolis apresentou maior quantidade de insetos positivos para presença de *T. cruzi* (24 insetos infectados) e foi o município em que se detectou positividade também em ninfas. Em Santa Maria Madalena foi encontrado 1 macho positivo para o parasito (Tab. 7).

Em colaboração com pesquisadores do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera (LIVEDIH) do IOC, que realizam trabalhos de coleta de triatomíneos no estado do Rio de Janeiro, unimos os resultados de registros de ocorrência de triatomíneos da SES com os desse estudo para analisar de uma forma mais ampla a ocorrência de potenciais vetores do protozoário causador da DC. Observamos através de revisão de literatura que apesar de uma constante notificação de triatomíneos no estado não há nenhuma publicação recente de revisão de dados de presença de triatomíneos no Rio de Janeiro. Sendo assim, mapeamos a ocorrência, identificação e a infecção por *T. cruzi* das espécies de triatomíneos, de acordo com os dados da SES e do trabalho liderado pela Dra. Jacenir Mallet do (LIVEDIH) do IOC.

Entre os anos de 2008 e 2021 foram coletados 452 triatomíneos, sendo 76 machos, 82 fêmeas e 294 ninfas. Deste total 68 triatomíneos foram detectados como infectados com *T. cruzi*, sendo 22 fêmeas, 37 machos e 6 ninfas. Trezentos e setenta insetos foram considerados negativos e 34 não foram testados quanto à infecção pelo flagelado. No mapa abaixo podemos observar os diferentes municípios (Macaé, Petrópolis, Santa Maria Madalena, Trajano de Moraes, Cantagalo, São Fidélis, Conceição de Macabu e Tanguá) onde foram registrados triatomíneos com resultado positivo para *T. cruzi* (Fig. 18).

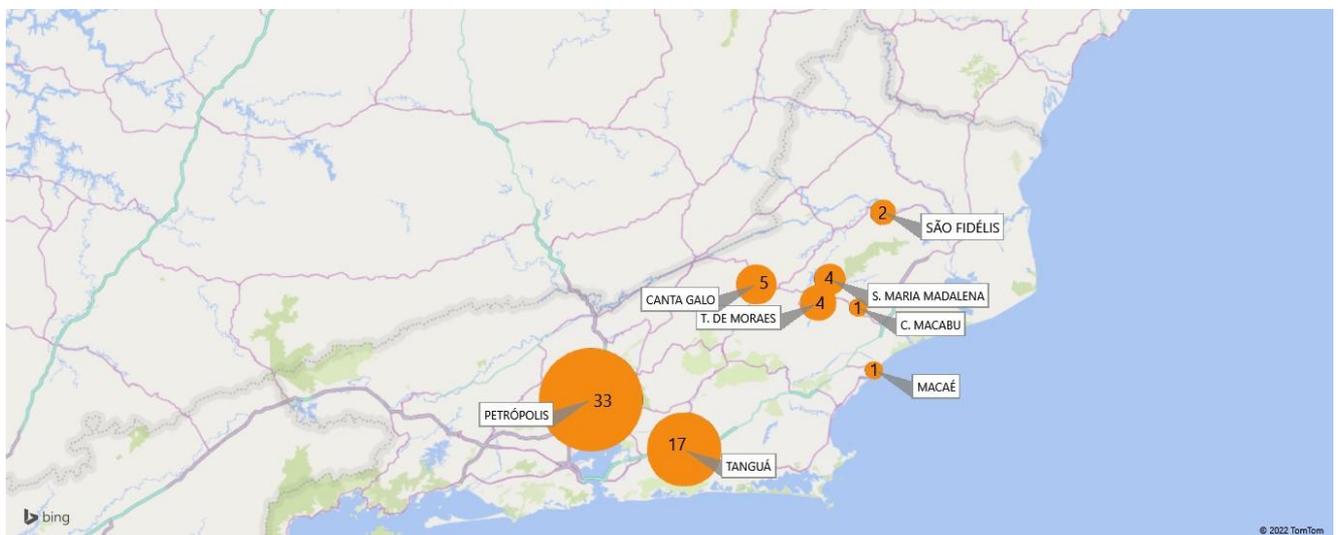


Figura 18. Mapa dos municípios por quantidade de triatomíneos infectados com *T. cruzi* no estado do Rio de Janeiro. Mapa construído usando o programa Excel 2019. Os círculos maiores, representam os municípios com maior quantidade de triatomíneos e os círculos menores, menos quantidades de triatomíneos encontrados.

De acordo com os dados analisados em conjunto, o município de Petrópolis apresentou a maior quantidade de triatomíneos infectados com *T. cruzi* (33), seguido do município de Tanguá (17) (Fig. 18). Outro fato relevante no presente estudo é que, a região com maior incidência de triatomíneos infectados foi a região Metropolitana (Petrópolis e Tanguá), onde foram encontrados um total de 385 triatomíneos sendo 50 positivos para presença de *T. cruzi*, seguida pela região Serrana (Santa Maria Madalena, Cantagalo e Trajano de Moraes) com 39 triatomíneos identificados, sendo 14 positivos para infecção. Podemos ressaltar que, ainda que na região da Costa Verde (Mangaratiba e Paraty) apesar de se terem obtidos dados de 13 triatomíneos, estes não foram analisados quanto à infecção por *T. cruzi* (Fig. 19). Já na região Norte Fluminense (Conceição de Macacu, Macaé e São Fidélis) foram encontrados 11 triatomíneos sendo 4 positivos para infecção. E na região Noroeste Fluminense (Itaperuna, Porciúncula e São José de Ubá) apenas 4 triatomíneos foram encontrados com um resultado negativo para infecção e o restante não analisado.

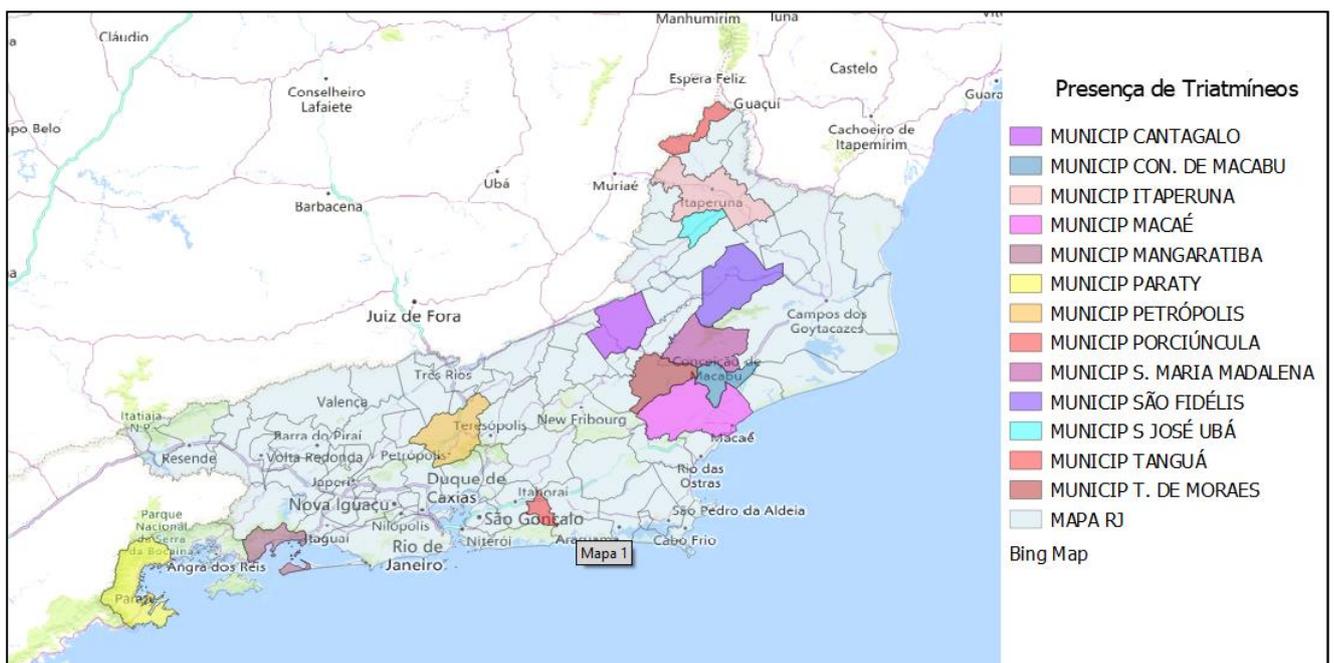


Figura 19. Mapa dos municípios com triatomíneos positivos com *Trypanosoma cruzi* por regiões do estado. MUNICIP: município. Mapa construído usando o programa QGIS 3.16. As cidades em cores são os locais positivados para os triatomíneos.

8. DISCUSSÃO PARTE 2

O presente trabalho também analisou os dados de distribuição de triatomíneos no estado do Rio de Janeiro. Diante das notificações de triatomíneos em municípios com indícios da presença do inseto vetor, foram feitas visitas de busca ativa e busca com armadilhas. Dos municípios visitados, Petrópolis foi o município com presença confirmada do triatomíneo por busca ativa em duas localidades nos distritos, Pedro do Rio e Secretário. Estes foram identificados como sendo da espécie *T. vitticeps*, e com confirmação de infecção pelo *T. cruzi*, inclusive em exemplares do inseto em estágio de ninfa. Na literatura existem poucas publicações de detecção de triatomíneos no município de Petrópolis. Em 1942 Lent⁵³ detectou a presença de *T. vitticeps* na localidade de Secretário, do município de Petrópolis, em Nova Friburgo e Rio de Janeiro (Distrito Federal daquela época). Porém a presença dessa espécie de triatomíneo encontra-se descrita em diversos municípios do estado do Rio de Janeiro.

De acordo com Galvão¹⁴ a espécie *T. vitticeps* tem distribuição nos seguintes estados Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. No estado do Rio de Janeiro, os municípios com diagnóstico de infecção por *T. cruzi* nos triatomíneos da espécie *T. vitticeps* são: Conceição de Macabu¹⁹; Rio de Janeiro⁵¹; Silva Jardim⁵²; Arcádia-Miguel Pereira⁵³; São Fidélis⁵³ e Santa Maria Madalena²⁰.

Nas regiões Norte e Noroeste Fluminense do estado do RJ têm registrado aumento das notificações de ocorrência de formas adultas de triatomíneos, principalmente de *T. vitticeps* (dados não publicados). As constantes notificações de triatomíneos nos municípios do estado do Rio de Janeiro, possivelmente se devem ao fato do avanço do desmatamento transformando grande parte das áreas em pasto, atividade predominantemente rural, casas com edificações simples de madeira ou de alvenaria somente com telhados precários e forro⁵⁴.

A grande maioria dos triatomíneos da espécie *T. vitticeps* coletados em nosso projeto e dos dados de notificação da SES foram encontrados no intradomicílio. Por exemplo, na busca ativa em um imóvel de Secretário, Petrópolis, foi encontrada uma colônia de *T. vitticeps* com 1 fêmea, 11 machos e 13 ninfas no intradomicílio, mais especificamente no telhado da residência, provavelmente devido à falta de manutenção. A presença de *T. vitticeps* no intradomicílio também é relatada em outros estudos. Gonçalves¹⁷ (1998) descrevem que os triatomíneos da espécie *T. vitticeps* invadem residências pela atração à luz das casas, se estabelecendo em telhados sem manutenção, forros malconservados e janelas abertas durante a noite. Essas condições são mais favoráveis para a colonização dos triatomíneos em imóveis do que paredes de pau a pique pois propiciam o abrigo também de animais que podem ser fonte de alimentação

dos triatomíneos. Dessa forma, são locais que proporcionam abrigo e alimentação para o inseto vetor estabelecer a colônia.

Com hábitos tipicamente silvestre *T. vitticeps* dificilmente são encontrados no intradomicílio, atraídos pelo brilho das luzes nas casas na borda da mata. Porém foram encontrados triatomíneos no interior de um imóvel no município de Petrópolis-RJ. Houve também relato de um morador no município de Paraty que disse ter sido picado por barbeiro no interior de sua residência. Lembrando que essas notificações derivam principalmente da população que entra em contato com os ACEs, manifestando ter encontrado um possível barbeiro o que depende do conhecimento da população sobre esses vetores.

Além de *T. vitticeps*, foram encontradas no estado do Rio de Janeiro as espécies: *Triatoma tibiamaculata*; *Panstrongylus geniculatus*; *Panstrongylus megistus*; *Rhodnius domesticus*. Sendo a espécie *P. geniculatus* com maior ocorrência depois de *T. vitticeps*. Porém todos os exemplares de *P. geniculatus* (8 fêmeas e 2 machos) foram capturados em um único município, Paraty. O município de Paraty cercado pelo Oceano Atlântico e o Planalto da Bocaina possui umidade relativa do ar com poucas variações significativas ao longo do ano, e médias mensais durante a estação chuvosa entre 78 e 82% e nos demais meses não são inferiores a 77%⁵³, indicam um município mais favorável ao triatomíneo da espécie *P. geniculatus*.

Já para as espécies *T. tibiamaculata*, *P. megistus* e *R. domesticus* foi encontrado apenas um exemplar de cada em diferentes municípios. Os triatomíneos da espécie *T. tibiamaculata* são adaptados a nichos especializados, sugerindo uma adaptação evolutiva por longo período⁵⁵, demonstram preferência por habitat naturais como: ninhos de marsupiais, e roedores⁵⁶. A espécie *R. domesticus* é encontrada principalmente em ninho de roedores ou marsupiais, em bromélias epífitas e, esporadicamente em árvores ocas e, apresentam níveis de infecção com *T. cruzi* superiores a 50%⁵⁷. Estudos indicam evidente crescimento de registro domiciliar desta espécie em diferentes regiões do país, incluindo região Centro Oeste, Leste e Sul. Possivelmente os fragmentos de mata sejam os focos para abrigar indivíduos desta espécie de triatomíneos⁵⁸. Estudos de Forattini⁵⁹ (1970) apontam que os habitats preferenciais de *P. megistus* são: buracos em árvores, troncos de árvores, mourões, amontoado de lenha e ninhos.

Os triatomíneos capturados (adultos e ninfas) nas localidades de São Pedro do Rio e Secretário, distritos de Petrópolis-RJ, apresentaram positividade para *T. cruzi*. Na análise dos dados provenientes da SES e do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera (LIVEDIH) do IOC, constatamos a maior quantidade de notificações de triatomíneos infectados com *T. cruzi* nos municípios de Petrópolis e Tanguá, ambos municípios pertencentes à região Metropolitana do estado do RJ. Na região Metropolitana foram encontrados 50 insetos infectados, seguido pela região Serrana com 14 e região Norte,4.

Estudos realizados por Lorosa⁵³ (2003) relataram um foco de caso de DC no distrito de Arcádia (Miguel Pereira-RJ), região Serrana, sendo *T. vitticeps* incriminado como transmissor do agente etiológico da doença. Em 2013, foram identificados triatomíneos infectados nos municípios de São Sebastião do Alto, São Fidélis (Norte) e Santa Maria Madalena (Serrana) 73% apresentaram positividade para *T. cruzi* do genótipo I pela PCR multiplex do gene do mini-exon⁵⁴, Sangenis²⁰ (2015), relataram o primeiro caso de DC na capital do RJ, no bairro do Engenho de Dentro.

A presença de ninfas de triatomíneos infectados é outro fator importante no estudo. Os municípios, Petrópolis e Tanguá, apresentaram ninfas das espécies *T. vitticeps* e *P. megistus* positivas para o *T. cruzi*. Esses dados confirmam que nessas localidades o ciclo biológico do vetor está estabelecido, com presença de insetos em todos os estágios de vida, confirmando a reprodução da população e aquisição de sangue como fonte alimentar, já que esses insetos são hematófagos e necessitam de sangue para realizarem a ecdise para o próximo estágio e postura de ovos pelas fêmeas adultas.

A presença frequentemente documentada de *T. vitticeps* invadindo o ambiente domiciliar em várias localidades do estado do Rio de Janeiro, com apontamento de colonização pela presença de ninfas além dos adultos, e com vários exemplares infectados são preocupantes e destacam sua importância na necessidade de manutenção da vigilância entomológica na região. Apesar dos relatos de seu baixo potencial vetorial e da incerteza entre especialistas sobre a sua importância no ciclo humano da DC, cabe destacar o ciclo de contaminação em animais silvestres pela via de contaminação oral. Associando essa questão com a ocorrência em alta nos últimos anos de casos de DC em humanos também pela via oral de contaminação, o Boletim epidemiológico da doença de Chagas de 2019 da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS-MS 2021)¹², ressalta a importância de alerta para vigilância desses vetores no estado do Rio de Janeiro.

Os dados obtidos por este estudo podem nortear as ações de vigilância em saúde pela SES junto aos municípios. Portanto, essa análise e sua publicação poderiam contribuir para um melhor entendimento da distribuição de vetores de *T. cruzi* pelos municípios do Rio de Janeiro ressaltando e alertando para a necessidade da intensificação da vigilância entomológica e controle de triatomíneos para o controle da DC no Estado do RJ como doença negligenciada.

9. CONCLUSÕES

- O tratamento via aplicação tópica do óleo essencial NEO (930µg/inseto) causou mortalidade de 58,5% nas ninfas de *Rhodnius prolixus* infectadas com *Trypanosoma cruzi*.
- O óleo essencial NEO diluído em acetona reduziu significativamente a infecção dos parasitos em todas as concentrações testadas.
- Os tratamentos tópicos de ninfas de *R. prolixus* com óleo essencial OLA e VMFS2 (em emulsão) causou 44% (concentração de 357,2 µg/inseto) e 100% (concentração de 10,0 µg/inseto) de inibição da alimentação sanguínea, respectivamente.
- A taxa de ecdise de ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* infectados com *T. cruzi* tratados topicamente com MF2FS e OLA foi reduzida para até 0% (concentração de 17,9 µg/inseto) e 27,3 (concentração de 1,8 µg/inseto), respectivamente. O óleo essencial OLA (1,8 µg/inseto) causou 45,5% de mal formação após a metamorfose em adultos.
- O tratamento tópico (2µL) de ninfas de *R. prolixus* com o solvente etanol diminuiu a quantidade de *T. cruzi* por inseto e o tratamento com o óleo essencial NEO diluído em acetona reduziu a infecção pelos flagelados no vetor em todas as concentrações testadas.
- Petrópolis foi o município com maior quantidade de vetores capturados, com presença de adultos e ninfas e infecção positiva por *T. cruzi* tanto nas coletas como nos registros de notificações do estado do Rio de Janeiro.
- A espécie de triatomíneo predominante nas notificações no estado do Rio de Janeiro foi *Triatoma vitticeps* seguido de *Panstrongylus geniculatus*.
- O intradomicílio foi o ambiente predominante dos triatomíneos encontrados pelos dados de notificação de triatomíneos no estado do Rio de Janeiro.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization, 2020. Chagas Disease (Also Known as American Trypanosomiasis). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Accessed 02 February 2022.
2. Instituto Oswaldo Cruz. Portal Fiocruz [internet]. Rio de Janeiro: 2019 [cited 2019 nov 13]. Available from: <https://portal.fiocruz.br/noticia/doenca-de-chagas-estudo-para-tratamento-da-cardiopatía-obteve-resultados-promissores-2019>
3. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil Boletim epidemiológico. 2021.
4. Organização Pan Americana da Saúde. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas Diseases. [Internet]. Washington,D.C: OPAS/OMS, 2019[Acesso 2020 mar 2]. 160p. Disponibilidade: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49653/9789275120439>
5. Souza JM, Instituto René Rachou. Vigilância da doença de chagas: manual técnico das atividades de controle dos triatomíneos. 22.ed. Belo Horizonte: Editora O Lutador; 2019. 61P.
6. Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(1):40-31.
7. Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. Med Clin (Barc) [Internet]. Elsevier España, S.L.U.; 2017;148(3):125–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>
8. Meis J, Castro RSS. Manual para Diagnóstico em Doença de Chagas. Ficha Cat Elabor pela Bibl Ciências Biomédicas/ICICT/FIOCRUZ-RJ. 2017;1:110.
9. Paiva VF, Belintani T, de Oliveira J, Galvão C, da Rosa JA. A review of the taxonomy and biology of Triatominae subspecies (Hemiptera: Reduviidae). Parasitol Res. 2022 Feb;121(2):499-512.

10. Marcondes, Carlos Brisola. Entomologia médica e veterinária. 2. Ed. São Paulo: Atheneu; 2011. 526p.
11. Mota T, Vitta ACR, Lorenzo-Figueiras AN, Barezani CP, Zani CL, Lazzari CR, et al. (2014) A Multi-species Bait for Chagas Disease Vectors. PLoS Negl Trop Dis 8 (2): e2677. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002677>
12. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil Boletim epidemiológico. 2021.
13. Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro. Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores da doenças de Chagas). 1.ed. Rio de Janeiro. 2014. 52p. disponível: http://www.fiocruz.br/ioc/media/Atlas_triatominio_jurberg.pdf
14. GALVÃO, C., org. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p.
15. Lent H.; Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 163, n. 3, p. 123-520, 1979.
16. Dias, João Carlos Pinto et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde do Brasil, Brasília-DF. . Epidemiologia e Serviços de Saúde [online]. 2016, v. 25, n. spe [Acessado 24 Março 2022] , pp. 7-86. Disponível em: <<https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>>.ISSN2237-9622. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>.
17. Gonçalves TCM, De Oliveira E, Dias LS, Almeida MD, Nogueira WO, et al. An Investigation on the Ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) and its Possible Role in the Transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the Locality of Triunfo, Santa Maria Madalena Municipal District, state of Rio de Janeiro, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1998; 93 (6) 711-717.
18. Lorosa ES, Dos Santos CM, Jurberg J. Foco de doença de Chagas em São Fidélis, no Estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(4):419–20.

19. Silva, Cristina Santos- Estudo morfofisiológico, ultraestrutural e histopatológico de amostras silvestres de *Trypanosoma cruzi* isoladas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) no Estado do Rio de Janeiro. Cristina Santos da Silva. – 2006. 87P.
20. Sangenis, L. H. C. Doença de Chagas em naturais do estado do Rio de Janeiro: Aspectos clínico- epidemiológicos, caracterização molecular parasitológica e estudo ecoepidemiológico dos casos autóctones [Tese]. Rio de Janeiro: Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz; 2013. 126p
21. Sangenis LH, Sousa AS, Sperandio GM, Xavier SL. First report of acute chagas disease by vector transmission in Rio de Janeiro-Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2015; 57(4): 361-364
22. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell, Chiari E, Fernandes, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Rio de Janeiro- Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(7). 1054p.
23. Secretaria de Vigilância em saúde/MS. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. 2.ed. Brasília. 2019. 10p. Disponível: <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=2518092>
24. Neves D. P, Melo, A. L, Linard P. M, Vitor R. W. A. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
25. Garcia ES, Genta FA, De Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. Trends Parasitol. 2010;26(10):499–505
26. Organização Pan Americana da Saúde. Doença de chagas-Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. [Internet]. Washington D.C: OPAS/OMS, 2009 [Acesso 2020 mar 2]. 2p. Disponibilidade: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50413>
27. Souza JM, Instituto René Rachou. Vigilância da doença de chagas: manual técnico das atividades de controle dos triatomíneos. 22.ed. Belo Horizonte: Editora O Lutador; 2019. 61P.

28. Fundação nacional de saúde-Ministério da saúde. Controle de Vetores, Procedimento de Segurança. 1.Ed. Brasília. 2001. 208p. Disponível: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/controle_vetores.pdf
29. Ware, G. W. (Ed.). An introduction to insecticides. (4th edition), The pesticide book. Willoughby: Meister, 2004. Disponível em:<<https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides>> Acesso em: 21 janeiro 2020.
30. Mulla M. S, Su T. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. J Am Mosq Control Assoc. 1999;15(2):133–52.
31. Paiva MHS. Caracterização molecular da resistência a inseticidas químicos em populações de *Aedes aegypti* [Dissertação]. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 2013.195 p.
32. SIMÕES, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. 2002. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4 ed Porto Alegre, RS: Ed da UFSC, 833p.
33. Moraes MC, de Souza JV, da Silva Maia Bezerra Filho C, Dolabella SS, de Sousa DP. Trypanocidal essential oils: A review. Molecules. 2020;25(19):1–19.
34. Souza T de A, Lopes MBP, Ramos A de S, Ferreira JLP, Silva JR de A, Queiroz MMC, et al. Alpinia Essential Oils and Their Major Components against *Rhodnius nasutus*, a Vector of Chagas Disease. ScientificWorldJournal. 2018; 2018:2393858.
35. Nogueira J. A. P. Avaliação da biodiversidade estudo da composição química do óleo essencial das folhas de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. ST. HIL. Niteroi: Faculdade de Farmacia, Universidade Federal Fluminense; 2014. 84p.
36. Nogueira, J., Mourão, S.C., Dolabela, I.B. et al. *Zanthoxylum caribaeum* (Rutaceae) essential oil: chemical investigation and biological effects on *Rhodnius prolixus* nymph. Parasitol Res 113, 4271–4279 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4105-4>
37. Cuadros J, Carreño AL, Kouznetsov V V., Duque JE. Insecticidal action of synthetic girsensohnine analogues and essential oils on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). Biomédica. 2017;37:50.

38. Figueiredo MB, Gomes GA, Santangelo JM, Pontes EG, Azambuja P, Garcia ES, et al. Lethal and sublethal effects of essential oil of *Lipdia sidoides* (verbenaceae) and monoterpenes on chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017;112(1):63–9.
39. Proença KS, Roma RM, Oliveira R.V.M, Vila M.M.D. Avaliação da estabilidade de cremes empregando diferentes agentes de consistência. Re. Bras. Farm. 2006; 87(3) 74-77.
40. Opende, K., Suresh, W. e Dhaliwal, GS (2008) Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. Centro de Pesquisa de Biopesticidas de Insetos. Biopesticides International, 4, 63-84.
41. Garcia ES & Rembold H (1984). Effects of azadirachtin on ecdysis of *Rhodnius prolixus*. J. Insect Physiol. 30:939-941.
42. Franzol, A. & Rezende, M.C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. Polímeros. 2015, 25 número especial 11-9.
43. Castro, D.P.; Moraes, C.S.; Gonzalez, M.S.; Ribeiro, I.M.; Tomassini, T.C.B, et al. Physalin B inhibits *Trypanosoma cruzi* infection in the gut of *Rhodnius prolixus* by affecting the immune system and microbiota. Journal of Insect Physiology, 2012;(58) 1620–1625.
44. Verly, Thaian de Sousa. Importância epidemiológica de espécies do subcomplexo *Triatoma rubrovaria* por meio da análise de competência vetorial e hábito alimentar. 2021. 174 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.
45. Mello BC, Cléber D. Uzeda, Marana V. Bernardino, Duclécio Mendonça-Lopes, Alphonse Kelecom,. Effects of the essential oil obtained from *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) on the development of *Rhodnius prolixus* nymphae, Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2007; 17 (4): 514-520.

46. Luis A.C. Tietbohl, Cicero B. Mello, Lucas R. Silva, Izadora B. Dolabella, Thais C. Franco, Marcelo S. Gonzalez et al. Green insecticide against Chagas disease: effects of essential oil from *Myrciaria floribunda* (Myrtaceae) on the development of *Rhodnius prolixus* nymphs, Journal of Essential Oil Research, Journal of Essential Oil Research. 2019; DOI: 10.1080/10412905.2019.1631894.
47. Eloi S. Garcia, Denise Feder, José Eugenio P, Lima Gomes, Heinz Rembold. Short And long term effects of azadiractin on development And Egg production of *Rhodnius prolixus*. Memória Instituto Oswaldo Cruz. 1990; 85(1) 11-15
48. Gonzales MS. Efeito da Azadiractina no desenvolvimento do *Trypanossoma cruzi* (CLONE DM-28C) em *Rhodnius prolixus* STAL, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE), Itaguaí-Brasil: Universidade Federal Fluminense; 1992. 182p.
49. E. S. Garcia, M. S, Gozales, P. Azambuja. Effects of Azadiractin on *Rhodnius prolixus*: Data And Hypotheses. Memória Instituto Oswaldo Cruz. 1991; 86(2) 107.
50. IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Estimativas da população residente com data de referência 1º de julho de 2021.
51. Lent H 1942. Transmissores da moléstia de Chagas no estado do Rio de Janeiro. Rev F de Medicina 6: 3-13.
52. Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell D.A, Jansen AM. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. Parasitology. 1999 Feb;118 (2):161-6.
53. Lorosa E. S., Valente M. V. M. Pinto, Lent V. C. Herman , Jurberg José. Foco de Doença de Chagas em Arcádia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98(7): 885-887, October 2003
54. Neiva A 1914. Presença em uma localidade do Estado do Rio de um novo transmissor da moléstia de Chagas encontrado infectado em condições naturais (Nota prévia). Brasil Med 28: 333-335.

55. Gaunt, Michael and Miles, Michael The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2000,95(4)557-565.
56. Lima, Artur Gomes Dias; Maia, Helio; Sherlock, Ítalo Rodrigues de Araújo. A presença de *Triatoma tibiamaculata* (Hemiptera, Reduviidae) e o risco de ocorrência da Doença de Chagas em Salvador - Bahia. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 15., Salvador, 1997. Salvador: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1997. p. 45. TL-009.
57. Guarneri AA, Carlos J Carvalho Pinto, Chris J Schofield, Mário Steindel. Population Biology of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) under Laboratory Conditions: Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 93(2): 273-276
58. Villela, Marcos Marreiro et al. Análise da fonte alimentar de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) e sua atual importância como vetor do *Trypanosoma cruzi*, no Estado de Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2010, 43 (2) 125-128.
59. Forattini, Oswaldo Paulo et al. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana: I - observações sobre o *Panstrongylus megistus* e suas relações com focos naturais da infecção, em área urbana da cidade de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública. 1970. 4 (1)19-30.