

Jair Rodrigues Alves

**Ciclo biológico do *Rhodnius milesi* (Hemiptera: Reduviidae)
e a atividade de extratos de plantas**

Brasília
2007

Jair Rodrigues Alves

**Ciclo biológico do *Rhodnius milesi* (Hemiptera: Reduviidae)
e a atividade de extratos de plantas**

Dissertação realizada no Laboratório de Farmacognosia e apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espíndola

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Pujol Luz

Brasília
2007

Dedico este trabalho aos meus pais, Manoel Felipe e Lídia Rodrigues, que mesmo quando em silêncio me apoiaram a seguir em frente; à Prof^ª. Maria Gonçalves, pelos primeiros ensinamentos; à Prof^ª. Dr^ª. Ana Jansen, pelos seminários em campo; ao Prof. Dr. Aduino Araújo, pelo estímulo e incentivo à pesquisa e à Veronice Rodrigues, companheira e amiga de todas as horas.

Agradecimentos

À Professora Laila Salmen Espíndola, pela orientação e apoio na realização deste trabalho e pela acolhida no Laboratório de Farmacognosia.

Ao Professor José Roberto Pujol Luz, pela co-orientação, apoio e acolhida no Laboratório de Dipterologia.

Ao Professor José Elias de Paula pela coleta e identificação botânica das plantas.

Ao professor Juan Cortez, pelas proveitosas conversas e ensinamentos sobre estatística e informática.

À Professora Dayse Rocha pelas dicas sobre o inseto e atendimento das solicitações de publicações científicas.

Ao Professor Cleudson Nery de Castro pela participação fundamental no nosso trabalho e por aceitar compor a banca.

Ao Professor Reginaldo Constantino obrigado pelas valiosas sugestões e por aceitar fazer parte da banca.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Lynn Erselius, pelos conselhos e apoio.

Ao amigo Daniel Diniz, pelas discussões, apoio e incentivo incondicional.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Farmacognosia: Aline, Clarice, Daniela, Ellen, Fernanda, Karla, Lorena, Mariana, Nashira, Renata, Raquel, André, Arthur, Everton e Tiago, pela convivência e ensinamentos.

Aos parentes e amigos que direta ou indiretamente me incentivaram e apoiaram.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Lista de figuras	v
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviações	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
Introdução	1
Material e Métodos	4
Resultados e Discussão	7
Referências	19
Tabelas	29 a 42
Figuras	43 a 48
Anexo A: Ficha de avaliação do ciclo biológico de <i>Rhodnius milesi</i>	49
Anexo B: Ficha de monitoramento da temperatura e umidade relativa da sala de criação dos triatomíneos.....	50
Anexo C: Ficha de avaliação dos resultados da atividade inseticida e capacidade de atrasar o ciclo de desenvolvimento do inseto de amostras aplicadas topicamente sobre ninfas de 4º estágio de <i>R. milesi</i> no período de 28 dias.....	51
Anexo D: Ficha de avaliação dos controles durante a realização dos testes tópico com as amostras sobre ninfas de quarto estágio de <i>R. milesi</i> no período de 28 dias	52

Lista de figuras

Figura 1: Processo de produção dos extratos.....	43
Figura 2: Aplicação tópica das amostras nos tergitos abdominais de ninfas do 4º estágio de <i>R. milesi</i>	44
Figura 3: Partição líquido-líquido dos extratos ativos: sistema de eluentes: Hexano: Acetonitrila ou Hexano:Metanol - (3:1)	45
Figura 4: <i>Siparuna guianensis</i> : Coluna cromatográfica aberta de sílica gel da fase ativa, oriunda da partição líquido-líquido do extrato: sistema de eluentes: Ciclohexano:Acetato de etila:Metanol	45
Figura 5: <i>Siparuna guianensis</i> : Cromatografia em camada delgada (CCD). T: material de partida; 210, 220, 225: frações. Sistema de eluente: Hexano:Acetato de etila (80:20). Revelador: vanilina sulfúrica.....	46
Figura 6: Diferentes fases do ciclo de desenvolvimento de <i>R. milesi</i> . - A: Ovos; B: ninfa de 1º estágio; C: ninfa de 2º estágio alimentada; D: ninfa de 3º estágio; E: ninfa de 4º estágio; F: ninfa de 5º estágio; G: inseto adulto	47
Figura 7: Percentual de mortalidade em cada estágio de desenvolvimento de <i>R. milesi</i> ; N1: ninfa de primeiro estágio, N2: ninfa de segundo estágio, N3: ninfa de terceiro estágio, N4: ninfa de quarto estágio, N5: ninfa de quinto estágio.....	48
Figura 8: <i>Siparuna guianensis</i> : Cromatografia em camada delgada dos grupos G3, G4, G5, G6, G7, G8 e G9. C: ciclohexano; D: diclorometano. Revelador: vanilina sulfúrica.....	48

Lista de tabelas

Tabela I: Plantas do bioma Cerrado avaliadas quanto às suas atividades inseticidas e capacidade de atrasar o ciclo de desenvolvimento do inseto.....	29
Tabela II: Ciclo do desenvolvimento biológico de <i>R. milesi</i> em laboratório à temperatura de 24 ± 5 °C e umidade relativa $75 \pm 18\%$, alimentados semanalmente em galinha.....	30
Tabela III: Número de repastos sanguíneos em cada fase de desenvolvimento ninfal de <i>R. milesi</i>	30
Tabela IV: Atividade inseticida de extratos de plantas do Cerrado sobre ninfas de 4º estágio (n = 40) de <i>R. milesi</i>	31
Tabela V: Atividade inseticida das fases oriundas dos extratos ativos sobre ninfas de 4º estágio (n=60) de <i>R. milesi</i> topicamente tratadas.....	35
Tabela VI: <i>Siparuna guianensis</i> : Grupos resultantes do processo cromatográfico da fase hexânica do extrato etanólico da folha de <i>S. guianensis</i>	37
Tabela VII: <i>Siparuna guianensis</i> : Atividade inseticida dos Grupos obtidos a partir do processo cromatográfico da fase hexânica do extrato etanólico da folha de <i>S. guianensis</i> sobre ninfas de 4º estágio (n = 60) de <i>R. milesi</i>	38
Tabela VIII: Capacidade dos extratos vegetais em atrasar o ciclo de desenvolvimento de ninfas de 4º estágio de <i>R. milesi</i> no período de 28 dias, em porcentagem.....	39
Tabela IX: Capacidade das fases oriundas das partições dos extratos ativos em atrasar o ciclo de desenvolvimento de ninfas de 4º estágio de <i>R. milesi</i> no período de 28 dias, em porcentagem.....	41
Tabela X: <i>Siparuna guianensis</i> : Capacidade dos Grupos (G) obtidos do fracionamento da fase hexânica do extrato etanólico da folha em atrasar o ciclo de desenvolvimento de ninfas de 4º estágio de <i>R. milesi</i> no período de 28 dias, em porcentagem.....	42

Lista de abreviações

Act: acetonitrila

AcEt: acetato de etila

C: Caule (madeira + casca)

CC: Casca do caule

CCD: Cromatografia em camada delgada

Ch: ciclohexano

CM: Madeira do caule

CN: Controle sem tratamento

CP1: Controle acetona

CP2: Controle etanol

D: Diclorometano

E: Etanol

F: Folha

Fr: Fruto

G: Grupos de frações reunidas

H: Hexano

M: Metanol

N1: ninfa de primeiro estágio

N2: ninfa de segundo estágio

N3: ninfa de terceiro estágio

N4: ninfa de quarto estágio

N5: ninfa de quinto estágio

Rf: Fator de retenção

R: Raiz (madeira + casca)

RC: Casca da raiz

RM: Madeira da raiz

RZ: Rizoma

SH: Solução hidroalcoólica

Resumo

A doença de Chagas causada pelo *Trypanosoma cruzi* é transmitida ao homem através de fezes contaminadas durante o repasto sanguíneo de insetos hemípteros, subfamília Triatominae. É crescente o surgimento de populações de triatomíneos resistentes aos inseticidas disponíveis, além do aparecimento de novas espécies com potencial vetorial, como *Rhodnius milesi* na Amazônia. Diante da diversidade química das plantas como fonte de novas moléculas ativas, este estudo avaliou a atividade inseticida e a capacidade de atrasar o ciclo de desenvolvimento do inseto de extratos de plantas do Cerrado sobre ninfas de 4º estágio (N4) de *R. milesi* e acompanhou o ciclo biológico do inseto em condições de laboratório. Entre os 67 extratos testados, 15 causaram entre 12,5 a 42,5% de mortes dos insetos. A partição em sistema líquido-líquido de nove desses extratos ativos permitiu selecionar a fase hexânica do extrato etanólico da folha de *Siparuna guianensis*, que foi fracionada em coluna aberta de sílica gel e as frações reunidas em grupos (G), segundo perfil cromatográfico em CCD. O grupo G6 apresentou propriedades triatomicida e toxicológicas sobre as ninfas de 4º estágio de *R. milesi*. Foi observada uma taxa de eclosão de 94,2% dos ovos em ninfas de 1º estágio, com incubação média de 15 dias. O período médio em dias de desenvolvimento pós-embrionário foi para ninfas de 1º estágio de 17,2; 2º estágio 18,2; 3º estágio 17,3; 4º estágio 20,5 e 5º estágio 32,5 dias, com 1 a 1,5 repastos sanguíneos em cada estágio. O período médio transcorrido da eclosão da ninfa ao inseto adulto de *R. milesi* foi de 105,7 dias. O percentual de mortalidade total foi de 11,5%, sendo 4,9% para N1; 3,2% para N2; 2,7% para N3; 0,7% para N5 e nenhuma morte em N4, resultados que corroboram com a utilização de ninfas N4 em ensaios de atividade inseticida. Foi observado o período médio de jejum em ninfa de 5º estágio de 333,5 dias. O presente trabalho registra pela primeira vez a atividade triatomicida de *S. guianensis* e descreve o ciclo de vida, inédito, da biologia reprodutiva de *R. milesi* em condições de laboratório.

Palavras chaves: *Rhodnius milesi*, ciclo de vida, *Siparuna guianensis*, triatomíneos, extratos de plantas, Cerrado, Doença de Chagas.

Abstract

Chagas' disease is transmitted to humans through feces of hemoptrous insects, subfamily Triatominae, contaminated during blood feeding. The increase in Triatominae populations resistant to available insecticides, and the appearance of new potential vector species, such as *Rhodnius milesi* in the Amazon region, are two pressing concerns. Given the uncharted chemical diversity of Cerrado plants as sources of new active molecules, this study assessed the insecticidal properties and the insect development retarding capacities of Cerrado plant extracts on 4th stage (N4) *R. milesi* nymphs, through the monitoring of the insect's biological cycle under laboratory conditions. Of the 67 plant extracts tested, 15 caused insect mortalities between 12.5 and 42.5%. Nine of the 15 active extracts were partitioned in a liquid-liquid system allowing the selection of the hexanic phase of the ethanolic extract of the *Siparuna guianensis* leaf, which was fractioned in an open silicon gel column. The fractions were grouped (G) according to their chromatographic CCD profiles. Group G6 manifested triatotoxic and toxicological activity on 4th instar *R. milesi* nymphs. An overall eclosion rate of 94.2% was observed for eggs of the 1st instar nymphs, incubated for an average of 15 days. The average post-embryonic development period was 17.2 days for 1st instar nymphs, 18.2 for 2nd instar nymphs, 17.3 for 3rd instar, 20.5 for 4th instar, and 32.5 days for 5th instar nymphs, with 1 to 1.5 blood feedings in each stage. The average period between the eclosion of the nymphs and the adult *R. milesi* was 105.7 days. The total mortality percentage was 11.5%; 4.9% for N1; 3.2% for N2; 2.7% for N3; and 0.7% for N5. However, no deaths were registered for N4, which corroborates the use of N4 nymphs in insecticidal activity studies. The average period of resistance to starvation for 5th instar nymphs was 333.5 days. This study is an initial investigation of

the triatomicidal activity of *S. guianensis*, and is the first description of the reproductive cycle of *R. milesi* under laboratory conditions.

Key words: *Rhodnius milesi*, life cycle, *Siparuna guianensis*, Triatominae, plant extracts, Cerrado, Chagas' disease.

Introdução

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma enfermidade causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909), responsável por elevada morbimortalidade, sendo um sério problema de saúde pública. A doença ocorre por todo o México, América Central e América do Sul, acometendo 16 a 18 milhões de pessoas e expondo 120 milhões ao risco de adquirir a infecção (WHO 2005). A via usual de transmissão do parasita ao homem ocorre por meio de insetos infectados (Hemíptera:Reduviidae:Triatominae) ao eliminarem fezes contaminadas com o protozoário próximo ao local da picada, durante o repasto sanguíneo. Também ocorre a transmissão por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, congênita, via oral, acidentes em laboratório e manipulação de animais contaminados (Dias & Schofield 1999, MS 2005, Ianni & Mady 2005, Dias 2006).

No Brasil existem mais de 4 milhões de pessoas infectadas pelo parasita (Vinhaes & Dias 2000). Devido às desordens ambientais, aos movimentos migratórios do homem, às condições microclimáticas das edificações humanas e à escassez de fontes silvestres fornecedoras de alimento (Forattini 1980), a doença antes rural, torna-se urbano-rural, sendo encontrado de 4 a 7% de trabalhadores doentes nos centros metropolitanos do país (Vinhaes & Dias 2000). A situação gera considerável perda econômica, pois diminui a produtividade dos trabalhadores, quase sempre doentes carentes de atenção dos sistemas de saúde e de cobertura previdenciária (Xavier *et al.* 1988, Schofield & Dias 1991, Guariento *et al.* 1999, Pereira *et al.* 2002, Dias 2007).

O parasita necessita da passagem por um hospedeiro mamífero e um inseto hemíptero hematófago para completar seu ciclo de desenvolvimento. Ao longo do trato

intestinal do inseto e no hospedeiro vertebrado, o parasita apresenta características morfológicas variadas nas diferentes etapas de vida (Chagas 1909, Schaub & Losch 1988, Kollien & Schaub 1998). Estudos demonstram que a doença e seus vetores estão presentes em todas as regiões brasileiras (Vinhaes & Dias 2000), coexistindo em alguns casos, um ciclo de transmissão do *T. cruzi* entre pequenos mamíferos silvestres e triatomíneos (Teixeira *et al.* 2001, Gurgel-Gonçalves *et al.* 2004, Herrera *et al.* 2005, Xavier *et al.* 2007) e colonizando o peridomicílio e domicílios humanos (Sarquis *et al.* 2006). Portanto a certificação de “área de livre transmissão vetorial da doença de Chagas por *Triatoma infestans* (Klug, 1934)” (OPAS 2006), não elimina a possibilidade de outras espécies de triatomíneos, potenciais vetores, a invadirem os biótopos anteriormente ocupados por *T. infestans*. Não se sabe quando o homem começou a participar do ciclo de transmissão do parasita entre vetores e animais no ambiente silvestre, porém estudos evidenciam que em tempos remotos o homem já havia contraído o parasita e desenvolvido a doença. Estudos paleoparasitológicos em populações pré-colombiana, identificaram fragmentos de DNA do *T. cruzi* em tecidos lesionados de múmias de 2000 anos da costa sul andina (Ferreira *et al.* 2000), 4000 anos (Guhl *et al.* 1999) e 9000 anos (Aufderheide *et al.* 2004).

Quanto aos triatomíneos, existem 137 espécies descritas e oficialmente reconhecidas, sendo 16 do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Galvão *et al.* 2003). *R. milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg, 2001 foi descrito a partir de espécimes oriundos do Pará, região Amazônica (Valente *et al.* 2001). Nessa mesma região, cinco espécies de *Rhodnius* foram encontradas, naturalmente infectados com *T. cruzi* (Coura *et al.* 1999). O ciclo de desenvolvimento dos triatomíneos inclui o ovo, cinco estádios ninfais e o adulto. As ninfas necessitam se alimentar de sangue para crescer e mudar de estágio

e os adultos para se reproduzirem e permanecerem vivos (Rocha *et al.* 1997, Giron *et al.* 1998, Luz *et al.* 1999, Rocha *et al.* 2004). O processo de crescimento, muda, maturidade sexual e capacidade reprodutiva dos insetos é regido por controle hormonal neuroendócrino, envolvendo basicamente três hormônios: hormônio protoracicotrópico, hormônio da muda ou ecdisona e hormônio juvenil (Gonzalez *et al.* 1998).

Com relação ao tratamento, existem dois medicamentos Nifurtimox e Benznidazol, porém tóxicos e pouco específicos. O benznidazol é o único medicamento com ação tripanocida empregado clinicamente no Brasil, com 70% de eficácia em infecções agudas e apenas 7% em fases avançadas da doença (comunicação pessoal). porém ineficazes para interromper a progressão da doença na sua fase crônica (Coura *et al.* 1997, Dias & Schofield 1999, Castro *et al.* 2001, SVS 2005). Não existem vacinas para prevenir a infecção. Portanto, a principal arma para o controle da doença consiste na interrupção da transmissão vetorial, rigorosa triagem dos doadores de sangue e de órgãos, detecção e tratamento da transmissão congênita e tratamento de casos agudos (WHO 2005). O emprego de inseticidas piretróides de alto poder residual, como por exemplo deltametrina, cipermetrina, lambdacialotrina é a estratégia mais utilizada no controle de vetores domiciliados (Diotaiuti *et al.* 2000, Arana *et al.* 2002, Nakagawa *et al.* 2003, Dumonteil *et al.* 2004, Rojas de Arias *et al.* 2004, Villela *et al.* 2006) e como repelente dos vetores silvestres (Kroeger *et al.* 2003, Reithinger *et al.* 2005). Entretanto, a utilização continuada desses inseticidas, além de contaminar o meio ambiente e organismos vivos (Nakata *et al.* 2005, Woudneh & Oros 2006), vem desenvolvendo resistência dos triatomíneos (Sílvari *et al.* 1997, Vassena & Picollo 2003, Audino *et al.* 2004, Yon *et al.* 2004, Picollo *et al.* 2005).

As plantas são fonte promissora de novos compostos ativos (Espindola *et al.* 2004, Mesquita *et al.* 2005a, Mesquita *et al.* 2005b, Napolitano *et al.* 2005, Rodrigues *et al.* 2005, Coelho *et al.* 2006, Rodrigues *et al.* 2006, Mesquita *et al.* 2007) e têm demonstrado a presença de moléculas triatômicas e inibidoras da muda (Rojas de Arias & Schmeda-Hirschmann 1988, Rojas de Arias *et al.* 1995, Fournet *et al.* 1996, Laurent *et al.* 1997, Coelho *et al.* 2006). Considerando a variedade de espécies vegetais do bioma Cerrado e seu potencial como fonte de novas moléculas ativas, este estudo avaliou a atividade inseticida e a capacidade em atrasar o ciclo de desenvolvimento do inseto de extratos vegetais e suas substâncias sobre ninfas de quarto estágio de *R. milesi*. O ciclo de vida do inseto foi acompanhado e permitiu a observação dos aspectos biológicos como período de incubação dos ovos, número de repastos realizados em cada fase de desenvolvimento, percentual de mortalidade em cada estágio, período de duração do ciclo de desenvolvimento pós-embrionário e a resistência ao jejum em ninfas de quinto estágio.

Material e Métodos

As plantas foram coletadas no bioma Cerrado, entorno de Brasília/DF, identificadas pelo botânico Prof. José Elias de Paula da Universidade de Brasília (UnB) e excisas foram depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UB) (Tabela I). Os diferentes órgãos vegetais foram separados, dessecados, estabilizados, pulverizados em moinho de facas e submetidos ao processo de extração por maceração com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, etanol e solução hidroalcoólica). As soluções extrativas foram recuperadas por filtração e concentradas em evaporador rotativo. Os diferentes extratos foram estocados em freezer a - 20 °C (Figura 1).

Os insetos foram obtidos da colônia de *R. milesi* mantida no Anexo do Laboratório de Farmacognosia/UnB desde 2005. Para o acompanhamento do ciclo biológico, insetos adultos (71 fêmeas e 76 machos) foram selecionados aleatoriamente da colônia e transferidos para uma cuba de vidro de 20 cm de altura por 19 cm de diâmetro, previamente forrado com papel filtro para absorver a umidade das fezes e contendo um papelão entrecruzado servindo de suporte-escada. Os insetos foram alimentados em galinha imobilizada. Ovos foram retirados e agrupados por data da oviposição e observados diariamente até a eclosão. As ninfas foram agrupadas segundo a data de eclosão, e mantidas em frasco de plástico de 6 cm de altura e 9 cm de diâmetro, forrados com papel filtro para absorver a umidade das fezes e contendo papel chamex sanfonado servindo de suporte-escada e fechado com tecido de malha fina afixada com elástico. Cinco dias após a emergência das ninfas a fonte sanguínea foi ofertada diariamente por uma hora até a primeira refeição ser concluída com sucesso, posteriormente passando a ser oferecida semanalmente. As ninfas foram mantidas nos frascos de criação acima descrito e observadas diariamente para o acompanhamento do ciclo de desenvolvimento dos insetos, a partir do registro das mudas e mortes (Anexo A). Durante o período de acompanhamento do ciclo biológico de *R. milesi* foram registrados temperatura média de 24,1 °C (mínima de 19 °C e máxima de 29 °C) e umidade relativa média (UR) de 83,1% (mínima de 59% e máxima de 93%) (Anexo B).

Foi observada a resistência ao jejum de ninfas de quinto estágio (**N5**). Para esse propósito, ninfas de quarto estágio (**N4**) (n=20) foram alimentadas em galinha, mantidas nos frascos de criação, onde 16 indivíduos realizaram a muda para o quinto estágio (**N5**) e permaneceram em jejum até a morte. Os resultados foram observados de três em três dias até a morte do último inseto da amostra.

Para a realização dos testes de avaliação inseticida e da capacidade de atrasar o ciclo de desenvolvimento do inseto, 1µl das amostras na concentração de 50 mg/ml (Rojas de Arias *et al.* 1995, Fournet *et al.* 1996) foi aplicado topicamente nos tergitos abdominais das ninfas de quarto estágio (N4) de *R. milesi* (Figura 2), em duplicata. Segundo a polaridade das amostras essas foram solubilizadas em acetona ou etanol. Os testes foram acompanhados junto aos controles: CP1 (controle acetona) quando as amostras eram solubilizadas em acetona; CP2 (controle etanol) quando as amostras eram solubilizadas em etanol e CN (controle negativo – insetos sem tratamento). Foram utilizadas 40 ninfas de 4º estágio (N4) por extrato e por controle na triagem preliminar e 60 N4 para o monitoramento do fracionamento químico do extrato ativo e os controles dessa etapa. Os testes foram realizados em blocos experimentais distribuídos de janeiro de 2006 a janeiro de 2007. As ninfas N4 foram alimentadas em galinhas, 12 a 15 horas antes da realização dos experimentos. Em seguida, foram aplicadas topicamente as amostras e os controles sobre os tergitos abdominais das ninfas N4 e então agrupadas nos frascos de criação ordenados dentro de uma estante telada, mantida na sala de criação dos insetos no Anexo do Laboratório de Farmacognosia/UnB. Os insetos foram considerados mortos quando não possuíam atividade motora própria, seja espontânea ou provocada por estímulo de algum objeto pontiagudo ou pincel (Laurent *et al.* 1997). Os resultados de mortalidade e da capacidade de atrasar o ciclo de desenvolvimento do inseto foram avaliados durante 28 dias e registrados em fichas individuais (Anexo C), assim como os controles (Anexo D).

Nove extratos ativos foram submetidos ao processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente: Hexano:Acetonitrila ou Hexano:Metanol, na proporção de 3:1 (Figura 3). Após avaliação biológica, a fase ativa oriunda da partição

de um dos extratos (6,5 g) foi cromatografada em coluna aberta de sílica gel (400-200 Mesh ULTRA CHEM), eluída em ciclohexano (100), ciclohexano:acetato de etila (98:2, 95:5, 90:10, 85:15, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100) e metanol (100); recolhidas em frações de 100 ml (Figura 4). As frações foram reunidas em grupos (G) segundo perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 5), revelada com vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento a 100 °C.

Na análise do ciclo biológico do inseto, foram utilizadas como medidas descritivas as médias aritméticas como medida de tendência central e o desvio padrão como medida de dispersão. Na análise da mortalidade dos insetos e da capacidade de atrasar o ciclo de desenvolvimento, foi utilizado o teste Q de Cochran para avaliar a independência das amostras relacionadas. Em todos os testes estatísticos foi utilizado como nível de significância um valor de $p < 0,05$. O programa estatístico SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) versão 11 para Windows e o aplicativo Excel do programa Office da Microsoft® versão 2000, foram utilizadas na realização das análises estatísticas.

Resultados e Discussão

A participação vetorial da espécie *R. milesi* na transmissão da doença de Chagas e a sua distribuição no território nacional são desconhecidos. Entretanto existem espécies do gênero que são importantes vetores da doença de Chagas na América Latina, como *R. prolixus* e a espécie silvestre encontrada na região amazônica *R. bretesi*, envolvida na transmissão da doença em coletores de piaçava da região (Coura *et al.* 1999, Dias *et al.* 2002). O conhecimento da biologia reprodutiva de espécies silvestres é importante no planejamento de estratégias de controle de vetores

domiciliados, justificando, portanto a nossa iniciativa em estudar o ciclo de desenvolvimento pós-embrionário de *R. milesi*. A criação e manutenção desta espécie, alimentados semanalmente em galinhas, possibilitou observar que o inseto possui importante capacidade reprodutiva em condições de laboratório, com baixa taxa de mortalidade entre os estádios e grande voracidade e aproveitamento do sangue ingerido. Os aspectos da biologia reprodutiva desse inseto são descritos pela primeira vez, fato importante quando consideramos a participação de outras espécies de *Rhodnius* na transmissão da doença de Chagas na Amazônia (Coura *et al.* 1994, Coura *et al.* 1999, Dias *et al.* 2002). *R. milesi* também é uma espécie da região amazônica e pelas características da biologia reprodutiva em laboratório poderá facilmente se adaptar às condições microclimáticas das habitações humanas, tornando-se um transmissor em potencial, além da possibilidade de compor o quadro dos triatomíneos vetores orais, visto a atual realidade na Amazônia, com inúmeros casos de contaminação oral. O excelente desenvolvimento em condições de laboratório com ciclo de reprodução pequeno (105,7 dias), em relação a outras espécies, representa um bom modelo de estudo em triagens na busca por novas moléculas inseticidas.

Quanto ao período de incubação dos ovos foi observada uma taxa de eclosão de 94,2%, ou seja, 223 ovos resultaram em 210 N1, com incubação média de 15 dias, mínimo de nove e máximo de 19 dias. O percentual de eclosão observado demonstra a alta taxa de fertilidade e viabilidade dos ovos e indica também que em condições ideais uma colônia dessa espécie possa alcançar grande densidade populacional. Com relação ao desenvolvimento ninfal, o menor período médio registrado foi observado no 1º estágio (N1) com 17,2 dias, seguido pelo 3º estágio (N3) com 17,3 dias; do 2º estágio (N2) com 18,2 dias; do 4º estágio (N4) com 20,5 dias e do 5º estágio (N5) com 32,5 dias

(Tabela II). O período médio transcorrido desde a eclosão da ninfa até o inseto adulto foi de 105,7 dias (mínimo de 85 e máximo de 142 dias), indicando que em condições ideais possa ocorrer até três gerações do inseto por ano (Tabela II). A figura 6 ilustra as diferentes fases do ciclo de desenvolvimento de vida do inseto: ovo, ninfa de 1º estágio (N1), 2º estágio (N2), 3º estágio (N3), 4º estágio (N4), 5º estágio (N5) e inseto adulto.

Esse período de 105,7 dias foi menor que o observado para *R. bretesi* por Rocha *et al.* (2004), quando alimentaram a espécie semanalmente em camundongos e registraram um período médio de 115,3 dias, ou ao observado para *R. robustus* por Rocha *et al.* (2001) que ao alimentarem quinzenalmente os insetos em pombos registraram um período médio de 115 dias a 28 °C e 70% UR. *R. pictipes* (Rocha *et al.* 1997) alimentados quinzenalmente em camundongos apresentaram um período médio de desenvolvimento de 112 dias e alimentados quinzenalmente com sangue de carneiro defibrinado através de uma membrana de silicone completaram o ciclo em 116,8 dias. Entretanto, Aldana *et al.* (2005) ao alimentarem quinzenalmente *R. robustus* com sangue humano registraram um período médio de 70 dias. *R. domesticus* (Guarneri *et al.* 1998) alimentados semanalmente em camundongos completaram o ciclo com período médio de 93,8 dias. O período de 105,7 dias registrado neste trabalho é, portanto, intermediário entre o valor mínimo (70 dias) e máximo (116,8 dias) encontrado na literatura publicada para outras espécies do gênero.

O número de repastos sanguíneos realizado por *R. milesi* em cada fase de desenvolvimento mostrou excelente aproveitamento do sangue ingerido. A maioria dos insetos se alimentaram apenas uma vez para atingir o estágio subsequente, sendo o melhor aproveitamento observado para N1. Nos demais estádios as ninfas necessitaram

no máximo de dois repastos sanguíneos (Tabela III). O valor máximo de repastos sanguíneos registrados nos diferentes estádios foram menores que os observados para *R. bretesi* (Rocha *et al.* 2004) e *R. domesticus* (Guarneri *et al.* 1998) em **N1** e **N5** e iguais em **N2** e **N4**.

O percentual de mortalidade total constatado no presente estudo foi de 11,5%, sendo 4,9% para **N1**; 3,2% para **N2**; 2,7% para **N3**; 0,7% para **N5** e nenhuma morte em **N4** (Figura 7). Ou seja, das 162 **N1** selecionadas para acompanhamento até o inseto adulto, 140 completaram o ciclo de desenvolvimento em 105,7 dias (82 insetos eram machos e 58 fêmeas), a perda, portanto, foi de apenas 22 insetos. É importante salientar que o percentual total de mortes de 11,5% é bastante baixo evidenciando a viabilidade da espécie em condições de laboratório quando alimentados em galinha. Chama atenção o pequeno índice de mortes de **N5** (0,7%), estágio no qual geralmente ocorre considerável mortalidade dos insetos. Alguns autores consideram esse um estágio crítico no desenvolvimento do inseto, por ser o estágio de transição para o inseto adulto. Portanto, o percentual observado poderá ser uma característica de **N5** de *R. milesi*, indicando seu potencial para alcançar a fase adulta, fase em que o inseto pode se reproduzir, migrar e colonizar outros locais. Outro ponto a destacar é não haver sido registrado nenhuma morte de ninfas de 4º estágio, corroborando para a utilização deste estágio ninfal em experimentos laboratoriais.

Os valores de mortalidade registrados neste estudo foram menores que os observados por Rocha *et al.* (1997) para *R. pictipes* em dois regimes de alimentação: através de membrana de silicone (52%) e camundongos (34%). Menores que em *R. bretesi* (Rocha *et al.* 2004), mortalidade de 16,33% e *R. domesticus* 19,2% (Guarneri *et*

al. 1998). Em *R. robustus*, Aldana *et al.* (2005) registraram taxas de mortalidade variando de 7,1% em **N4** a 28,6% em **N5**, enquanto Braga *et al.* (1999) registraram mortalidade de 18% e 21%; 40% e 43% alimentando esta espécie semanal e quinzenalmente em camundongos e pombos, respectivamente. Em nosso trabalho *R. milesi* apresentou baixo índice de mortes e de forma decrescente 4,9% a 2,7% em **N1** a **N3**, nenhuma morte em **N4** e um pequeno percentual de mortes em **N5** (0,7%). Esse mesmo tipo percentual foi observado por Rocha *et al.* (1997) onde os autores levantam a hipótese de maior mortalidade em **N1** devido a dificuldade das ninfas em realizarem o primeiro repasto com aparelho bucal frágil, tendo, portanto dificuldade em alcançar a fonte sanguínea e atingir um capilar. A boa adaptação em condições de laboratório, demonstrada pelos aspectos biológicos apresentados, podem refletir o comportamento da espécie no ambiente natural.

No experimento em que **N4** foram alimentadas e as **N5** resultantes foram submetidas ao jejum prolongado, foi observado o período mínimo de jejum de 177 dias e máximo de 435 dias, com média de 333,5 e desvio padrão de 76 dias. Os resultados obtidos foram maiores que o observado para *R. neivai* alimentados em galinha (106 dias) e em coelho (99 dias) (Cabello 2001); *T. rubrovaria* alimentados em camundongos (179 dias) (Almeida *et al.* 2003); *T. rubrofasciata* alimentados em ratos (101 dias) (Cortez & Gonçalves 1998); *T. vitticeps* alimentados em galinha (71,5 dias) (Moreira & Spata 2002). A resistência ao jejum é uma característica importante dos triatomíneos, que garante a sobrevivência da espécie em escassez prolongada de alimento, além de permitir aos vetores domiciliados de se refugiar em abrigos profundos por longo período, para fugir de eventual ação residual dos inseticidas. Em **N5** de *R. milesi* o jejum prolongado, máximo de 435 dias, demonstra a resistência do inseto na espera por

alimento, conseqüentemente grande capacidade latente em atingir o estágio adulto. Esse aspecto da biologia de *R. milesi* pode refletir o comportamento do inseto no ambiente silvestre, sugerindo seu importante potencial a colonizar variados biótopos.

Sessenta e sete extratos pertencentes a 15 espécies de 10 famílias de plantas, foram avaliados topicamente sobre os tergitos abdominais de ninfas de 4º estágio de *R. milesi*. Desses, 34 extratos eram hexânicos, 20 diclorometânicos, 9 etanólicos e 4 hidroalcoólicos. Os extratos que apresentaram ação inseticida, com significante atividade estatística ($p < 0,05$) quando comparado com os controles foram: hexânicos: folha de *Byrsonima crassa*, *Siparuna guianensis* e *Palicourea rigida* 15%, *Chomelia pohliana* 12,5% e *Renealmia alpinia* 17,5%; madeira da raiz 20% e caule (madeira + casca) 15% de *Schinus terebinthifolius*; madeira do caule de *Kielmeyera coriacea* 20% e raiz de *Qualea grandiflora* 12,5%. Diclorometânicos: caule (madeira + casca) de *Enterolobium ellipticum* 17,5%; raiz de *Chomelia pohliana* 12,5% e madeira do caule de *Qualea grandiflora* 22,5%. Etanólicos: caule (madeira + casca) de *Siparuna cujabana* 32,5% e casca do caule de *Siparuna guianensis* 42,5%. Solução hidroalcoólica: folha de *Byrsonima crassa* 25% (Tabela IV). O extrato etanólico da casca do caule de *S. guianensis* foi, portanto o que apresentou a melhor atividade.

Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por Laurent *et al.* (1997) ao testarem 63 óleos essenciais extraídos de plantas da Bolívia em aplicação tópica sobre ninfas de 4º estágio de *T. infestans*, onde registraram entre 5 e 40% de mortes, sendo o mais ativo o óleo essencial das partes aéreas de *Myrthostachys andina*. Rojas de Arias *et al.* (1995) demonstraram, entre 20 extratos testados, 45% de mortalidade de N4 de *T. infestans* com o extrato hexânico da flor de *Achyrocline satureoides*. Fournet

et al. (1996) verificaram 33,3 e 50% de mortalidade de *R. neglectus* topicamente tratados com óleos essenciais de *Hedomea mandoniana* e *M. andina*, respectivamente. Verificamos que é muito comum na literatura o relato de atividade de óleos essenciais sobre microorganismos e insetos. Certamente essas atividades podem corresponder a um dos motivos pelos quais as plantas sintetizam esses metabólitos secundários. Ainda, podemos pensar na hipótese de maior atividade, quando analisamos o perfil químico do óleo essencial de uma espécie, e verificamos um menor número de substâncias químicas diferentes e, portanto em concentração maior, do que em um extrato bruto, que pode conter centenas de substâncias. Anteriormente em nosso laboratório (Coelho *et al.* 2006) foi avaliada nas mesmas condições, a atividade inseticida de 24 extratos de plantas do Cerrado sobre ninfas de 4º estágio de *R. milesi*. Os extratos da espécie *Simarouba versicolor*, popularmente conhecida como mata-barata apresentou os seguintes índices de mortalidade: etanólicos da casca da raiz 95%, fruto 80% e casca do caule 50%; e hexânico do fruto 65%. O extrato hexânico da raiz de *Guarea guidonia* causou 75% de mortes dos insetos.

O estudo da atividade das fases oriundas da partição líquido-líquido dos extratos ativos sobre ninfas de 4º estágio de *R. milesi* (n=60), no período de 28 dias, mostrou que as fases hexânica (18,3%) e metanólica (8,3%) do extrato etanólico e a fase hexânica (6,7%) do extrato hexânico da folha de *S. guianensis*; fase metanólica (6,7%) do extrato etanólico do fruto de *S. brasiliensis* e a fase acetonitrila (8,3%) do extrato diclorometânico da madeira do caule de *Q. grandiflora*, mostraram significativa atividade triatomicida ($p < 0,05$), quando comparadas com os respectivos controles. A fase hexânica do extrato etanólico da folha de *S. guianensis* foi a mais ativa provocando 18,3% de morte dos insetos (Tabela V), antecedida por sinais de toxicidade como

estatismo, incordenação motora, coma profundo com súbitos tremores nas patas. Esses sinais iniciaram logo após a aplicação tópica da fase ativa, porém alguns insetos conseguiram a se recuperar.

O estudo químico da fase hexânica do extrato etanólico da folha de *S. guianensis* (6,5 g) em coluna cromatografica aberta de sílica gel resultou em 282 frações de 100 ml, reunidas em 16 grupos (G), após análise do perfil cromatográfico em CCD. O rendimento total dos grupos foi de 99,4% (6,46 g), havendo, portanto uma perda de 0,04 g que pode ser atribuído à eliminação de fração intermediária e perda nas transferências até reunião final dos grupos; sendo os de maiores rendimentos o G12 (35,4%), G9 (13,2%), G11 (8,3%) e G6 (6,5%) (Tabela VI).

A atividade dos grupos foi monitorada sobre **N4** de *R. milesi* (n=60) por 28 dias para verificação da mortalidade e capacidade de atrasar o ciclo de desenvolvimento do inseto. O grupo G6 foi o que apresentou a maior atividade triatomicida dentre os 15 grupos testados, porém não foi quantitativamente significativa quando comparada com os controles ($p>0,05$) (Tabela VII). Existe a possibilidade de sinergismo das substâncias presentes na fase hexânica do extrato etanólico da folha de *S. guianensis*, visto que os grupos resultantes do processo cromatográfico mostraram um espectro de atividade fragmentado. Um pequeno percentual de mortes (1,7 a 6,7%) foi observado nos grupos G3 a G9 (Tabela VII). A CCD mostrou a presença de substâncias comuns nos grupos G6 e G3 a G9, oriundos do fracionamento da fase hexânica do extrato etanólico da folha de *S. guianensis* (Figura 8). Entretanto, apenas o grupo G6 apresentou o quadro toxicológico observado previamente no teste com a fase hexânica.

Segundo Freitas *et al.* (2005) três famílias de proteínas: citocromos P450, esterases (Est) e glutathione s-transferases (GSTs) são responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos nos insetos. Essas proteínas se ligam a compostos tóxicos oxidando-os e tornando-os atóxicos ou menos tóxicos, facilitando assim a sua eliminação. Essas proteínas podem ser portanto, possíveis responsáveis pela resistência dos vetores da doença de Chagas aos inseticidas. Na Argentina, Sílvari *et al.* (1997) demonstraram o envolvimento de proteínas GSTs na resistência de *T. infestans* aos piretróides. Vassena & Picollo (2003) demonstraram: na Argentina níveis incipientes de resistência de *T. infestans* à deltametrina; no Brasil resistência à β -ciflutrina e cipermetrina e na Venezuela acentuada resistência de *R. prolixus* a todos os piretróides. Audino *et al.* (2004) sugeriram o envolvimento dos citocromos P450 como responsáveis pelo fenômeno da resistência de *T. infestans* na Argentina, enquanto Picollo *et al.* (2005) responsabilizaram proteínas Est por níveis elevados de resistência dos insetos aos inseticidas. Em nosso estudo, a melhora dos sintomas toxicológicos observada em alguns insetos pode ser devido à concentração insuficiente da substância ativa nas diferentes amostras de *S. guianensis* avaliada (extrato e fase ou grupos oriundos de seu fracionamento químico) ou devido a mecanismos ora desconhecidos.

No Brasil, *S. guianensis* conhecida como negramina, com características organolépticas revelando importante concentração de óleo essencial, é utilizada tradicionalmente como anti-inflamatório e anti-reumático (Rodrigues & Carvalho 2001, Souza & Felfili 2006). Leitão *et al.* (1999) em revisão sobre a família Monimiaceae citam nove espécies ativas do gênero *Siparuna* apresentando alcalóides, terpenóides, lignanas, flavonóides e derivados do ácido cinâmico, e descrevem para *S. guianensis* os alcalóides liriodenina e cassamedina. Antonio *et al.* (1984) identificaram os terpenóides

curzerenona, curzereno, miristicina, germacrono e ocimeno no óleo essencial das folhas de *S. guianensis*. É possível que o processo de extração por maceração da folha de *S. guianensis* em etanol tenha extraído algum óleo essencial. A CCD do grupo G6 sugere a presença de terpenóides, quando revelada pela vanilina sulfúrica, revelador específico dessa classe química. Foi certificado a ausência de alcalóides nesse grupo, pela CCD revelada com Dragendorff.

Foi observado um atraso no ciclo de desenvolvimento de *R. milesi*, com um prolongamento da muda de ninfas de 4º estágio, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado com os controles, em um período de 28 dias, em extratos das folhas: hexânico 17,1% e diclorometânico 42,1% de *S. terebinthifolius*; etanólico de *R. alpinia* 60%; solução hidroalcoólica de *B. crassa* 66,7% e em extrato etanólico da raiz (madeira + casca) de *S. brasiliensis* 65,6% (Tabela VIII). Esse experimento foi de 28 dias, porém o ciclo de desenvolvimento continuou a ser acompanhado e permitiu observar que a muda de **N4** para **N5**, ocorreu somente após mais duas a três semanas, ou seja entre 43 e 49 dias da aplicação dos extratos, sugerindo portanto o prolongamento do ciclo sob a ação dos extratos, pois normalmente a muda de **N4** para **N5** é de no mínimo 16 dias e máximo de 28 dias (Tabela II).

No teste com as fases oriundas das diferentes partições dos extratos ativos somente para a fase acetonitrila do extrato etanólico da casca do caule de *S. guianensis* foi observado um atraso no ciclo de desenvolvimento, no período de 28 dias, $p < 0,05$, atividade estatisticamente significativa quando comparado com os controles (Tabela IX). A mudança de estágio de **N4** para **N5** não foi prejudicada quando os insetos foram tratados com as amostras do extrato da folha de *S. guianensis* e/ou suas substâncias agrupadas por semelhanças químicas (fases ou grupos) (Tabela X).

O presente trabalho registra pela primeira vez a atividade inseticida de *S. guianensis*. Existe a possibilidade de sinergismo das substâncias presentes na fase hexânica do extrato etanólico da folha de *S. guianensis*, visto que os grupos resultantes do processo cromatográfico mostraram um espectro de atividade fragmentado. Outra perspectiva é avaliar a atividade inseticida do óleo essencial da folha de *S. guianensis*. Apesar da atividade triatômica baixa de *S. guianensis* no grupo G6, este grupo de substâncias apresentou propriedades toxicológicas sobre os insetos, semelhante ao quadro de toxicidade causado pelos inseticidas piretróides usados nas campanhas de controle dos triatomíneos. A análise da composição química do grupo G6 de *S. guianensis*, assim como a análise do óleo essencial de suas folhas certamente poderá contribuir para a identificação de compostos promissores para o controle de *R. milesi* e provavelmente de outros triatomíneos.

Com relação ao inseto, os dados de fertilidade (94,2% de eclosão dos ovos em ninfas de 1º estágio), percentual total de mortes entre os estádios (11,5%) e tempo do ciclo de desenvolvimento de **N1** ao inseto adulto (105,7 dias), evidenciam que *R. milesi* demonstra excelente capacidade reprodutiva em condições de laboratório, quando alimentados em galinhas, apresentando-se como ótimo modelo experimental. As ninfas necessitaram de apenas 1 a 1,5 repastos sanguíneos para atingir o estágio subsequente e apresentaram um tempo médio de intermuda entre 17,2 e 32,5 dias. A baixa taxa de mortalidade total de **N1** ao inseto adulto (11,5%) e o intervalo intermuda, média superior a 17 dias, sugere que a alimentação quinzenal seja suficiente para a manutenção satisfatória de uma colônia desta espécie em laboratório. Contudo, em experimentos que seja necessário grande quantidade de exemplares, recomendamos a alimentação semanal dos insetos em galinha e ajuste da temperatura e umidade relativa

em 25 °C e 80% UR. A resistência ao jejum prolongado das ninfas de 5º estágio, média de 333,5 dias (177 a 435 dias) mostrou que *R. milesi* é uma espécie que apresenta grande capacidade em prolongar a vida (no caso de N5) por espera de alimento, para então atingir a fase adulta e perpetuar a espécie.

Na Amazônia o risco da emergência e disseminação da doença de Chagas está relacionado ao aumento da ação antrópica sobre o meio ambiente e aos movimentos migratórios de entrada e saída da região. Coura *et al.* (1999) listam 18 espécies de triatomíneos encontradas na região amazônica, onde 10 estão naturalmente infectadas com o *T. cruzi*, sendo 5 pertencentes ao gênero *Rhodnius*. Ao interferir no meio ambiente, o homem também se insere na dinâmica da circulação e manutenção do ciclo do *T. cruzi* entre vetores e animais silvestres (Coura *et al.* 1994, Neto *et al.* 1995, Dias *et al.* 2002). Portanto, o conhecimento das características do ciclo biológico de *R. milesi*, espécie da mesma região, poderá contribuir para o controle de sua possível domiciliação e importância vetorial.

Referências

- Aldana E, Zamora E, Eliécer Lizano E 2005. Ciclo biológico de *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 alimentado con sangre humana en condiciones de laboratorio. *Entomol Vect* 12 : 53-60.
- Almeida CE, Francischetti CN, Pacheco RS, Costa J 2003. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 367-371.
- Antonio TM, Waller GR, Mussinan CJ 1984. Composition of essential oil from the leaves of *Siparuna guianensis* (Monimiaceae). *Chem Ind* 16: 514-515.
- Arana MAM, San Juan ER, Aguilar RA, Torres BN 2002. Activity and residual effect of two formulations of lambda-cyhalothrin sprayed on palm leaves to *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 353-357.
- Audino PG, Vassena C, Barrios S, Zerba E, Picollo MI 2004. Role of enhanced detoxication in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 335-339.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Gurl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LEJr, Fornaciari G, Allison NM 2004. A 9.000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2034-2039.
- Braga MV, Prata KC, Brazil RP 1999. Biology of nymphs of *Rhodnius robustus* Larrousse (Hemiptera, Reduviidae), fed on pigeon or on swiss mouse blood in laboratory conditions. *Rev Bras Biol* 59: 91-94.
- Cabello DR 2001. Resistance to starvation of *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under experimental conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 587-591.

- Castro C, Prata A, Macedo V 2001. Estudo clínico de 13 anos de 190 chagásicos crônicos de Mambaí, Goiás, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 309-318.
- Chagas C 1909. Nova Tripanosomíase humana e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Coelho AAM, Paula JE, Espíndola LS 2006. Insecticidal activity of Cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. *Neotrop Entomol* 35: 133-138.
- Cortez MGR & Gonçalves TCM 1998. Resistance to starvation of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) under laboratory conditions (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 549-554.
- Coura JR, Abreu LL, Willcox HPF, Petana W 1997. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 139-144.
- Coura JR, Junqueira ACV, Boia MN, Fernandes O 1999. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 379-384.
- Coura JR, Junqueira ACV, Giordano CM, Funatsu IRK 1994. Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop* 36: 363-368.
- Dias JCP & Schofield CJ 1999. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 103-121.

- Dias JCP 2006. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 370-375.
- Dias JCP 2007. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cad Saude Publica* 23 (Supl I): 13-22.
- Dias JCP, Prata A, Schofield CJ 2002. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 669-678.
- Diotaiuti L, Filho OFF, Carneiro FCF, Dias JCP, Pires HHR, Schofield CJ 2000. Aspectos operacionais do controle do *Triatoma brasiliensis*. *Cad Saude Publica* 16 (Supl. II): 61-67.
- Dumonteil E, Piña HR, Félix ER, Pérez MB, Sierra MJR, Rabinovich JE, Menu F 2004. Re-infestation of houses by *Triatoma dimidiata* after intra-domicile insecticide application in the Yacatán Península, México. *Mem Inst Oswaldo cruz* 99: 253-256.
- Espindola LS, Vasconcelos JRJ, Mesquita ML, Marquie P, de Paula JE, Mambu L, Santana JM 2004. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *Planta Med* 70: 1093-1095.
- Ferreira LF, Brito C, Cardoso MA, Fernandes O, Reinhard K, Araújo A 2000. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop* 75: 79-84.
- Forattini OP 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saude Publica* 14: 265-299.
- Fournet A, Rojas de Arias A, Charles B, Bruneton J 1996. Chemical constituents of essential oils of muña, bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. *J Ethnopharmacol* 52: 145-149.

Freitas DRJ, Pohl PC, Vaz Jr. IS 2005. Characterization of acaricide resistance in *Boophilus microplus*. *Acta Sci Vet* 33: 109-117.

Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution. *Zootoxa* 202: 1-36.

Girón IG, Rocha DS, Lent H, Carcavallo RU, Jurberg J, Galvão C, Barbosa HS, Martinez A, Barata JMS, Rosa JA 1998. Estádios Ninfais. In R Carcavallo, I Galindez Girón, J Jurberg, H Lente (orgs), *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas na Américas* Vol. II, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 449-513.

Gonzalez MS, Azambuja P, Garcia ES 1998. Influência da regulação hormonal de Triatomíneos sobre o desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi*. In R Carcavallo, I Galindez Girón, J Jurberg, H Lente (orgs), *Atlas dos Vetores da Doença de Chagas na Américas*, Vol. II, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 665-707.

Guariento ME, Camilo MVF, Camargo AMA 1999. Working conditions of Chagas' disease patients in a large Brazilian city. *Cad Saude Publica* 15: 381-386.

Guarneri AA, Pinto CJC, Schofield CJ, Steindel M 1998. Population biology of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 273-276.

Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide AC 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4.000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 108: 401-407.

Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC, Cuba Cuba CA 2004. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Rev Ins Med Trop S Paulo* 46: 323-330.

Herrera L, D'andrea PS, Xavier SCC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM, 2005. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 379-388.

Ianni BM & Mady C 2005. The sugarcane juice was delicious, but... *Arq Bras Cardiol* 85: 6.

Kollien AH & Schaub GA 1998. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion by the starved vector. *Am J Trop Med Hyg* 59: 166-170.

Kroeger A, Villegas E, Ordo ez-González J, Pabon E, Scorza JV 2003. Prevention of the transmission of Chagas' disease with pyrethroid-impregnated materials. *Am J Trop Med Hyg* 68: 307-311.

Laurent D, Villaseca LA, Chantraine JM, Ballivian C, Saavedra G, Ibanez R 1997. Insecticidal activity of essential oils on *Triatoma infestans*. *Phytother Res* 11: 285-290.

Leitão GG, Simas NK, Soares SSV, Brito APP, Claros BMG, Brito TBM, Monache FD 1999. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. *J Ethnopharmacol* 65: 87-102.

Luz C, Fargues J, Grunewald J 1999. Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) under constant and cyclic conditions of temperature and humidity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 403-409.

Mesquita ML, Grellier P, Blond A, Brouard JP, de Paula JE, Espindola LS, Mambu L 2005a. New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity. *Bioorg Med Chem* 13: 4499-4506.

- Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, de Paula JE, Grellier P, Espindola LS 2005b. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 783-787.
- Mesquita ML, Grellier P, Mambu L, de Paula JE, Espindola LS 2007. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J Ethnopharmacol* 110: 165–170.
- Ministério da Saúde 2005. Doença de Chagas aguda relacionada à ingestão de caldo de cana. Nota técnica MS- 4/4.
- Moreira CJC & Spata MCD 2002. Dynamics of evolution and resistance to starvation of *Triatoma vitticeps* (Stal 1859) (Reduviidae: Triatominae), submitted to two different regimens of food deprivation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1049-1055.
- Nakagawa J, Rosales CC, Juárez J, Itzep C, Nonami T 2003. Impact of residual spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in the department of Zacapa in Guatemala. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 277-281.
- Nakata H, Hirakawa Y, Kawazoe M, Nakabo T, Arizono K, Abe S, Kitano T, Shimada H, Watanabe I, Ding X 2005. Concentrations and compositions of organochlorine contaminants in sediments, soils, crustaceans, fishes and birds collected from Lake Tai, Hangzhou Bay and Shanghai city region. *China. Environ Pollut* 133: 415–429.
- Napolitano DR, Mineo JR, Souza MA, de Paula JE, Espíndola LS, Espíndola FS 2005. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *J Ethnopharmacol* 99: 37–41.
- Neto HF, Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN 1995. Doença de Chagas – endêmica na Amazônia? *An Acad Med Pará* 6: 1-132.

OPAS 2006. Conclusiones, Recomendaciones y Decisiones. XVa Reunión de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la transmisión de Tripanosomiasis transfusional *INCOSUR-Chagas* 6–9.

Pereira JB, Castro JAF, Campos JHF, Nogueira JS, Zauza PL, Marques P, Cardoso MA, Brito C, Araujo AJG 2002. Estudo da infecção e morbidade da doença de Chagas no município de João Costa - Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 315-322.

Picollo MI, Vassena C, Orihuela PS, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E 2005. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol* 42: 637-642.

Reithinger R, Ceballos L, Stariolo R, Davies CR, Gurtler RE 2005. Chagas disease control: deltamethrin-treated collars reduce *Triatoma infestans* success on dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 502-508.

Rocha DS, Fonseca AD, Jurberg J, Galvão C 1997. Desenvolvimento de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 alimentado através de membrana de silicone e em camundongos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 553-558.

Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU, Presgrave OAF, Cunha V, Galvão C 2001. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento ninfal de *Rhodnius robustus*. *Rev Saude Publica* 35: 400-406

Rocha DS, Santos CM, Cunha V, Jurberg J, Galvão C 2004. Ciclo biológico em laboratório de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae),

potencial vetor silvestre da doença de Chagas na Amazônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 591-595.

Rodrigues AMS, de Paula JE, Roblot F, Fournet A, Espindola LS 2005. Larvicidal activity of *Cybistax antisyphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. *Fitoterapia* 76: 755-757.

Rodrigues AMS, de Paula JE, Degallier N, Molez JF, Espindola LS 2006. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 22: 314-317.

Rodrigues VEG & Carvalho DA 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciênc Agrotec* 25: 102-123.

Rojas de Arias A & Schmeda-Hirschmann G 1988. The effects of *Melia azederach* on *Triatoma infestans* bugs. *Fitoterapia* LIX: 148-149.

Rojas de Arias A, Ferro E, Inchausti A, Ascurra M, Acosta N, Rodriguez E, Fournet A 1995. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. *J Ethnopharmacol* 45: 35-41.

Rojas de Arias A, Lehane MJ, Schofield CJ, Maldonado M 2004. Pyrethroid insecticide evaluation on different house structures in a Chagas disease endemic area of the Paraguayan Chaco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 657-662.

Sarquis O, Sposina R, Oliveira TG, Mac Cord JR, Cabello PH, Pereira JB, Lima MM 2006. Aspects of peridomiciliary ecotopes in rural areas of Northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 143-147.

Schaub GA & Losch P 1988. *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol* 65: 174-186.

Schofield CJ & Dias JCP 1991. A cost-benefit of Chagas disease control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 285-295.

Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde 2005. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (Supl. III): 7-29.

Sílvori JL, Casabé N, Zerba EN, Wood EJ 1997. Induction of glutathione S-transferases activity in *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 797-802.

Souza CD & Felfili JM 2006. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot Bras* 20: 135-142.

Teixeira ARL, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L, Nascimento R, Vexenat CA, Silva AR, Ault SK, Costa JM 2001. Emerging Chagas disease: Trophic network and cycle of transmission *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Research* 7: 100-112.

Valente VC, Valente SAS, Carcavallo RU, Rocha DS, Galvão C, Jurberg J 2001. Considerações sobre uma nova espécie do gênero *Rhodnius* Stal, do estado do Pará, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 8: 65-80.

Vassena CV & Picollo MI 2003. Monitoreo de resistência a insecticidas em poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la Enfermedad de Chagas. *RETEL Rev Toxicol* 1-21.

Villela MM, Aleixo A, Souza JMB, Melo VP, Dias JCP 2006. Integral insecticide spraying followed by immediate triatomine research, as an additional strategy for the epidemiological surveillance of Chagas' disease, in areas of residual persisting foci. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 227-229.

Vinhaes MC & Dias JCP 2000. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saude Publica* 16 (Supl. 2): 7-12.

WHO 2005. Report of the scientific working group on Chagas disease. Argentina. *Who*: 1-4.

Woudneh MB & Oros DR 2006. Quantitative determination of pyrethroids, pyrethrins, and piperonyl butoxide in surface water by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 54: 6957-6962.

Xavier SCC, Vaz VC, D'Andrea PS, Herrera L, Emperaire L, Alves JR, Fernandes O, Ferreira LF, Jansen AM 2007. Mapping of the distribution of *Trypanosoma cruzi* infection among small wild mammals in a conservation unit and its surroundings (Northeast-Brazil). *Parasitol Int* 56: 119–128.

Xavier SS, Sousa AS, Viñas PA, Junqueira ACV, Bóia MN, Zicker F 1988. Chagas' disease and social security. A case-control study in an urban area, Goiás, Brazil. *Rev Saude Publica* 22: 281-287.

Yon CF, Balta RL, Garcia NA, Troyes MA, Cumpa HO, Valdivia A 2004. Susceptibilidad y resistência de *Triatoma infestans* y *Panstrongylus herreri* a los insecticidas piretroides, Peru 2001. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 21: 179-181.

Tabela I: Plantas do bioma Cerrado avaliadas quanto às suas atividades inseticidas e capacidade de atrasar o ciclo de desenvolvimento do inseto.

Família	Espécie	Nome popular	Nº de Herbário
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Aroeira-mansa	(UB) 3753
Apocynaceae	<i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	Peroba-do-campo	(UB) 3692
Bignoniaceae	<i>Cybistax antisyphilitica</i> (Mart.) Mart.	Caroba-brava	(UB) 3696
Clusiaceae	<i>Calophyllum brasiliensis</i> Comb.	Guanandi	(UB) 3754
	<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart.	Pau-santo	(UB) 3745
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassa</i> Nied.	Murici	(UB) 3743
Mimosaceae	<i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.	Tamboril	(UB) 3739
	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Covile	Barbatimão	(UB) 3740
Monimiaceae	<i>Siparuna cujabana</i> A. DC.	Pau-limão	(UB) 3737
	<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	Negramina	(UB) 3720
Rubiaceae	<i>Chomelia pohliana</i> M. Arg.	Limaorana	(UB) 3741
	<i>Palicourea rigida</i> H.B.K.	Congonha-dourada	(UB) 3661
	<i>Sabicea brasiliensis</i> Wernham.	Sangue-de-cristo	(UB) 3695
Vochysiaceae	<i>Qualea grandiflora</i> Mart.	Pau-terra	(UB) 3695
Zingiberaceae	<i>Renanthera alpinia</i> (Rottb.) Maas.	Paco-seroca	(UB) 3719

Tabela II: Ciclo do desenvolvimento biológico de *R. milesi* em laboratório à temperatura de 24 ± 5 °C e umidade relativa $75 \pm 18\%$, alimentados semanalmente em galinha

Estádio	n	Min.	Max.	X \pm S
Ovo – N1	223	9	19	15 \pm 2,7
N1 – N2	162	14	19	17,2 \pm 4,1
N2 – N3	154	13	28	18,2 \pm 3,8
N3 – N4	147	14	25	17,3 \pm 2,4
N4 – N5	143	16	28	20,5 \pm 4,7
N5 – Adultos	141	28	42	32,5 \pm 3,0

n: número de ovos ou insetos; N1: ninfas de 1° estágio; N2: ninfas de 2° estágio; N3: ninfas de 3° estágio; N4: ninfas de 4° estágio; N5 ninfas de 5° estágio, Min.: período mínimo em dias; Max.: período máximo em dias; X: média; S: desvio padrão

Tabela III: Número de repastos sanguíneos em cada fase de desenvolvimento ninfal do *R. milesi*

Estádio	n	Min.	Max.	X \pm S
N1	162	1	1	1 \pm 0
N2	154	1	2	1,5 \pm 0,5
N3	147	1	2	1,3 \pm 0,5
N4	143	1	2	1,3 \pm 0,5
N5	141	1	2	1,3 \pm 0,5

n: número de insetos; N1: ninfas de 1° estágio; N2: ninfas de 2° estágio; N3: ninfas de 3° estágio; N4: ninfas de 4° estágio; N5: ninfas de 5° estágio; X: média; S: desvio padrão

Tabela IV: Atividade inseticida de extratos de plantas do Cerrado sobre ninfas de 4º estágio (n = 40) de *R. milesi*

Família	<i>Espécie</i>	Órgão / Solvente	Tempo em dias / % de mortalidade**									
			1	2	3	7	14	21	28	CP1	CP2	CN
Anacardiaceae												
	<i>S. terebinthifolius</i>	F / H	0	0	0	0	10	12,5	12,5	10	-	2,5
		F / D	0	0	0	2,5	5	5	5	10	-	2,5
		C / D	0	0	2,5	2,5	5	5	7,5	10	-	2,5
		RM / H	7,5	7,5	7,5	15	20	20	*20	2,5	-	22,5
		C / H	2,5	2,5	2,5	2,5	12,5	12,5	*15	2,5	-	22,5
Apocynaceae												
	<i>A. tomentosum</i>	CM / D	2,5	2,5	2,5	5	12,5	12,5	12,5	5	-	10
Bignoniaceae												
	<i>C. antisiphilitica</i>	CM / H	0	0	0	2,5	2,5	7,5	7,5	5	-	10
Clusiaceae												
	<i>C. brasilienses</i>	F / H	0	0	0	2,5	2,5	7,5	7,5	15	-	10
		F / D	2,5	5	5	5	5	10	12,5	15	-	10
		CM / H	0	0	0	0	2,5	5	5	2,5	-	22,5
		R / H	2,5	2,5	2,5	2,5	5	5	7,5	2,5	-	22,5
		CC / SH	2,5	2,5	2,5	5	10	10	10	-	5	10
	<i>K. coriacea</i>	F / H	0	0	0	7,5	7,5	12,5	12,5	15	-	10
		F / D	0	2,5	2,5	2,5	2,5	5	5	10	-	2,5
		CC / H	0	0	0	2,5	7,5	7,5	7,5	2,5	-	22,5
		CM / H	0	0	0	0	15	17,5	*20	2,5	-	22,5
		RM / H	0	0	0	0	5	7,5	10	2,5	-	22,5

Família	<i>Espécie</i>	Órgão / Solvente	Tempo em dias / % de mortalidade**								CP1	CP2	CN
			1	2	3	7	14	21	28				
Malpighiaceae													
	<i>B. crassa</i>	F / H	0	0	0	0	0	0	0	10	-	2,5	
		F / H	0	0	2,5	7,5	12,5	15	*15	2,5	-	2,5	
		F / D	0	0	2,5	2,5	2,5	7,5	7,5	10	-	2,5	
		F / D	2,5	2,5	2,5	2,5	5	5	5	2,5	-	2,5	
		F / SH	2,5	7,5	7,5	12,5	15	22,5	*25	-	20	10	
Mimosaceae													
	<i>E. ellipticum</i>	F / H	0	0	0	0	0	0	0	10	-	2,5	
		F / D	0	0	0	0	0	2,5	5	10	-	2,5	
		RM / H	0	0	2,5	2,5	2,5	7,5	7,5	2,5	-	22,5	
		C / D	2,5	5	5	5	15	17,5	*17,5	2,5	-	22,5	
		F / SH	2,5	7,5	12,5	25	30	32,5	32,5	-	27,5	22,5	
	<i>S. adstringens</i>	F / D	0	0	0	0	0	0	0	10	-	2,5	
		F / H	0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	10	-	2,5	
		CM / D	0	0	0	0	2,5	2,5	2,5	5	-	10	
Monimiaceae													
	<i>S. cujabana</i>	F / H	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	5	5	0	-	2,5	
		C / H	0	0	0	0	5	7,5	7,5	0	-	2,5	
		R / H	0	0	0	0	0	2,5	2,5	0	-	2,5	
		Fr / H	0	0	2,5	2,5	2,5	2,5	5	0	-	2,5	
		R / E	2,5	2,5	7,5	25	25	25	27,5	-	27,5	22,5	
		F / E	2,5	7,5	7,5	15	15	15	20	-	20	10	
		C / E	2,5	5	5	15	25	32,5	*32,5	-	20	10	
		Fr / E	0	0	5	10	12,5	15	17,5	-	20	10	

Família		Tempo em dias / % de mortalidade**									
<i>Espécie</i>	Órgão / Solvente	1	2	3	7	14	21	28	CP1	CP2	CN
<i>S. guianensis</i>	F / H	2,5	2,5	2,5	7,5	10	15	*15	0	-	2,5
	CC / H	0	0	2,5	2,5	2,5	5	5	0	-	2,5
	CC / E	2,5	10	12,5	35	35	40	*42,5	-	27,5	22,5
	CM / H	0	0	0	0	2,5	7,5	7,5	0	-	2,5
	F / E	0	5	7,5	17,5	22,5	25	25	-	27,5	22,5
Rubiaceae											
<i>C. pohliana</i>	F / D	5	5	5	5	10	10	10	2,5	-	2,5
	CM / D	0	0	0	0	2,5	2,5	2,5	2,5	-	2,5
	C / H	5	5	5	5	5	5	7,5	0	-	2,5
	R / H	0	0	0	0	0	0	0	0	-	2,5
	C / D	2,5	5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	0	-	2,5
	R / D	0	5	7,5	7,5	7,5	10	*12,5	0	-	2,5
<i>P. rigida</i>	F / H	5	5	5	7,5	10	10	*12,5	2,5	-	2,5
	F / H	7,5	7,5	7,5	15	15	15	*15	2,5	-	2,5
	F / D	2,5	2,5	2,5	5	7,5	10	10	2,5	-	2,5
<i>S. brasiliensis</i>	R / H	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0	-	2,5
	Fr / H	0	0	0	0	2,5	5	5	0	-	2,5
	Fr / E	12,5	17,5	17,5	20	27,5	30	32,5	-	27,5	22,5
	R / E	0	0	0	7,5	12,5	17,5	20	-	20	10
Vochysiaceae											
<i>Q. grandiflora</i>	CM / H	2,5	2,5	2,5	5	10	10	10	15	-	10
	F / H	0	2,5	2,5	2,5	2,5	10	10	10	-	2,5

Família	Espécie	Órgão / Solvente	Tempo em dias / % de mortalidade									
			1	2	3	7	14	21	28	CP1	CP2	CN
Vochysiaceae												
<i>Q. grandiflora</i>												
		F / D	0	0	0	0	2,5	5	5	10	-	2,5
		R / H	5	5	7,5	12,5	12,5	12,5	*12,5	0	-	2,5
		CC / H	5	5	5	5	10	12,5	12,5	2,5	-	22,5
		C / D	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	5	2,5	-	22,5
		CM / D	10	12,5	12,5	12,5	17,5	20	*22,5	2,5	-	22,5
		F / SH	5	12,5	12,5	17,5	25	27,5	30	-	27,5	22,5
Zingiberaceae												
<i>R. alpinia</i>												
		F / H	0	0	0	10	15	17,5	*17,5	2,5	-	2,5
		RZ / D	0	0	0	0	0	0	0	5	-	10
		F / E	0	0	2,5	7,5	10	10	12,5	-	20	10

* $p < 0,05$, estatisticamente significante quando comparados com os controles, teste Q de Cochran. C: Caule (madeira+casca); CM: Madeira do caule; CC: Casca do caule; F: Folha; Fr: Fruto; R: Raiz (madeira + casca); RM: Madeira raiz; RZ: Rizoma. H: Hexano; D: Diclorometano; E: Etanol; SH: Solução hidroalcoólica (água 90%:etanol 10%). CP1: Controle acetona; CP2: Controle etanol; CN: Controle negativo - sem tratamento; ** soma cumulativa do percentual de morte. -: não testado

Tabela V: Atividade inseticida das fases oriundas dos extratos ativos sobre ninfas de 4º estágio (n=60) de *R. milesi* topicamente tratadas

Família	Extrato bruto		Tempo em dias / % de mortalidade**							Controles			
	Espécie	Órgão / Solvente	Fase	1	2	3	7	14	21	28	CP1	CP2	CN
Anacardiaceae													
<i>S. terebinthifolius</i>	RM / H	Act	0	0	1,7	1,7	3,3	5	5	-	1,7	1,7	
		M	0	1,7	1,7	3,3	3,3	3,3	3,3	-	0	0	
Malpighiaceae													
<i>B. crassa</i>	F / H	H	0	0	1,7	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	0	-	1,7
		Act	0	0	0	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	-	1,7	1,7
		M	0	0	0	1,7	1,7	3,3	5	-	1,7	1,7	
Monimiaceae													
<i>S. guianensis</i>	F / E	H	1,7	15	15	15	18,3	18,3	*18,3	0	-	1,7	
		Act	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	5	-	1,7	1,7	
		M	0	1,7	1,7	6,7	6,7	8,3	*8,3	-	0	0	
	CC / E	H	1,7	1,7	3,3	3,3	3,3	5	5	0	-	1,7	
		Act	0	0	0	0	0	1,7	1,7	-	1,7	1,7	
		M	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	
	F / H	H	0	3,3	3,3	3,3	3,3	6,7	*6,7	1,7	-	0	
		Act	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	
		M	1,7	3,3	5	5	5	5	5	-	0	0	
<i>S. cujabana</i>	C / E	H	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1,7	
		Act	0	0	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	-	0	0	
		M	0	1,7	1,7	3,3	3,3	5	5	1,7	1,7	0	

Família	Espécie	Extrato bruto Órgão / Solvente	Fase	Tempo em dias / % de mortalidade**						Controles			
				1	2	3	7	14	21	28	CP1	CP2	CN
Rubiaceae													
	<i>S. brasiliensis</i>	Fr / E	H	1,7	1,7	1,7	1,7	3,3	3,3	3,3	0	-	1,7
			Act	0	0	0	1,7	1,7	1,7	1,7	-	0	0
			M	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	6,7	*6,7	-	1,7	0
Vochysiaceae													
	<i>Q. grandiflora</i>	CM / D	H	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	3,3	0	-	1,7
			Act	1,7	3,3	5	5	5	6,7	*8,3	-	0	0
			M	1,7	1,7	1,7	3,3	3,3	3,3	3,3	-	1,7	0
Zingiberaceae													
	<i>R. alpinia</i>	F / H	H	3,3	3,3	3,3	5	5	5	5	0	-	1,7
			Act	0	0	0	0	0	0	0	-	1,7	1,7
			M	0	0	0	0	0	1,7	1,7	-	1,7	1,7

* $p < 0,05$ estatisticamente significativo quando comparados com os controles, teste Q de Cochran. C: Caule (madeira + casca); CM: Madeira do caule; CC: Casca caule; F: Folha; Fr: Fruto; RM: Madeira da raiz. H: Hexano; Act: Acetonitrila; M: Metanol; E: Etanol. CP1: Controle acetona; CP2: Controle etanol; CN: Controle negativo – sem tratamento; ** soma cumulativa do percentual de morte. -: não testado.

Tabela VI: *Siparuna guianensis*: Grupos resultantes do processo cromatográfico da fase hexânica do extrato etanólico da folha de *S. guianensis*

Grupos	Frações	Eluente (%)	Massa (g)	Rendimento (%)
G1	F 1-9	Ch (100)	0,12	1,8
G2	F 10-20	Ch (100)	0,04	0,6
G3	F 21-33	Ch (100)	0,32	4,9
G4	F 34-70	Ch (100)	0,27	4,2
G5	F 71-80	Ch (100); Ch:AcEt (98:2)	0,09	1,4
G6	F 81-83	Ch:AcEt (98:2)	0,42	6,5
G7	F 84-85	Ch:AcEt (98:2)	0,09	1,4
G8	F 86-88	Ch:AcEt (98:2)	0,22	3,4
G9	F 89-110	Ch:AcEt (98:2)	0,86	13,2
G10	F 111-120	Ch:AcEt (98:2, 95:5)	0,39	6,0
G11	F 121-154	Ch:AcEt (95:5)	0,54	8,3
G12	F 155-214	Ch:AcEt (90:10, 85:15 e 70:30)	2,3	35,4
G13	F 215-230	Ch:AcEt (70:30, 50:50)	0,17	2,6
G14	F 231-240	Ch:AcEt (50:50)	0,15	2,3
G15	F 241-281	Ch:AcEt (30:70); AcEt (100)	0,19	2,9
G16	F M	M (100)	0,29	4,5

G: Grupo, F: Frações, Ch: Ciclohexano, AcEt: Acetato de etila, M: Metanol

Tabela VII: *Siparuna guianensis*: Atividade inseticida dos Grupos obtidos a partir do processo cromatográfico da fase hexânica do extrato etanólico da folha de *S. guianensis* sobre ninfas de 4º estágio (n = 60) de *R. milesi*

Grupos	Tempo em dias / % de mortalidade						
	1	2	3	7	14	21	28
G1	0	0	0	0	0	0	0
G2	0	0	0	0	0	0	0
G3	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
G4	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	3,3	3,3
G5	-	-	-	-	-	-	-
G6	0	1,7	1,7	5	5	6,7	6,7
G7	0	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
G8	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
G9	0	0	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
G10	0	0	0	0	0	0	0
G11	0	0	0	0	0	0	0
G12	0	0	0	1,7	1,7	1,7	1,7
G13	0	0	0	0	0	0	0
G14	0	0	0	0	0	0	0
G15	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	3,3	3,3
G16	0	3,3	3,3	3,3	3,3	5	5
CP2	0	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
CN	0	0	0	0	0	1,7	1,7

G: Grupo; CP2: Controle etanol; CN: Controle negativo – sem tratamento; -: não testado. Obs.: para a realização dos testes, todos os grupos foram solubilizados em etanol, portanto o controle acetona (CP1) não foi necessário.

Tabela VIII: Capacidade dos extratos vegetais em atrasar o ciclo de desenvolvimento de ninfas de 4º estágio de *R. milesi* no período de 28 dias, em porcentagem

Família	Espécie	Extrato bruto Órgão / solvente	n	% de inibição	Controles		
					CP1	CP2	CN
Anacardiaceae							
	<i>S. terebinthifolius</i>	F / D	38	42,1*	0	-	0
		F / H	35	17,1*	0	-	0
		C / D	38	0	0	-	0
		RM / H	33	0	5,1	-	3,3
		R / H	34	0	5,1	-	3,3
Apocynaceae							
	<i>A. tomentosum</i>	CM / D	35	80	100	92,1	92
Bignoniaceae							
	<i>C. antisiphilitica</i>	CM / H	37	89,2	100	92,1	92
Clusiaceae							
	<i>C. brasilienses</i>	CM / H	38	0	5,1	-	3,3
		R / H	38	0	5,1	-	3,3
		F / H	37	2,7	3	-	5,3
		CC / SH	36	97,2	-	92,1	92
	<i>K. coriacea</i>	F / D	35	5,7	3	-	5,3
		F / H	35	2,9	3	-	5,3
		F / D	38	0	0	-	0
		CC / H	38	5,3	5,1	-	3,3
		CM / H	34	0	5,1	-	3,3
		RM / H	37	0	5,1	-	3,3
Malpighiaceae							
	<i>B. crassa</i>	F / SH	30	66,7*	-	50	36
		F / H	35	0	2,6	-	0
		F / D	38	0	2,6	-	0
		F / D	37	0	0	-	0
		F / H	40	0	0	-	0
Mimosaceae							
	<i>E. ellipticum</i>	C / D	33	0	5,1	-	3,3
		F / SH	27	29,6	-	34,5	32
		F / D	39	0	0	-	0
		F / H	40	0	0	-	0
		RM / H	38	0	5,1	-	3,3
	<i>S. adstringens</i>	CM / D	39	89,7	100	-	92
		F / H	39	2,6	0	-	0
		F / D	40	0	0	-	0
Monimiaceae							
	<i>S. cujabana</i>	F / H	38	0	0	-	0
		C / H	39	2,6	0	-	0

Família Espécie	Extrato bruto Órgão / solvente	n	% de inibição	Controles			
				CP1	CP2	CN	
<i>S. cujabana</i>	R / H	40	0	0	-	0	
	Fr / H	38	0	0	-	0	
	C / E	27	44,4	-	50	36	
	Fr / E	33	45,5	-	50	36	
	F / E	32	40,6	-	50	36	
	<i>S. guianensis</i>	CC / H	38	0	0	-	0
		CM / H	39	0	0	-	0
		R / E	29	27,6	-	34,5	32
		F / E	30	23,3	-	34,5	32
		F / H	34	0	0	-	0
	CC / E	23	21,7	-	34,5	32	
Rubiaceae							
<i>C. pohliana</i>	F / D	36	0	2,6	-	0	
	CM / D	39	0	2,6	-	0	
	F / H	36	0	2,6	-	0	
	R / H	38	0	0	-	0	
	R / H	40	0	0	-	0	
	C / D	34	0	0	-	0	
	R / D	37	0	0	-	0	
<i>P. rigida</i>	F / D	37	0	2,6	-	0	
	F / H	34	0	2,6	-	0	
<i>S. brasiliensis</i>	R / E	32	65,6*	-	50	36	
	R / H	39	0	0	-	0	
	Fr / H	38	0	0	-	0	
	Fr / E	27	22,2	-	34,5	32	
Vochysiaceae							
<i>Q. grandiflora</i>	F / H	36	0	0	-	0	
	F / D	38	0	0	-	0	
	F / SH	28	35,7	-	34,5	32	
	CM / D	32	3,1	5,1	-	3,3	
	C / D	38	7,9	5,1	-	3,3	
	CC / H	35	0	5,1	-	3,3	
	R / H	35	0	0	-	0	
	CM / H	36	2,8	3	-	5,3	
Zingiberaceae							
<i>R. alpinia</i>	F / E	35	60*	-	50	36	
	RZ / D	40	87,5	100	-	92	
	F / H	33	0	2,6	-	0	

*p<0,05 quando comparado com os controles, teste Q de Cochran; n: n° da amostra; C: Caule (madeira+casca); CM: Madeira do caule; CC: Casca do caule; F: Folha; Fr: Fruto; R: Raiz (madeira + casca); RM: Madeira da raiz; RZ: Rizoma. H: Hexano; D: Diclorometano; E: Etanol; SH: Solução hidroalcoólica (água 90%:etanol 10%). CP1: Controle acetona; CP2: Controle etanol; CN: Controle negativo – sem tratamento. -: não testado.

Tabela IX: Capacidade das fases oriundas das partições dos extratos ativos em atrasar o ciclo de desenvolvimento de ninfas de 4º estágio de *R. milesi* no período de 28 dias, em porcentagem

Família Espécie	Extrato bruto Órgão/ solvente	Fase	n	% de inibição	Controles		
					CP1	CP2	CN
Anacardiaceae							
<i>S. terebinthifolius</i>	RM / H	Act	57	1,8	0	-	0
		M	58	1,7	-	3,3	0
Malpighiaceae							
<i>B. crassa</i>	F / H	H	58	0	0	-	0
		Act	59	0	0	-	0
		M	58	0	0	-	0
Monimiaceae							
<i>S. cujabana</i>	C / E	H	60	0	0	-	0
		Act	59	0	-	3,3	0
		M	57	0	1,7	0	0
<i>S. guianensis</i>	CC / E	H	57	0	0	-	0
		M	60	1,7	-	3,3	0
		Act	59	6,8*	0	-	0
	F / H	H	56	0	1,7	0	0
		Act	60	3,3	-	3,3	0
		M	57	1,8	-	3,3	0
	F / E	H	49	0	0	-	0
		Act	59	1,7	0	-	0
		M	55	0	-	3,3	0
Rubiaceae							
<i>S. brasiliensis</i>	Fr / E	H	58	0	0	-	0
		Act	59	1,7	-	3,3	0
		M	57	0	1,7	0	0
Vochysiaceae							
<i>Q. grandiflora</i>	CM / D	H	59	0	0	-	0
		Act	55	0	-	3,3	0
		M	60	0	1,7	0	0
Zingiberaceae							
<i>R. alpinia</i>	F / H	H	57	0	0	-	0
		Act	60	0	0	-	0
	F / H	M	59	0	0	-	0

* $p < 0,05$ quando comparado com os controles, teste Q de Cochran; C: Caule (madeira + casca); CM: Madeira do caule; CC: Casca do caule; F: Folha; Fr: Fruto; RM: Madeira da raiz. H: Hexano; Act: Acetonitrila; M: Metanol; E: Etanol; CP1: Controle acetona; CP2: Controle etanol; CN: Controle negativo – sem tratamento. -: não testado

Tabela X: *Siparuna guianensis*: Capacidade dos Grupos (G) obtidos do fracionamento da fase hexânica do extrato etanólico da folha em atrasar o ciclo de desenvolvimento de ninfas de 4º estágio de *R. milesi* no período de 28 dias, em porcentagem

Grupos	n	% inibição da ecdise
G1	60	0
G2	60	0
G3	60	0
G4	59	2
G5	-	-
G6	58	3
G7	60	0
G8	59	2
G9	59	2
G10	59	2
G11	60	0
G12	60	0
G13	60	0
G14	60	0
G15	59	2
G16	60	0
CP2	60	0
CN	60	0

G: grupo; n: número de insetos; CP2: Controle etanol; CN: Controle negativo - sem tratamento; - não testado. Obs.: para a realização dos testes, todos os grupos foram solubilizados em etanol, portanto o controle acetona (CP1) não foi necessário.



A



B



C



D



E



F



G



H

Figura 1: Processo de produção dos extratos – A: coleta; B: dessecação e estabilização; C: órgão vegetal pulverizado; D: maceração; E: obtenção da solução extrativa; F: concentração; G: dessecação; H: extrato bruto



Figura 2: Aplicação tópica das amostras nos tergitos abdominais de ninfas de 4º estágio de *R. miles*.



Figura 3: Partição líquido-líquido dos extratos ativos: sistema de eluentes: Hexano: Acetonitrila ou Hexano:Metanol - (3:1)



Figura 4: *Siparuna guianensis*: Coluna cromatográfica aberta de sílica gel da fase ativa, oriunda da partição líquido-líquido do extrato: sistema de eluentes: Ciclohexano:Acetato de etila:Metanol

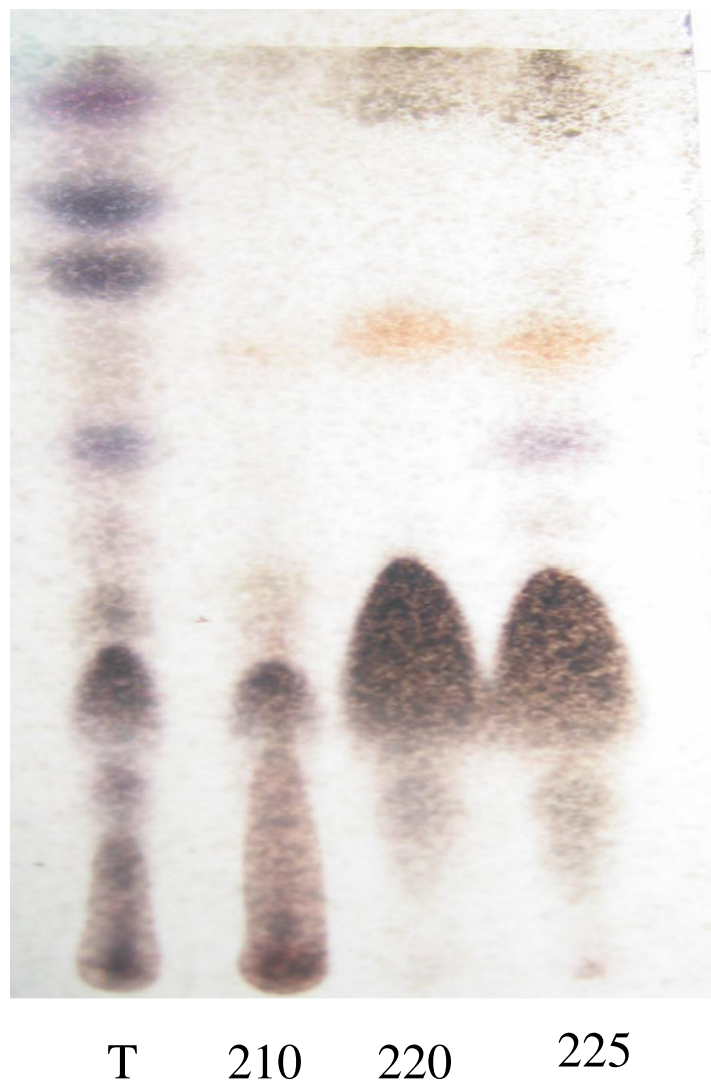


Figura 5: *Siparuna guianensis*: Cromatografia em camada delgada (CCD). T: material de partida; 210, 220, 225: frações. Sistema de eluente: Hexano:Acetato de etila (80:20). Revelador: vanilina sulfúrica

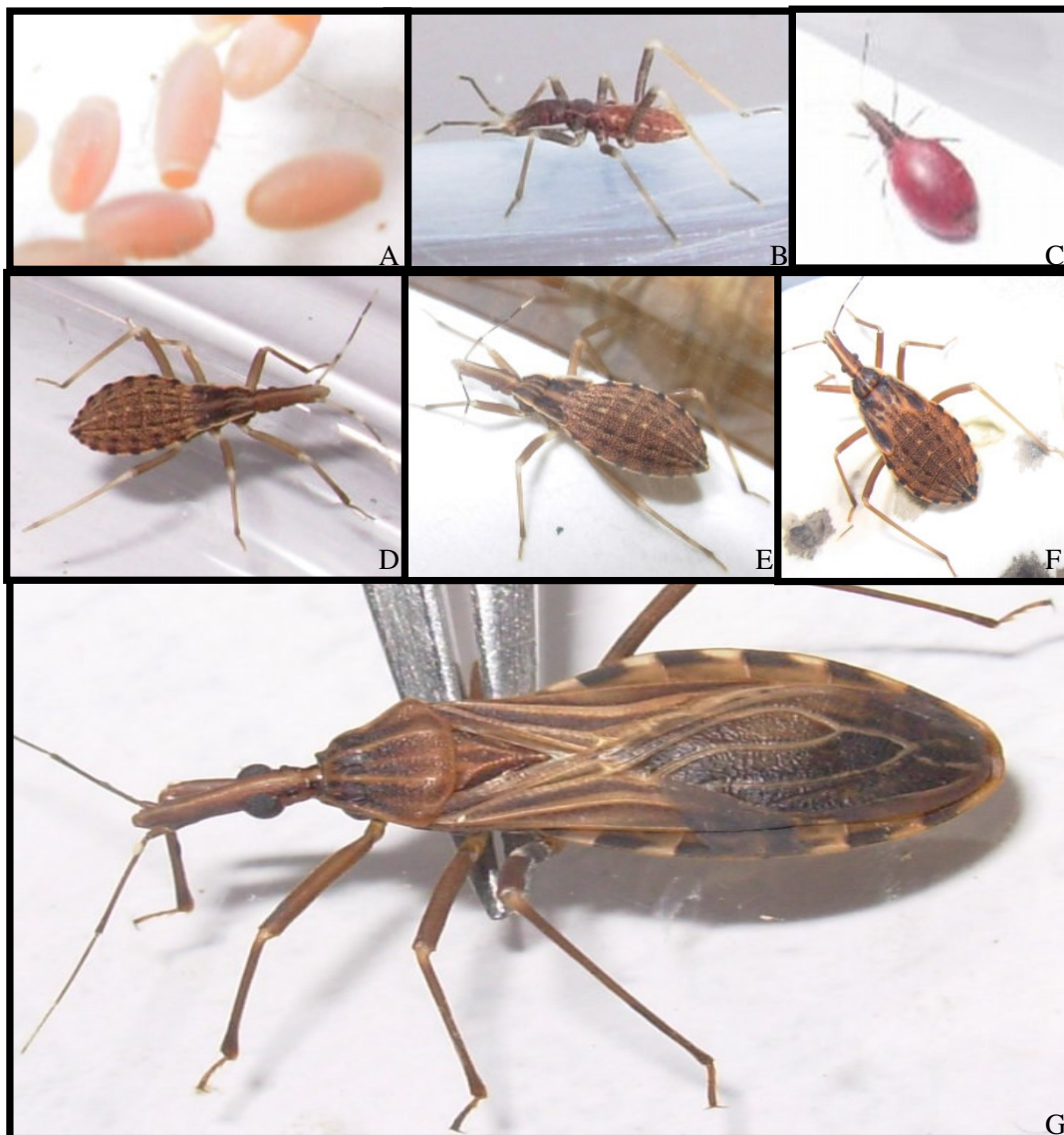


Figura 6: Diferentes fases do ciclo de desenvolvimento de *R. miles* – A: Ovos; B: ninfa de 1º estágio; C: ninfa de 2º estágio alimentada; D: ninfa de 3º estágio; E: ninfa de 4º estágio; F: ninfa de 5º estágio e G: inseto adulto.

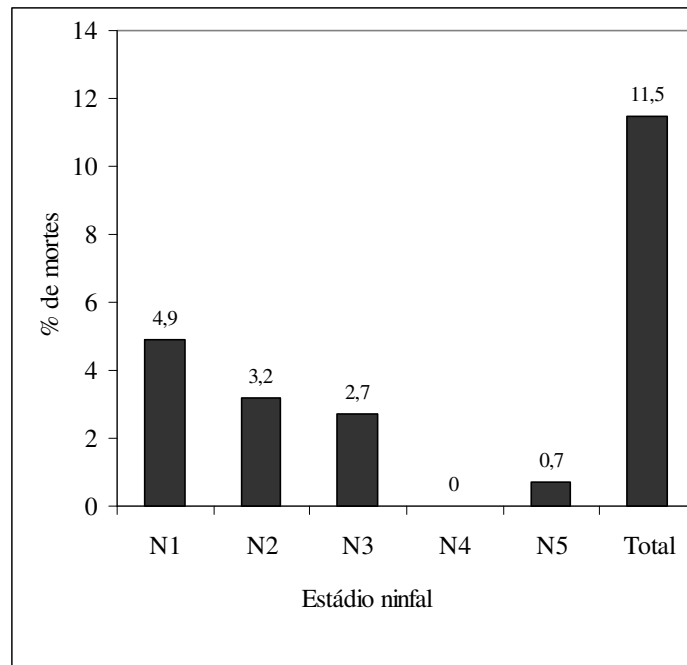


Figura 7: Percentual de mortalidade em cada estágio de desenvolvimento de *R. milesi*; N1: ninfa de primeiro estágio, N2: ninfa de segundo estágio, N3: ninfa de terceiro estágio, N4: ninfa de quarto estágio, N5: ninfa de quinto estágio



Figura 8: *Siparuna guianensis*: Cromatografia em camada delgada dos grupos G3, G4, G5, G6, G7, G8 e G9. C: ciclohexano; D: diclorometano. Revelador: vanilina sulfúrica

Anexo A: Ficha de avaliação do ciclo biológico de *Rhodnius milesi*

UnB (Faculdade de Medicina / Saúde) - Anexo do Laboratório de Farmacognosia: Ciclo de desenvolvimento de *R. milesi*

Pote = ninfas de ----- estágio (N)

Dias	Data	Alimentação	Morte	Muda	Observações
0					
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					

Anexo B: Ficha de monitoramento da temperatura e umidade da sala de criação dos triatomíneos

Mês:		Hora do dia	Dentro da estante de criação em 24 horas			Sala de criação		Observações
Data	Hora	T °C/UR%	T °C/UR% max	T °C/UR% min	T °F	T °F max	T °F min	

T °C max/min: temperatura em grau Celsius máximo/mínimo; UR%: % de umidade relativa, T °F: temperatura em grau Fahrenheit

Anexo C: Ficha de avaliação dos resultados da atividade inseticida e capacidade de atrasar o ciclo de desenvolvimento do inseto de amostras aplicadas topicamente sobre ninfas de 4º estágio de *R. milesi* no período de 28 dias

Laboratório de Farmacognosia - N° do teste:							
Mês:			Amostra I		Amostra II		Observações
Tempo	N° Identificação	Data	morte	muda	morte	muda	
24 horas							
48 horas							
72 horas							
4 dias							
5 dias							
6 dias							
7 dias							
8 dias							
9 dias							
10 dias							
11 dias							
12 dias							
13 dias							
14 dias							
15 dias							
16 dias							
17 dias							
18 dias							
19 dias							
20 dias							
21 dias							
22 dias							
23 dias							
24 dias							
25 dias							
26 dias							
27 dias							
28 dias							

Anexo D: Ficha de avaliação dos controles durante a realização dos testes tóxico com as amostras sobre ninfas de 4º estágio de *R. milesi* no período de 28 dias

Laboratório de Farmacognosia - N° dos controles:										
Mês:		CP1 ou CP2 (I)		CP1 ou CP2 (II)		CN (1)		CN (2)		Observações
Tempo	Data	morte	muda	morte	muda	morte	muda	morte	muda	
24 horas										
48 horas										
72 horas										
4 dias										
5 dias										
6 dias										
7 dias										
8 dias										
9 dias										
10 dias										
11 dias										
12 dias										
13 dias										
14 dias										
15 dias										
16 dias										
17 dias										
18 dias										
19 dias										
20 dias										
21 dias										
22 dias										
23 dias										
24 dias										
25 dias										
26 dias										
27 dias										
28 dias										

CP1 ou CP2 (I e II): Controle acetona ou etanol (Amostras I e II); CN (1 e 2): controle negativo - sem tratamento (Amostras I e II)