

*Campus Realengo*

Curso de Graduação em Farmácia

Thiago Silva do Nascimento

**INVESTIGAÇÃO DE QUITINA NA  
MEMBRANA PERIMICROVILAR DE  
*RHODNIUS PROLIXUS*, INSETO  
VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS**

Rio de Janeiro

2022

THIAGO SILVA DO NASCIMENTO

**INVESTIGAÇÃO DE QUITINA NA MEMBRANA PERIMICROVILAR DE  
*RHODNIUS PROLIXUS*, INSETO VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao IFRJ/campus Realengo, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Camila Alves Bandeira Falcão  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

Rio de Janeiro  
2022

CIP - Catalogação na Publicação  
Bibliotecária: Alane Elias Souza – CRB7 6321

**N244i** Nascimento, Thiago Silva do  
Investigação de quitina na membrana perimicrovilar de *Rhodnius prolixus*, inseto vetor da Doença de Chagas / Thiago Silva do Nascimento  
- Rio de Janeiro, RJ, 2022.  
65 f. : il. ; 30 cm.

Orientação: Camila Alves Bandeira Falcão.  
Coorientação: Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação), Bacharelado em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Realengo, 2022.

1. Quitina. 2. Membrana Perimicrovilar. 3. *Rhodnius prolixus*. 4. Doença de Chagas. I. Falcão, Camila Alves Bandeira, orient. II. Cardoso, Mônica Ferreira Moreira Carvalho, coorient. III. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. IV. Título

CDU 615

THIAGO SILVA DO NASCIMENTO

**INVESTIGAÇÃO DE QUITINA NA MEMBRANA PERIMICROVILAR DE  
*RHODNIUS PROLIXUS*, INSETO VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS.**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao IFRJ/campus Realengo,  
como parte dos requisitos necessários para a  
obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Data da aprovação: 25/ 07 / 2022

Banca Examinadora:



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Camila Alves Bandeira Falcão (Orientadora)

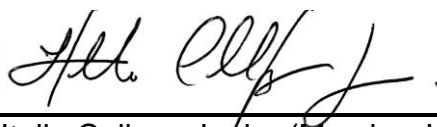
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ)



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso (Orientadora)

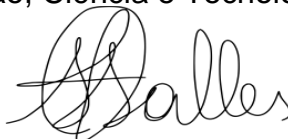
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)



---

Prof. Dr. Itallo Collopy Junior (Membro Interno)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ)



---

Dr. Tiago Souza Salles (Membro Externo)

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2022

Dedico este trabalho a todos que acreditaram na minha trajetória e foram facilitadores nessa jornada. Em especial meus pais André e Ana e meus avós João e Luzinete.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu maior orientador, por me sustentar e dar forças para continuar apesar de todas as adversidades, Aquele que sempre esteve ao meu lado nos dias mais difíceis e momentos mais felizes. Se cheguei até aqui foi por permissão e vontade d'Ele, por toda misericórdia, amor e graça.

Ao meu pai, exemplo de vida em bravura, esforço, dedicação e empenho, muito obrigado por tudo que fez e faz por mim e à minha mãe por todo apoio, carinho e orações, ao meu querido primo Anderson e aos avós João Honorato e Luzinete, além de toda minha família e parentes que me apoiaram e torceram por mim. Amo vocês.

Aos amigos que adquiri graças ao IFRJ, que se mostraram anjos na minha vida acadêmica, sempre me apoiando e me dando esperança de dias melhores e a todos os demais amigos que tive o prazer de conviver e evoluir junto, meus mais sinceros agradecimentos.

Agradeço à minha querida orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica e todos meus colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Vetores da UFRJ, por toda parceria, aprendizado, risadas e evolução acadêmica.

Agradeço especialmente aos meus amados professores, que me mostraram que a docência é mais do que uma profissão, é um dom: Camilla Bandeira, Itallo Collopy Jr., Murilo Marinho, Leda Glicério, Ana Ribeiro, Débora Rama, Paula Maciel e todos os demais professores do IFRJ Campus Realengo.

Agradeço também ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica e à FAPERJ que tornaram possível a realização do projeto e à equipe do Laboratório de Bioquímica de Lipídios e Lipoproteínas do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, especialmente à Prof<sup>a</sup>. Dra. Geórgia Correa Atella e às equipes do Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas (LAMMP) e Laboratório de Tecnologia Enzimática (ENZITEC) do Instituto de Química da UFRJ.

Para finalizar, agradeço a todos que fizeram parte dessa caminhada e tornaram este trabalho possível, seja direta ou indiretamente.

"Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte em  
defesa da vida."  
- Carlos Chagas

NASCIMENTO, Thiago Silva. Investigação de quitina na membrana perimicrovilar de *Rhodnius prolixus*, inseto vetor da Doença de Chagas. – 65 p. Trabalho de conclusão de curso. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2022.

## RESUMO

Tripanossomíase americana ou Doença de Chagas é uma doença negligenciada e um de seus principais vetores é o *Rhodnius prolixus*. O agente etiológico da doença é o *Trypanossoma cruzi* que se aloja e se diferencia dentro do intestino do vetor. No intestino do vetor existe uma membrana denominada Membrana Perimicrovilar (MPM), que recobre as microvilosidades intestinais e está envolvida com os processos de digestão do inseto, diferenciação do parasito e outras funções ainda desconhecidas. A composição da MPM é parcialmente conhecida, a molécula de quitina, apesar de identificada no intestino, ainda não foi associada à MPM, à semelhança com o que ocorre com a matriz peritrófica em outros insetos. Vale destacar a importância biotecnológica da molécula de quitina, que é o segundo biopolissacarídeo mais abundante presente na Terra, com potencial para substituir polissacarídeos sintéticos por ser biocompatível, biodegradável, não causando danos ao meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi investigar a existência de quitina na MPM de *R. prolixus* em ninfas de 5<sup>o</sup> estágio do inseto, as quais foram alimentadas com sangue, no 10<sup>o</sup> dia e nos dias de 15 a 18 após à alimentação o conteúdo luminal foi coletado e submetido ao tratamento com a enzima papaína para a digestão de proteínas. Em seguida a extração de lipídeos foi feita e o tratamento com hidróxido de potássio (KOH) 10 M à quente e por fim foi feito o clareamento do material com ácido clorídrico (HCl) e acetona. Em seguida o material foi lavado com água e seco. Este material foi submetido à espectroscopia no infravermelho em comparação com a quitina comercial. A detecção de quitina foi feita com aglutinina de gérmen de trigo ligada a isotiocianato de fluoresceína (WGA-FITC) por microscopia de fluorescência. A técnica utilizada para separar o conteúdo luminal e a MPM foi a ultracentrifugação em gradiente de sacarose. A quitina encontrada na fração da MPM foi identificada por técnicas de espectrofotometria, microscopia de fluorescência com WGA-FITC e microscopia de varredura.

Palavras-chave: Quitina, membrana perimicrovilar, *Rhodnius prolixus*, Doença de Chagas.



NASCIMENTO, Thiago Silva. Investigation of chitin in the perimicrovillar membrane of *Rhodnius prolixus*. 65 p. Completion of course work. Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

## ABSTRACT

American trypanosomiasis or Chagas disease is a neglected disease and one of its main vectors is *Rhodnius prolixus*. The etiologic agent of the disease is *Trypanosoma cruzi*, which lodges and differentiates within the vector's intestine. In the vector's intestine there is a membrane called Perimicrovillar Membrane (MPM), which covers the intestinal microvilli and is involved with the insect digestion processes, parasite differentiation and other functions still unknown. The composition of MPM is partially known, the chitin molecule, although identified in the intestine, has not yet been associated with MPM, similarly to what occurs with the peritrophic matrix in other insects. It is worth noting the biotechnological importance of the chitin molecule, which is the second most abundant biopolysaccharide present on Earth, with the potential to replace synthetic polysaccharides because it is biocompatible, biodegradable, and does not cause damage to the environment. The objective of this work was to investigate the existence of chitin in the MPM of *R. prolixus* in 5th instar nymphs of the insect, which were fed with blood, on the 10th day and on the 15th to 18th days after feeding, the luminal content was collected and subjected to treatment with the enzyme papain for the digestion of proteins. Then the lipid extraction was performed and the treatment with potassium hydroxide (KOH) 10 M hot and finally the material was bleached with hydrochloric acid (HCl) and acetone. Then the material was washed with water and dried. This material was subjected to infrared spectroscopy compared to commercial chitin. The detection of chitin was performed with wheat germ agglutinin bound to fluorescein isothiocyanate (WGA-FITC) by fluorescence microscopy. The technique used to separate the luminal content and MPM was sucrose gradient ultracentrifugation. The chitin found in the MPM fraction was identified by spectrophotometry, WGA-FITC fluorescence microscopy and scanning microscopy.

Key-words: Chitin, perimicrovillar membrane, *Rhodnius prolixus*, Chagas disease.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo do parasito nos hospedeiros mamífero e triatomíneo .....	17
Figura 2: Estádios de desenvolvimento do <i>R. prolixus</i> .....	18
Figura 3: Estruturas de proteção das microvilosidades de insetos.....	21
Figura 4: Representação esquemática da organização molecular de quitina .....	22
Figura 5: Comparação estrutural entre as moléculas de quitina e celulose .....	22
Figura 6: Sistema de alimentação artificial de insetos.....	26
Figura 7: <i>R. prolixus</i> fixado com alfinete .....	27
Figura 8: <i>Thermo Sorvall Legend XTR Refrigerated Centrifuge</i> .....	27
Figura 9: <i>EVOS M5000 Imaging System</i> .....	30
Figura 10: microscópio Zeiss Evo 10 .....	30
Figura 11: ZEISS Axio Zoom.V16 .....	31
Figura 12: <i>Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer</i> .....	33
Figura 13: Material durante a separação de lipídeos .....	35
Figura 14: Material quitinoso escurecido .....	35
Figura 15: Material quitinoso clareado .....	36
Figura 16: Comparação entre espectros de infravermelho para quitina comercial e material encontrado no intestino de <i>R. prolixus</i> .....	37
Figura 17: Espectro de infravermelho para quitina de caranguejo da empresa Sigma .....	38
Figura 18: Espectro de infravermelho para quitina encontrada no conteúdo luminal do intestino de <i>R. prolixus</i> .....	38
Figura 19: Comparação do espectro de infravermelho entre padrão de quitina e o material encontrado.....	39
Figura 20: Microscopia de fluorescência de amido .....	41
Figura 21: Microscopia de fluorescência de quitina de caranguejo da empresa Sigma .....	41
Figura 22: Microscopia de fluorescência do material encontrado.....	42
Figura 23: Fotografias de lupa e microscopia de varredura de quitina de caranguejo e do material encontrado.....	43
Figura 24: Fotografia e microscopia de varredura de quitina de caranguejo e do material encontrado.....	44
Figura 25: Representação esquemática do gradiente de densidade com sacarose .	44

Figura 26: Gradiente de densidade com sacarose após a centrifugação.....	45
Figura 27: Gráfico de concentração de sacarose por fração individual do gradiente	46
Figura 28: Gráfico de fluorescência por fração do gradiente.....	46
Figura 29: Concentração de sacarose e fluorescência nas frações do gradiente .....	47
Figura 30: Identificação da "membrana dupla" no gradiente de densidade .....	48
Figura 31: Microscopia de Fluorescência da fração 1 .....	50
Figura 32: Microscopia de Fluorescência da fração 2 .....	50
Figura 33: Microscopia de Fluorescência da fração 3 .....	51
Figura 34: Microscopia de Fluorescência da fração 5 .....	51
Figura 35: Microscopia de Fluorescência da fração 5 .....	52
Figura 36: Microscopia de Fluorescência da fração 6 .....	52
Figura 37: Microscopia de Fluorescência da fração 7 .....	53
Figura 38: Microscopia de Fluorescência da fração 8 .....	53
Figura 39: Microscopia de Fluorescência da fração 9 .....	54
Figura 40: Microscopia de Fluorescência da fração 10 .....	54
Figura 41: Microscopia de Fluorescência da fração 11 .....	55
Figura 42: Microscopia de Fluorescência da fração 12 .....	55
Figura 43: Microscopia de Fluorescência da fração 13 .....	56

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Propriedades concentrativas de soluções aquosas: densidade, índice de refração, ponto de congelamento, depressão e viscosidade .....	32
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC – *Center for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CHS – *Chitin synthase* (quitina sintase)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EDTA - *ethylenediaminetetraacetic acid*

FTIR – *Fourier transform infrared* (Infravermelho por transformada de Fourier)

KOH – Hidróxido de Potássio

MPM – Membrana Perimicrovilar

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)

PTTH - *Prothoracicotropic Hormone* (Hormônio protoracicotrófico)

*R. prolixus* – *Rhodnius prolixus*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN-C<sup>13</sup> – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

*T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*

WGA-FTIC – *Fluorescein Isothiocyanate associated with Wheat germ agglutinin*  
(Isotiocianato de Fluoresceína associado à Aglutinina de gérmen de trigo)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 DOENÇA DE CHAGAS.....	15
1.2 TRIATOMÍNEOS.....	18
1.3 MEMBRANA PERIMICROVILAR.....	20
1.4 QUITINA.....	21
1.5 JUSTIFICATIVA .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
3.1 MANUTENÇÃO E ALIMENTAÇÃO DA COLÔNIA.....	26
3.2 DISSECAÇÕES DOS INSETOS .....	26
3.3. DIGESTÃO COM PAPAÍNA.....	27
3.4 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS .....	28
3.5 TRATAMENTO COM KOH SOB CALOR.....	28
3.6 CLAREAMENTO COM ACETONA E ÁCIDO CLORÍDRICO .....	28
3.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	29
3.8 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	29
3.9 MICROSCOPIA DE VARREDURA E FOTOGRAFIA COM LUPA .....	30
3.10 CENTRIFUGAÇÃO POR GRADIENTE DE DENSIDADE COM SACAROSE E LEITURA DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO .....	31
3.11 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	33
3.12 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	33
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Tripanossomíase americana, também conhecida como Doença de Chagas é uma doença negligenciada e um de seus principais vetores é o barbeiro *Rhodnius prolixus*. O agente etiológico da doença é o parasito *Trypanossoma cruzi* que se aloja e se diferencia dentro do intestino do vetor. A forma tripomastigota metacíclica do parasito é infectante e está presente nas fezes do inseto, alcançando a epiderme e a derme do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. No intestino do vetor existe uma membrana denominada Membrana Perimicrovilar (MPM) que recobre as microvilosidades intestinais e está envolvida com os processos de digestão do inseto, diferenciação do parasito e possivelmente, outras funções ainda desconhecidas. A composição da MPM é parcialmente conhecida e a molécula de quitina, apesar de identificada no intestino do vetor (ALVARENGA *et al.*, 2016), ainda não foi associada à MPM, à semelhança com o que ocorre com a matriz peritrófica em outros insetos (BRENER, 1997; PETERS, 1992; OMS, 2012).

## 1.1 DOENÇA DE CHAGAS

Carlos Chagas, médico e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, descobriu uma nova doença no município de Lassance, Estado de Minas Gerais no ano de 1909 (Chagas, 1909). Esta doença passou a ser conhecida como Tripanossomíase americana ou Doença de Chagas, em homenagem ao médico (KROPF, 2000).

A Tripanossomíase é causada pelo *T. cruzi*, parasito flagelado da classe *Kinetoplastea* e ordem *Trypanosomatida*, sendo caracterizado por possuir apenas um flagelo e uma organela localizada na mitocôndria que armazena o DNA, chamada cinetoplasto. Em seu ciclo de vida apresenta três formas evolutivas, sendo elas: tripomastigota (forma infectante), epimastigota (forma de multiplicação no vetor) e amastigotas (forma de multiplicação intracelular no hospedeiro final, que pode ser o homem) (BRENER, 1997).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a Doença de Chagas como uma doença negligenciada, presente em países pobres e em populações com vulnerabilidade socioeconômica. A condição infecciosa da doença pode ser

classificada em fase aguda e fase crônica (OMS, 2012). O nome “Tripanossomíase americana” se dá devido ao fato de que o continente americano possui cerca de 140 espécies diferentes do inseto vetor (OMS, 2015).

A fase aguda da doença pode ser sintomática ou assintomática, estando relacionado com o estado de imunidade do hospedeiro, havendo predomínio de casos sintomáticos, na fase infantil do hospedeiro causando morte em 10% das crianças afetadas, devido à meningoencefalite e a possível falência cardíaca. Os sintomas mais comuns são o sinal de Romaña (para os casos de infecção via vetor), febre, edema localizado e generalizado, hepatomegalia, esplenomegalia, poliadenia, podendo também causar perturbações neurológica e insuficiência cardíaca (LANA, 2016).

A fase crônica sintomática pode ser caracterizada por sintomas que envolvem o sistema cardiocirculatório (manifestação da forma cardíaca), sistema digestório (manifestação da forma digestiva), ou ambos (forma cardiodigestiva ou mista), além da forma nervosa que ainda gera discussões na literatura. Entre essas fases, a cardíaca é a mais comum, atingindo cerca de 20 a 40% dos pacientes no centro-oeste e sudeste do Brasil, sendo que todas as fases podem, em casos extremos e ausência de tratamentos, levar à morte (LANA, 2016).

A fase crônica pode ser assintomática (conhecida por fase indeterminada), em que os indivíduos após a fase aguda podem ficar por um período de 10 a 30 anos sem apresentar sintomas, mas ainda sendo caracterizada por positividade de exames sorológicos e/ou parasitológicos; eletrocardiograma convencional normal, e coração, esôfago e cólon normais quando submetidos a exames radiológicos. Vale destacar que nessa fase os hospedeiros ainda podem transmitir o parasito, mesmo que sem sintomas aparentes (LANA, 2016).

Entre as diversas formas de contaminação (via transfusão sanguínea, acidentes laboratoriais, via oral, entre outras), a que mais se destaca é a transmissão vetorial feita por triatomíneos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

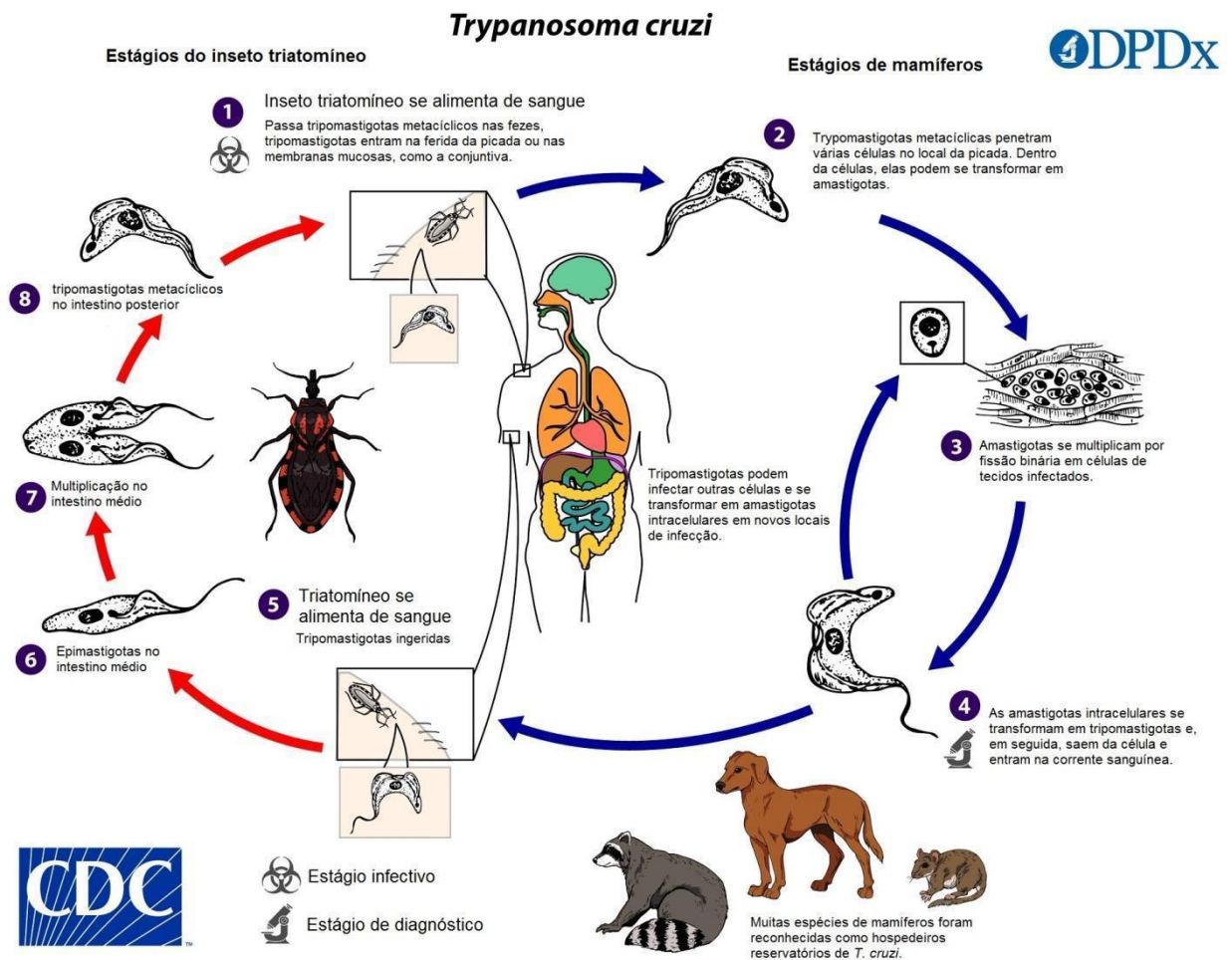
Quanto ao ciclo evolutivo do agente etiológico, este pode ser dividido entre os estágios no inseto vetor e estágios nos hospedeiros mamíferos. No mamífero começa com a alimentação de sangue de um triatomíneo contaminado, as formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas nas fezes do barbeiro. Em seguida, essas formas tripomastigotas penetram nas células do local da picada e dentro dessas células passam para a forma amastigota, onde se multiplicam. As



amastigotas intracelulares então passam para a forma tripomastigota sanguínea e saem das células, alcançando a corrente sanguínea (CDC, 2021).

Quando um triatomíneo se alimenta com o sangue de um mamífero contaminado, pode ingerir as tripomastigotas sanguíneas presentes ali, então essas formas se diferenciam em formas epimastigotas no intestino médio do vetor, onde ocorre a multiplicação do *T. cruzi*, em seguida, no intestino posterior do inseto ocorre a diferenciação do flagelado para formas tripomastigotas metacíclicas, completando o ciclo e que podem mais uma vez infectar outros mamíferos, conforme demonstrado na Figura 1 (CDC, 2021).

Figura 1: Ciclo do parasito nos hospedeiros mamífero e triatomíneo



Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2021)

## 1.2 TRIATOMÍNEOS

Triatomíneos, conhecidos popularmente no Brasil como barbeiro, são insetos hematófagos, ou seja, alimentam-se unicamente de sangue em todos os seus estágios do desenvolvimento e fazem parte da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* (Hemiptera, Heteroptera). Esse grupo de insetos possui cinco estágios de ninfa (I a V), conforme demonstrado na Figura 2 e fase adulta e são paurometábolos, sendo assim os adultos não diferem das ninfas em modo de vida e aparência, mas apresentam evoluções graduais como aumento do tamanho, desenvolvimento dos ocelos e por último a formação de asas e genitálias, que só são presentes em adultos no caso dos triatomíneos (CALOR, 2009; LAZZARI, 2014).

Figura 2: Estádios de desenvolvimento do *R. prolixus*



Fonte: Adaptado de Rocha (2010)

Atualmente existem 140 espécies formalmente reconhecidas e todas são possíveis vetores da Doença de Chagas dos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Pastronglylus* (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009).

Muitos desses insetos buscam abrigo em ninhos, tocas e cavernas (habitat) geralmente habitados pelos seus hospedeiros, assim como residências habitadas por seres humanos. Isso ocorre devido à disponibilidade de alimento (sangue), proteção e a possibilidade de um microambiente favorável. A preferência e identificação de alimento podem ser dirigidas por odores e outras moléculas emanados pelos hospedeiros e captados pelo sistema olfativo dos triatomíneos e no caso de residências humanas, os insetos também podem ser atraídos pela luz artificial

durante a noite, visto que esses insetos possuem hábitos noturnos. (LAZZARI, 2014).

Após entrar nas casas, os insetos buscam frestas, rachaduras e pequenos espaços nas paredes e telhados para encontrar proteção de predadores e hospedeiros ativos que possam oferecer algum perigo a eles. Além de encontrarem um microclima de umidade e temperatura razoavelmente estáveis (LAZZARI *et al.*, 2013).

Os barbeiros são capazes de identificar pequenas variações de temperatura, o que facilita o encontro de vênulas sob a pele do hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2007). O aparato bucal dos triatomíneos é muito adaptado para a penetração na pele do hospedeiro, dessa forma consegue localizar vasos sanguíneos através de seu aparelho sensorial avançado e se alimentar de forma rápida e praticamente indolor devido à presença de substâncias anticoagulantes, vasodilatadoras e anestésicas na saliva (LAZZARI, 2013; LORENZO, 2009; LEHANE, 2005; MOREIRA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 1996).

Os triatomíneos são extremamente resistentes a longos períodos de jejum, aparentemente sem que haja danos fisiológicos e ao se alimentar são capazes de sugar uma grande quantidade de sangue, o que aumenta consideravelmente seu tamanho e seu peso após a alimentação (LAZZARI, 2014)

A escolha da espécie *Rhodnius prolixus* no trabalho aqui apresentado se dá devido à facilidade de acesso aos insetos para pesquisa e também devido à grande quantidade de estudos anteriores realizados com ele. Isso nos permite ter um maior conhecimento teórico sobre a fisiologia, anatomia, comportamento e outras particularidades que garantem maior confiabilidade e credibilidade aos experimentos realizados. E por ser vetor da Doença Chagas.

O intestino dos insetos em geral é dividido em três partes principais: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. O intestino anterior está envolvido com a ingestão, condução e estocagem de alimentos. O intestino médio é onde ocorre a digestão e absorção de alimentos, nos triatomíneos é formado pelo promesêntero e posmesêntero (TERRA, 1990). Os triatomíneos concentram e estocam o sangue ingerido no intestino médio anterior, onde permanece sem ser digerido, exceto pela quebra das células sanguíneas (BILLINGSLEY & DOWNE, 1983, 1985). E o intestino posterior, envolvido com a excreção e eliminação do material não digerido (TERRA, 1990; TERRA & FERREIRA, 1994; ROMOSER, 1996). Como grande parte

dos insetos, os vetores da doença de Chagas possuem uma estrutura em seu intestino denominada MPM que exerce diversas funções após a alimentação (TERRA, 1990; ALVARENGA, 2016).

### 1.3 MEMBRANA PERIMICROVILAR

A matriz peritrófica é composta por proteínas, quitina e proteoglicanos localizada no intestino, envolvendo o bolo alimentar da maioria dos insetos (PETERS, 1992). Essa matriz atua como forma de proteção do inseto, impedindo o contato direto entre o alimento e o tecido intestinal, o que o protege contra danos mecânicos das células e também promove um sistema de defesa contra patógenos. Mesmo com essa função de barreira, a matriz peritrófica permite a passagem de enzimas digestivas e a absorção de nutrientes provenientes da alimentação (GUTIÉRREZ-CABRERA *et al.*, 2015; LEHANE & BILLINGSLEY, 1996).

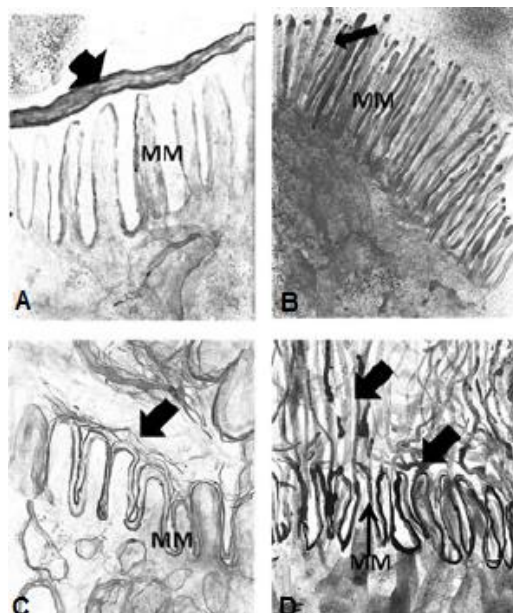
Vale destacar que nem todos os insetos possuem a matriz peritrófica, conforme demonstrado na Figura 3 e isso pode ser explicado pelo fato desses insetos se alimentarem de substância com baixo peso molecular, o que exige uma menor digestão intestinal. Além de insetos que possuem um gel ao invés de uma matriz peritrófica, mas com a mesma função (TERRA, 2001). A produção da membrana perimicrovilar ocorre pela distensão abdominal logo após a alimentação dos insetos, como no caso do *R. prolixus*, que aumenta consideravelmente seu tamanho devido à grande quantidade de sangue que é capaz de ingerir. Outros fatores bioquímicos que promovem a produção desta membrana podem ser o conteúdo da dieta, ativação do sistema neuroendócrino levando à liberação do hormônio protoracicotrópico (PTTH) e da produção de ecdisona (ALBUQUERQUE-CUNHA *et al.*, 2004).

Um terceiro grupo de insetos, caracterizados por uma alimentação mais fluida, como é o caso de insetos que se alimentam de sangue, desenvolvem uma segunda membrana, localizando-se de forma externa à membrana microvilar, mas que possui a mesma função. A essa membrana dá-se o nome de membrana perimicrovilar (MPM) (GUTIÉRREZ-CABRERA *et al.*, 2015; TERRA, 2001).

O inseto *R. prolixus* apresenta MPM devido à sua dieta exclusiva de sangue (hematófago estrito). Considerando as funções de proteção da MPM nesse inseto, semelhante à matriz peritrófica, surge a possibilidade da existência de quitina nessa

membrana, principalmente após a descoberta de Alvarenga *et al.* (2016), em que os autores comprovam a existência de quitina no conteúdo luminal o barbeiro.

Figura 3: Estruturas de proteção das microvilosidades de insetos



Legenda: (A) membrana peritrófica em insetos pertencentes ao grupo Polyneoptera; (B) gel peritrófico em Psocoptera e Phthiraptera; (C) tipo de membrana perimicrovilar na ordem Thysanoptera; (D) membrana perimicrovilar em hemípteros, que é o caso do *Rhodnius prolixus*. Setas: membranas presentes no intestino médio de diferentes insetos. MM: Membrana Microvilar.

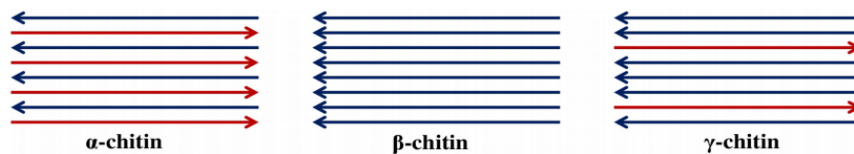
Adaptado de Gutiérrez-Cabrera *et al.* (2015)

#### 1.4 QUITINA

Quitina é o segundo biopolímero natural mais abundante na Terra depois da celulose, sendo facilmente encontrada em crustáceos, exoesqueletos e estruturas de insetos como ovos, traqueias, intestino, entre outras e também em células de fungos (ARAKANE *et al.*, 2005; KRAMER & MUTHUKRISHAN, 2005; MOREIRA *et al.*, 2007; MANSUR *et al.*, 2010; ALVARENGA *et al.*, 2016) É um polissacarídeo constituído por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1 - 4)$ , que naturalmente é encontrado associado à proteínas, aos minerais, aos lipídeos e pigmentos (EL KNIDRI *et al.*, 2018).

Existem duas formas poliméricas principais da quitina, dependendo da origem do polissacarídeo, sendo elas a  $\alpha$ -quitina e  $\beta$ -quitina. Uma terceira forma de quitina também pode ser encontrada, a  $\gamma$ -quitina, que se assemelha a uma junção das duas formas principais. A diferença entre esses tipos de quitina se dá pelo arranjo das cadeias poliméricas, sendo a  $\alpha$ -quitina antiparalela, a  $\beta$ -quitina paralela e a  $\gamma$ -quitina alternada, conforme demonstrado de forma esquemática na Figura 4 (KUMIRSKA *et al.*, 2010; BIROLI *et al.*, 2016).

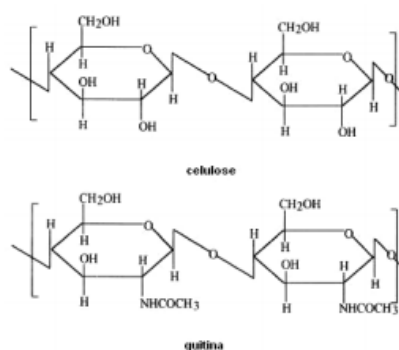
Figura 4: Representação esquemática da organização molecular de quitina



Adaptado de El Knidri *et al.* (2018)

Devido à sua característica biodegradável e de biocompatibilidade, além de sua estrutura parecida com o biopolímero celulose, como representado na Figura 5, a quitina e seu derivado, quitosana, têm sido estudadas visando serem possíveis substitutos para polímeros sintéticos. Elas têm sido aplicadas na indústria farmacêutica, alimentícia, médica, agricultura, cosméticos, indústria têxtil, de biotecnologia, entre outras, apresentando-se como uma alternativa sustentável e economicamente viável para diversos processos industriais, alimentícios e de saúde. (EL KNIDRI *et al.*, 2018; SIRVAS-CORNEJO *et al.*, 2020).

Figura 5: Comparação estrutural entre as moléculas de quitina e celulose



Adaptado de Ravi Kumar (2000)

## 1.5 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial de Saúde caracteriza a doença de Chagas como uma doença negligenciada de grande expressão em países das Américas, com destaque para países em desenvolvimento e maior gravidade para populações em vulnerabilidade socioeconômica (OMS, 2012). Portanto, levando em consideração a relevância da doença e a gravidade da mesma, é de extrema importância encontrar medidas para entender os mecanismos de infecção, e suas formas de transmissão para definição de estratégias de controle do vetor e desenvolvimento de possíveis novas drogas para o controle da doença.

O triatomíneo *R. prolixus* é o segundo vetor de maior relevância dessa doença no Brasil, como mostra o estudo feito por Massaro *et al.* (2008), realizado em Monte Negro, Estado de Rondônia, uma região com alto risco de contaminação para essa doença; em que a espécie vetora aqui estudada fica em segundo lugar em números encontrados. Sendo assim, o maior entendimento das particularidades desse inseto, como a existência de quitina, o segundo polissacarídeo natural mais abundante na natureza (CAMPANA-FILHO, 2007) pode facilitar o entendimento sobre a interação entre o vetor e o flagelado *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas.

Identificar e caracterizar o polímero de quitina no intestino do vetor tem sido alvo de estudos, a ser utilizado no controle de vetores e pelo fato de que o parasito se diferencia no intestino, na MPM. Além disso, caracterizar quitina com propriedades diferentes pode ser interessante, visto que este material de grande prevalência na natureza, como um possível substituto para polissacarídeos sintéticos como são os casos de plásticos. Assim verificar a natureza do polímero, tipos de cadeias poliméricas, tipos de proteína associadas, presente no intestino do vetor, pode constituir informação relevante sobre estruturas de quitina com propriedades diferentes que podem ter novas aplicações biotecnológicas e também informação para estudar o microambiente do parasito, visto que o intestino é o lugar onde o *T. cruzi* se diferencia, um lugar repleto de grupo heme da hemoglobina, gerado durante o processo da digestão, sujeito a estresse oxidativo.

Além de que a quitosana, derivado da quitina, pode apresentar usos para a indústria alimentícia, medicina, odontologia e até mesmo para insumos farmacêuticos, como uma alternativa mais ecológica e de obtenção relativamente

fácil, sendo o único problema encontrado até agora, a dificuldade de purificação da quitina, que sempre se encontra associada a outros componentes (ABRAM, 2004; CAMPANA-FILHO, 2007).

A quitina e as enzimas envolvidas em seu metabolismo podem constituir-se alvos para controle de vetores e para entender o ciclo de vida do *T. cruzi* dentro do vetor. Os genes envolvidos nos processos de degradação e síntese de quitina podem ser alvo para o silenciamento gênico, no que diz respeito aos métodos de controle do vetor e na compreensão do ciclo de vida do parasito, como por exemplo, bioinseticidas à base de RNA de interferência. Como proposto o bioinseticida baseado no silenciamento da enzima catalisadora, quitina sintase (CHS). Estudos realizados com o barbeiro mostram que ao silenciar essa enzima, ocorrem complicações na digestão de sangue nos barbeiros, quando tratados com dupla fita de RNA para silenciamento gênico de CHS, além de causar alterações nos ovários, traquéias e outras estruturas do vetor (ALVARENGA *et al.*, 2016; MANSUR *et al.*, 2010).

Até o momento não foi comprovado experimentalmente a existência de quitina na MPM de triatomíneos, dessa forma, esse trabalho pode abrir um novo conhecimento sobre o segundo principal vetor da Doença de Chagas e facilitar estudos voltados para o controle do vetor. Além de possibilitar a caracterização e localização do tipo de quitina presente no intestino de *R. prolixus* e se esta molécula de quitina está na MPM, e se a molécula é importante para diferenciação do parasito dentro do vetor.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a existência de quitina na membrana perimicrovilar de *R. prolixus* e identificar a quitina encontrada.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Executar métodos de alimentação e dissecação de triatomíneos baseado na literatura, visando a caracterização de quitina.
- Estabelecer um protocolo de separação dos componentes do lúmen intestinal que inclui a MPM por método de ultracentrifugação em gradiente de sacarose visando a localização da quitina na fração luminal.
- Realizar análises de espectroscopia de infravermelho do material quitinoso extraído e purificado do conteúdo luminal no 10º, 15º a 18º dia após a alimentação.
- Realizar a comparação do material extraído e purificado do conteúdo luminal com a quitina comercial como um método de validação.
- Confirmar a presença e a localização de quitina nas frações do intestino do vetor através de testes com sonda específica para detecção por técnica de microscopia de fluorescência e espectroscopia de fluorescência.

### 3 METODOLOGIA

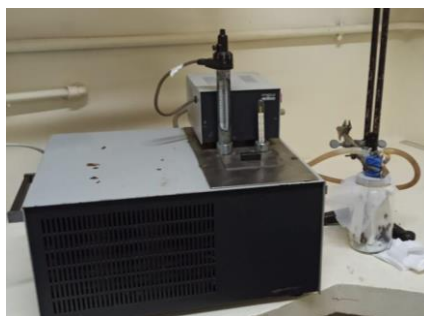
#### 3.1 MANUTENÇÃO E ALIMENTAÇÃO DA COLÔNIA

As ninfas de quinto estágio utilizadas neste trabalho foram alimentadas em sistema de alimentação artificial com aproximadamente 150  $\mu\text{L}$  de sangue de coelho, cada inseto (conforme demonstrado na figura 6). Esse sistema permite que a temperatura do sangue fique em torno de 36,5°C, que é aproximadamente a temperatura do corpo humano, já que esse inseto possui a capacidade de ser atraído pelo calor até sua fonte de alimentação.

Após a alimentação os insetos foram mantidos em frascos devidamente fechados e arejados sob uma temperatura de 28°C  $\pm$  1°C em ambiente de umidade relativa do ar aproximada de 70% protegidos de luz direta excessiva.

Os protocolos de ética foram aprovados através CAUAP-UFRJ sob registro # IBqM001.

Figura 6: Sistema de alimentação artificial de insetos



Fonte: do autor (2021)

#### 3.2 DISSECAÇÕES DOS INSETOS

Os insetos foram fixados com alfinete (figura 7) e dissecados com auxílio de pinça e bisturi para maior precisão, eles foram abertos cuidadosamente pela lateral do corpo. Em seguida os intestinos médio e posterior foram removidos e o material foi colocado em água gelada, de modo a extravasar todo o conteúdo luminal. Após o extravasamento foi realizada a filtragem em gaze para a remoção de tecidos e o líquido restante foi mantido congelado para a realização das próximas etapas.

Figura 7: *R. prolixus* fixado com alfinete



Fonte: do autor (2021)

### 3.3. DIGESTÃO COM PAPAÍNA

O material coletado do lúmen foi centrifugado a 10.000 g por 30 min na centrífuga *Thermo Sorvall Legend XTR Refrigerated Centrifuge* (Figura 8) em tubo do tipo Falcon, em seguida o sobrenadante foi separado e o precipitado foi colocado em 1mL do tampão acetato de sódio e ácido acético (TAA) (para pH 5,5) com tampão acetato (0,5 M), EDTA (0,5 M) e cisteína (0,5 M) (TAEC) no mesmo tubo.

Em seguida foi adicionada papaína de 1mg de papaína para 1mL da amostra em tampão, o tubo contendo a amostra foi mantido em banho-maria na temperatura de 60°C por 24h. Após a digestão do material, este foi centrifugado a 10.000 g por 30 min na mesma centrífuga utilizada anteriormente e o sobrenadante foi retirado e desprezado.

Figura 8: *Thermo Sorvall Legend XTR Refrigerated Centrifuge*



Fonte: do autor (2021)

### 3.4 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

A extração dos lipídeos foi realizada de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959), utilizando 2mL de clorofórmio, 1mL de metanol e 0,5mL de água destilada, pois já havia 0,3mL de água presente no precipitado centrifugado, coletado na etapa anterior do experimento, proporção 2:1:0.8 mL. A mistura de solventes foi adicionada em cima do precipitado que estava dentro de em um tubo de ensaio de vidro com tampa de vidro apropriado para fazer a extração O protocolo de extração é manual e leva duas horas, sendo executado da seguinte maneira: o tubo contendo os solventes e a amostra deve ser mantido em agitação com auxílio de agitador vórtex durante 30 segundos e em seguida deve ser mantido imóvel por cinco minutos para que ocorra a separação das fases aquosa e lipídica. Esse processo foi repetido durante 2 h.

### 3.5 TRATAMENTO COM KOH SOB CALOR

A fase aquosa (escura) da separação de lipídeos foi deixada sob calor brando para que houvesse a evaporação dos solventes presentes na amostra. Em seguida, o *pellet* insolúvel foi ressuspensado em 300µL de KOH a 10M, misturado em agitador vórtex por 30 segundos e incubado em banho-maria na temperatura de 65 °C, processo que foi repetido três vezes. Após o tratamento foi realizada uma centrifugação a 10.000 g por 30 minutos, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi lavado com 300µL de água destilada por cinco vezes.

### 3.6 CLAREAMENTO COM ACETONA E ÁCIDO CLORÍDRICO

Após o tratamento e secagem do material obtido na etapa anterior, foi necessário fazer o clareamento do pellet de amostra para a remoção da hemozoina (polímero de heme) que confere a coloração escura ao pellet. Para isso foi utilizado o método descrito por Falk (1964) com acetona e ácido clorídrico (AcHCl) na proporção (97.5%:2.5%). Um total de 300µL da mistura que foi colocado sobre o material e centrifugação a 13000 rpm por cinco minutos. O procedimento foi repetido cinco vezes até que o material estivesse completamente esbranquiçado. Em seguida, o material foi lavado com 300µL de água destilada com centrifugação a

13000 rpm por cinco minutos por cinco vezes e logo após foi secado em estufa a 70°C. O material clareado foi levado para análise de espectrometria de Infravermelho.

### 3.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier foi utilizada para identificar os grupos funcionais do material resistente à KOH obtido na etapa anterior, após lavagem com água e secagem, como controle foi utilizada quitina comercial de caranguejo produzida pela empresa Sigma-Aldrich e os resultados foram interpretados e comparados conforme esquematizado por Lopes e Fascio (2004) e Brugnerotto *et al.* (2001).

### 3.8 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

O protocolo de detecção de quitina com a conjugação de FTIC-WGA (de aglutinina de germen de trigo ligada a isotiocianato de fluoresceína) com materiais quitinosos foi adaptado de Mansur *et al.* (2010). Portanto, o material isolado conteúdo luminal e purificado, o amido (como controle negativo) e uma amostra de quitina comercial de caranguejo foram incubados com WGA-FTIC após a diluição de 1mg pó em 1mL de tampão fosfato salino (PBS, sigla do inglês *Phosphate Buffered Saline*), e incubados por uma hora sob proteção da luz. Após a incubação, as três amostras foram lavadas dez vezes com água destilada, para a remoção do excesso de material fluorescente e foram colocados, separadamente, em lâminas de microscopia e analisados no microscópio *EVOS M5000 Imaging System* (figura 9).

Figura 9: *EVOS M5000 Imaging System*



Fonte: do autor (2022)

### 3.9 MICROSCOPIA DE VARREDURA E FOTOGRAFIA COM LUPA

Para essa análise, as duas amostras foram revestidas com uma película de ouro: o material resistente a KOH extraído do lúmen de *R. prolixus* e quitina de caranguejo da empresa Sigma-Aldrich como padrão de análise e a varredura foi realizada com o auxílio do microscópio Zeiss Evo 10 (figura 10) operado em 10.00kV.

Figura 10: microscópio Zeiss Evo 10



Adaptado de: Zeiss (2022)

Para a fotografia com lupa, o equipamento utilizado foi ZEISS Axio Zoom.V16 (figura 11) foi utilizado para a fotografia de amostras com um zoom de 16x, facilitando a análise bidimensional dos materiais analisados, o que possibilita a comparação entre quitina comercial de caranguejo como padrão de análise e o material extraído do lúmen intestinal de *R. prolixus*.

Figura 11: ZEISS Axio Zoom.V16



Adaptado de: Zeiss (2022)

### 3.10 CENTRIFUGAÇÃO POR GRADIENTE DE DENSIDADE COM SACAROSE E LEITURA DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Esta etapa do trabalho consistiu na utilização integral do conteúdo luminal dos intestinos posterior e médio de *Rhodnius prolixus*. A extração do material luminal foi realizada conforme descrito anteriormente, o que difere nesta etapa é que o material não foi tratado como anteriormente, ao invés disso, o material extraído em água gelada foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos, o sobrenadante foi retirado e o precipitado concentrado foi ressuspensão em 1mL da mistura de manitol (50mM) e imidazol (10mM) na proporção 1:1, resultando em aproximadamente 1mL de suspensão. Após a ressuspensão foi adicionado 10 $\mu$ L de WGA-FTIC diluído em PBS (1mg/mL), agitada em vórtex por 30 segundos e deixada em repouso por 1 hora.

A técnica utilizada para a separação do conteúdo luminal que inclui a MPM de *R. prolixus* foi adaptada de Bittencourt-Cunha *et al.* (2013) que se baseia na técnica descrita por Ferreira *et al.* (1988). Sendo assim foram preparadas soluções de sacarose de 60%, 50%, 40%, 30% e 20% em manitol (50mM) e imidazol (10mM) e o gradiente foi montado de modo que a solução mais concentrada (60% de sacarose) ficasse na parte inferior do tubo de centrífuga e a concentração diminuísse gradativamente até que a solução menos concentrada ficasse na parte superior do tubo. Essa etapa foi realizada manualmente e com cuidado, adicionando 2mL de cada solução, para que não ocorresse a mistura das densidades ao longo do tubo. Após a montagem do gradiente foi adicionado 1mL de amostra conjugados com WGA-FTIC no topo do gradiente (totalizando um volume de 13mL dentro do tubo). Em seguida foi realizada a centrifugação a 96.000 g por 15 h a 4°C na centrífuga

Beckman Coulter Optima L-90K Ultracentrifuge em rotor do tipo *Swing Bucket* da empresa Beckman modelo SW 41 41.000 RPM.

Após a centrifugação, as frações do gradiente foram retiradas (começando pela parte superior) e separadas em porções de 1mL em tubos do tipo *Eppendorf*, totalizando 13 tubos, sendo o tubo 1 a porção menos densa e o tubo 13, a porção mais densa.

A leitura do índice de refração de cada tubo foi realizada com refratômetro para identificar um valor ( $n$ ) em cada porção separada do gradiente de sacarose. Após a leitura utilizando a tabela presente no livro *Handbook of Chemistry and Physics 90th edition* (LIDE, 2009) (tabela 1) foi utilizada para converter o valor de  $n$  para concentração em mol/L.

Tabela 1: Propriedades concentrativas de soluções aquosas: densidade, índice de refração, ponto de congelamento, depressão e viscosidade

8-74 Concentrative Properties of Aqueous Solutions: Density, Refractive Index, Freezing Point Depression, and Viscosity

Solute	Mass %	$m/\text{mol kg}^{-1}$	$c/\text{mol L}^{-1}$	$\rho/\text{g cm}^{-3}$	$n$	$\Delta/^\circ\text{C}$	$\eta/\text{mPa s}$
Sucrose	0.5	0.015	0.015	1.0002	1.3337	0.03	1.015
$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	1.0	0.030	0.029	1.0021	1.3344	0.06	1.028
	2.0	0.060	0.059	1.0060	1.3359	0.11	1.055
	3.0	0.090	0.089	1.0099	1.3373	0.17	1.084
	4.0	0.122	0.118	1.0139	1.3388	0.23	1.114
	5.0	0.154	0.149	1.0178	1.3403	0.29	1.146
	6.0	0.186	0.179	1.0218	1.3418	0.35	1.179
	7.0	0.220	0.210	1.0259	1.3433	0.42	1.215
	8.0	0.254	0.241	1.0299	1.3448	0.49	1.254
	9.0	0.289	0.272	1.0340	1.3463	0.55	1.294
	10.0	0.325	0.303	1.0381	1.3478	0.63	1.336
	12.0	0.398	0.367	1.0465	1.3509	0.77	1.429
	14.0	0.476	0.431	1.0549	1.3541	0.93	1.534
	16.0	0.556	0.497	1.0635	1.3573	1.10	1.653
	18.0	0.641	0.564	1.0722	1.3606	1.27	1.790
	20.0	0.730	0.632	1.0810	1.3639	1.47	1.945
	22.0	0.824	0.700	1.0899	1.3672	1.67	2.124
	24.0	0.923	0.771	1.0990	1.3706	1.89	2.331
	26.0	1.026	0.842	1.1082	1.3741	2.12	2.573
	28.0	1.136	0.914	1.1175	1.3776	2.37	2.855
	30.0	1.252	0.988	1.1270	1.3812	2.64	3.187
32.0	1.375	1.063	1.1366	1.3848	2.94	3.762	
34.0	1.505	1.139	1.1464	1.3885	3.27	4.052	
36.0	1.643	1.216	1.1562	1.3922	3.63	4.621	
38.0	1.791	1.295	1.1663	1.3960	4.02	5.315	
40.0	1.948	1.375	1.1765	1.3999	4.45	6.162	
42.0	2.116	1.456	1.1868	1.4038	4.93	7.234	
44.0	2.295	1.539	1.1972	1.4078		8.596	
46.0	2.489	1.623	1.2079	1.4118		10.301	
48.0	2.697	1.709	1.2186	1.4159		12.515	
50.0	2.921	1.796	1.2295	1.4201		15.431	
60.0	4.382	2.255	1.2864	1.4419		58.487	
70.0	6.817	2.755	1.3472	1.4654		481.561	
80.0	11.686	3.299	1.4117	1.4906			

Adaptado de: LIDE (2009)



### 3.11 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para determinar o valor de fluorescência em cada porção extraída e separada do gradiente de sacarose após a centrifugação, com a intenção de descobrir em qual porção localizava-se a maior concentração de WGA-FTIC para detecção de quitina, através da detecção do maior valor de fluorescência. Para isso foi utilizado o equipamento *Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer* (figura 12), com a Ex de 490,00nm e Em de 525,07nm.

Figura 12: *Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer*



Fonte: Do autor (2021)

### 3.12 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Nessa etapa foram realizadas as análises de uma alíquota (10 $\mu$ L) de cada uma das 13 frações do gradiente de sacarose no mesmo microscópio utilizado anteriormente, com o objetivo de localizar as partículas e estruturas conjugadas com WGA-FTIC ao longo de todo gradiente de densidade com sacarose.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os insetos foram alimentados com 150 µL sangue de coelho, cada, como descrito em Material e Métodos, onde foi observada a distensão abdominal que é um dos fatores que induz a produção da membrana perimicrovilar.

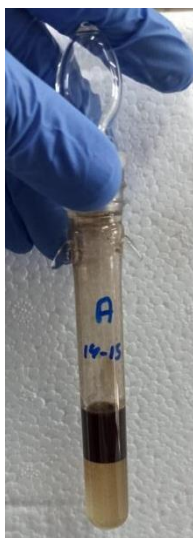
A dissecação dos insetos foi realizada no 15<sup>o</sup> ao 18<sup>o</sup> dia após a alimentação, considerando que estudos que apontam a membrana perimicrovilar está no auge de sua maturação, após 15 a 20 dias de alimentação em insetos hematófagos, como é o caso do *R. prolixus* (BILLINGSLEY & LEHANE, 1986; AZEVEDO *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ-CABRERA, *et al.*, 2014).

Neste trabalho também foram dissecados insetos no 10<sup>o</sup> dia após a alimentação como forma de comprovação da literatura e de fato foi confirmado a menor presença de material encontrado neste dia, sendo assim, foi padronizada a dissecação a partir do 15<sup>o</sup> ao 18<sup>o</sup> dia após a alimentação com sangue.

O conteúdo luminal de 120 insetos foi sujeito ao tratamento com a enzima papaína para degradar proteínas, a enzima com intensa atividade proteolítica extraída do látex do fruto verde da *Carica papaya* (mamão papaia), (AGRAWAL & KONNO, 2009; AMRI & MAMBAYA, 2012; UPADHYAY, 2013; MACALOOD *et al.*, 2014). O tratamento com a enzima papaína foi utilizado para degradar as proteínas presentes no lúmen intestinal dos insetos, com o objetivo de purificar a quitina. Além disso, a enzima que degrada inespecificamente pode degradar as glicoproteínas que contenham o resíduo de açúcar N-acetil glicosamina diminuindo assim a chance de resultados falso-positivos para a ligação de WGA-FITC em resíduos de N-acetil glicosamina de glicoproteínas.

Após o tratamento com papaína, o material foi centrifugado como descrito em Material e Métodos e foi feita a extração de lipídeos segundo o método de Bligh e Dyer (1959), que fizeram a extração de lipídeos de um pedaço de músculo de peixe utilizando clorofórmio, metanol e água em uma proporção (2:1:0,8). Nesse método o material lipídico (lipossolúvel) fica diluído na fração de clorofórmio (solvente apolar), enquanto, a porção hidrossolúvel fica diluída na fração de metanol e água. A separação do material pode ser observada na figura 13. E assim, a quitina deve estar presente na parte de cima, na parte escura, uma vez que o clorofórmio está na parte de baixo.

Figura 13: Material durante a separação de lipídeos



Fonte: do autor (2021)

Após a extração de lipídeos, a fase aquosa foi seca como descrito em Material e Métodos e submetida à extração com KOH à quente uma vez que a quitina é descrita em ser insolúvel nesta solução. O material sólido resistente aos tratamentos apresentava uma coloração enegrecida devido à presença de hemozoína (polímero de heme formado na MPM do inseto) (OLIVEIRA et al, 2000).

Figura 14: Material quitinoso escurecido



Fonte: do autor (2021)

Em seguida o material foi submetido ao processo de clareamento com acetona e ácido clorídrico e apresentou uma coloração esbranquiçada (figura 15).

Pode ser observado que o material tem uma construção de fibras mais maleáveis, ainda precisa ser mais investigado, mas sugere-se ser uma quitina do tipo alfa ou gama. Uma vez que a quitina alfa, em geral é encontrada no exoesqueleto de artrópodes, é mais dura por ter cadeias antiparalelas.

Figura 15: Material quitinoso clareado

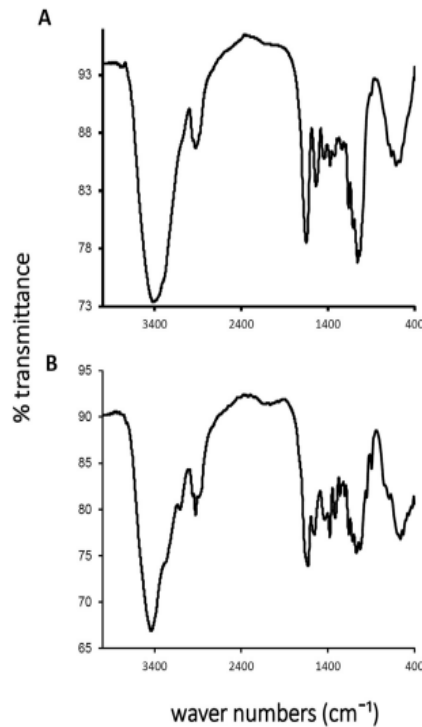


Fonte: Do autor (2021)

Para comprovar que o material encontrado é quitina, foi realizada a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, pois dessa forma é possível analisar a estrutura a nível molecular dos compostos. Por se tratar de um polissacarídeo de N-acetil glicosamina que pode ter diferentes conformações ( $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ ) cada conformação pode apresentar sinais diferentes no espectro de FTIR e isso se dá pelo efeito de blindagem, impedimento estérico, entre outros fenômenos químicos.

No trabalho realizado por Alvarenga *et al.* (2015) os pesquisadores encontraram quitina no intestino do inseto vetor e fizeram a mesma comparação com quitina comercial para elucidar e validar a teoria conforme demonstrado na figura 16.

Figura 16: Comparação entre espectros de infravermelho para quitina comercial e material encontrado no intestino de *R. prolixus*



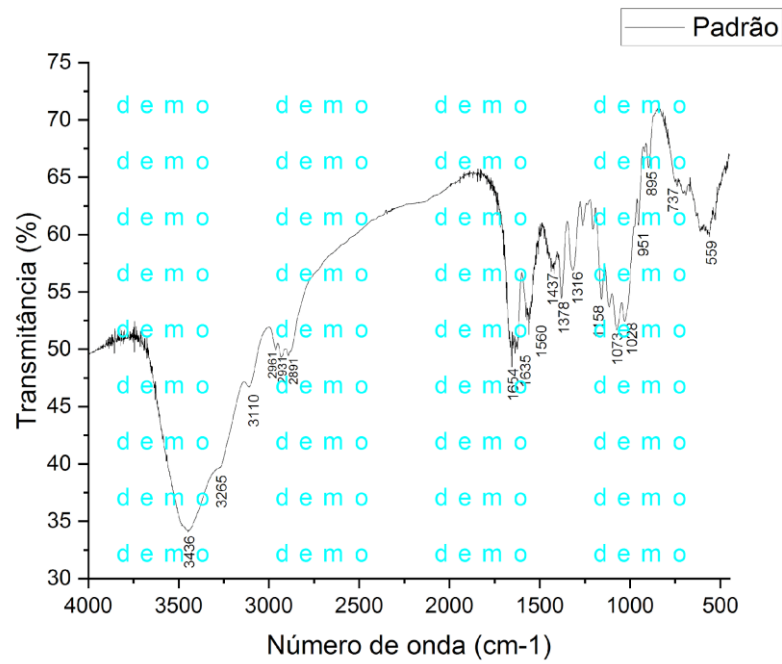
Legenda: (A) Espectro de FTIR para o material encontrado no lúmen intestinal de *R. prolixus*. (B) Espectro de FTIR encontrado para a quitina comercial padrão.

Adaptado de: Alvarenga *et al.* (2015)

No trabalho realizado por Alvarenga *et al.* (2015) nota-se semelhanças significativas entre espectros de amostra padrão de quitina e o material coletado do inseto, no que diz respeito aos picos característicos para quitina que foram observadas em aproximadamente 3500, 1675 e 1085 cm<sup>-1</sup>.

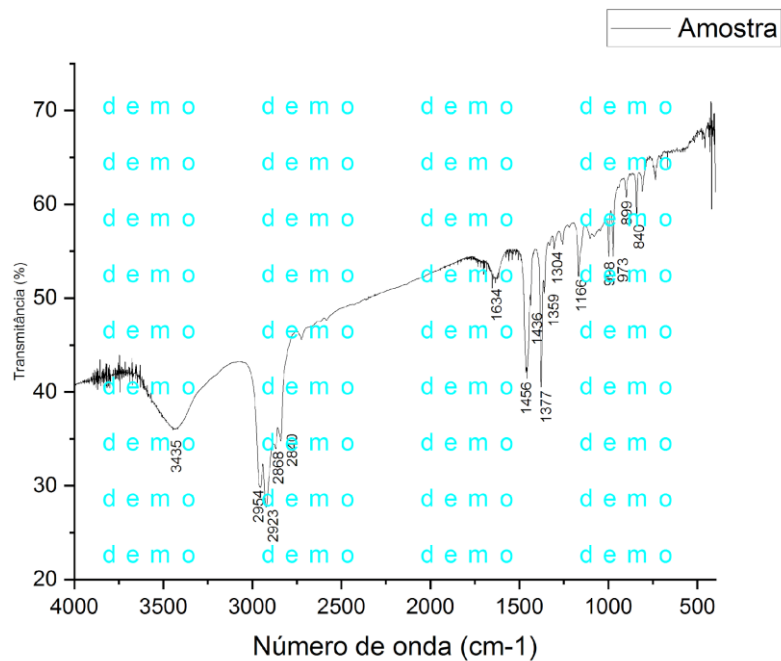
Esses picos citados também podem ser identificados nas espectroscopias realizadas neste trabalho mostradas nas figuras 17 e 18, porém com pequenas alterações, possivelmente devido à diferença na quantidade de material utilizado pois Alvarenga e colaboradores dissecavam os intestinos no 4<sup>o</sup> dia após à alimentação provavelmente uma MPM em início de formação, pouca e jovem.

Figura 17: Espectro de infravermelho para quitina de caranguejo da empresa Sigma



Fonte: Do autor (2022)

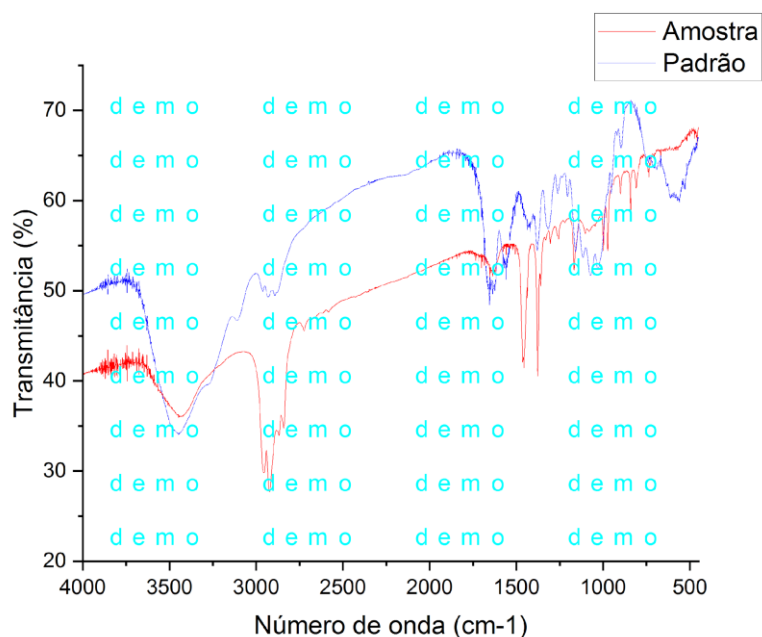
Figura 18: Espectro de infravermelho para quitina encontrada no conteúdo luminal do intestino de *R. prolixus*



Fonte: Do autor (2022)

De acordo com o trabalho realizado Brugnerotto *et al.* (2001), a quitina é formada por N-acetil D-glicosamina e esse composto possui picos característicos no espectro de infravermelho. Dentre esses picos podemos observar o pico da região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  que ocorre devido às vibrações de estiramento axial do grupo OH presente na quitina, sobreposta à banda de estiramento de NH. O pico na região  $2900\text{ cm}^{-1}$ , ocorre devido ao estiramento das ligações C-H. Enquanto as bandas entre  $1700\text{ cm}^{-1}$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$  são características do composto analisado. Bandas próximas a  $1655\text{ cm}^{-1}$  são geradas devido à deformação axial de ligações C=O, presentes na quitina, denominada de amida I, enquanto o pico da região de  $1560\text{ cm}^{-1}$  corresponde à mistura de dois modos vibracionais, N-H no plano e o estiramento C-H, chamada amida II. Os picos encontrados próximo à região de  $1380\text{ cm}^{-1}$  ocorre devido à deformação angular simétrica do grupo CH<sub>3</sub>,  $1313\text{ cm}^{-1}$  devido às ligações C-N e C-H e  $890\text{ cm}^{-1}$  a  $1150\text{ cm}^{-1}$  são bandas de polissacarídeos como descrito na literatura (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001). Já a figura 19 serve como um comparativo direto entre o espectro de quitina de caranguejo e o material encontrado.

Figura 19: Comparação do espectro de infravermelho entre padrão de quitina e o material encontrado



Sendo assim, mesmo apresentando algumas diferenças em alguns picos, os picos característicos de quitina foram visíveis tanto na amostra coletada quanto na quitina padrão da empresa Sigma, sendo um grande indício de que o material encontrado é um tipo de quitina semelhante à quitina padrão, já que dependendo da função do biopolissacarídeo, ele pode apresentar diferentes conformações das cadeias de N-acetil glicosamina. Além de que alguns picos que não são visíveis na amostra podem ser justificados pela quantidade de material analisado ou pela presença de alguma proteína que resistiu aos tratamentos com a enzima papaína e o tratamento com KOH a quente, o que pode ter gerado sinais muito pequenos para serem captados pelo equipamento, além do possível efeito de blindagem.

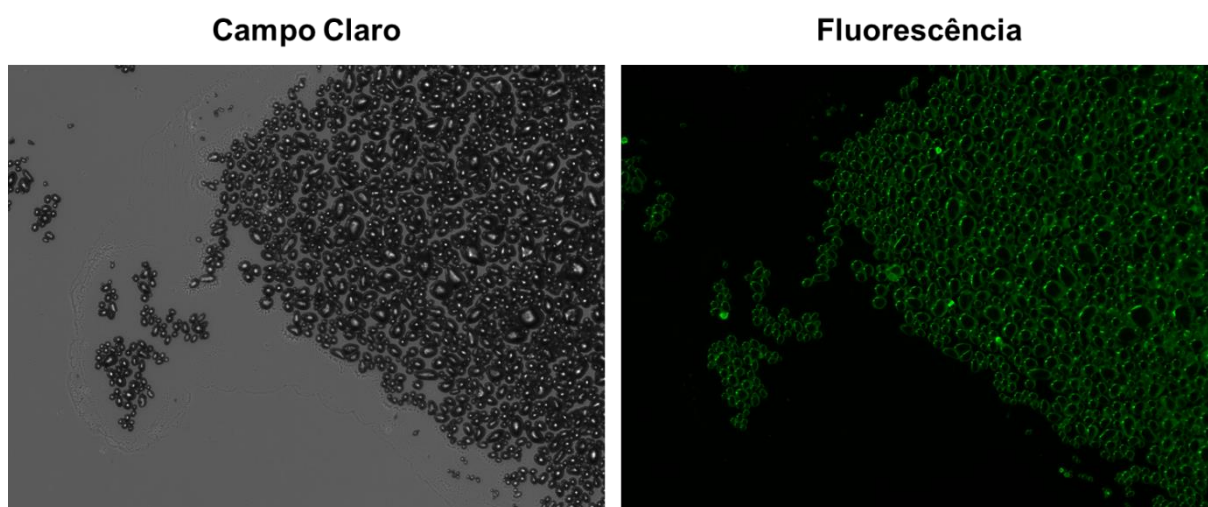
Para a confirmação de quitina no material extraído do lúmen intestinal dos insetos vetores foi realizada a incubação de amido (material sem afinidade pelo marcador fluorescente), quitina de caranguejo da Sigma e o material coletado do intestino como descrito em Material e Métodos. A seguir foi realizada a microscopia de fluorescência desses compostos para a identificação ou não de fluorescência, conforme demonstrado nas figuras a seguir.

Na figura 20 é possível notar a presença de material fluorescente ao redor das gotículas de amido, usado como controle negativo. Isso demonstra a falta de interação entre os dois componentes, já que é visível que no interior das gotículas não estão coradas pela WGA-FITC.

A fluorescência pode ser considerada como um *background*, já que quanto mais lavagens eram realizadas com água destilada, menor era a intensidade da fluorescência.



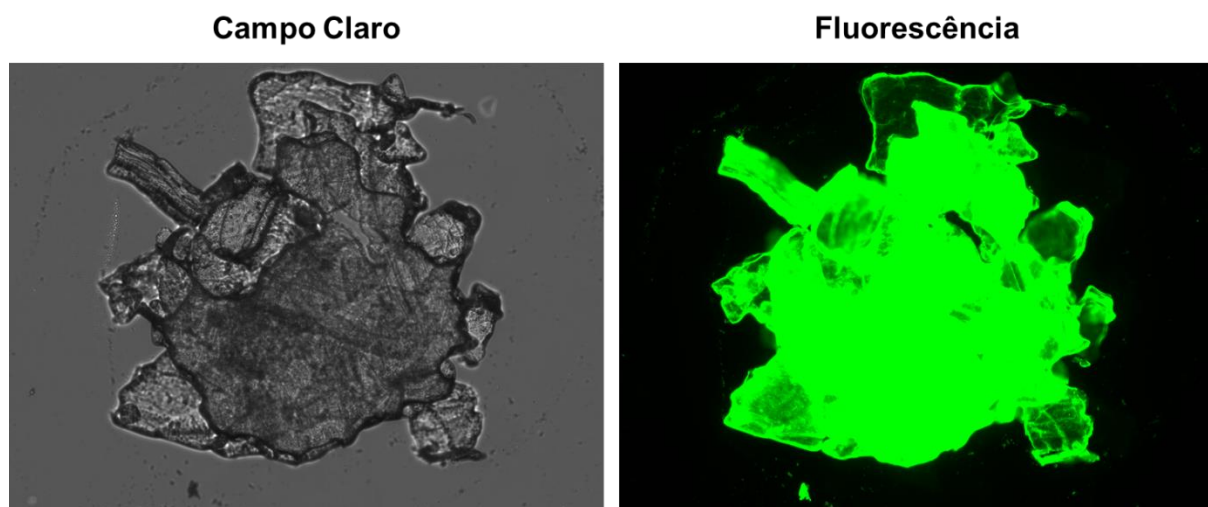
Figura 20: Microscopia de fluorescência de amido



Fonte: Do autor (2022)

A figura 21 se refere à quitina de caranguejo comercial. É possível notar que não há material fluorescente ao redor do material, mas sim ligado por toda a superfície, revelando sua estrutura exatamente como quando é analisada a microscopia em campo claro. Quanto mais lavagens eram realizadas, menor era a intensidade de fluorescência ao redor da partícula, mas a coloração não diminuía no interior do material.

Figura 21: Microscopia de fluorescência de quitina de caranguejo da empresa Sigma

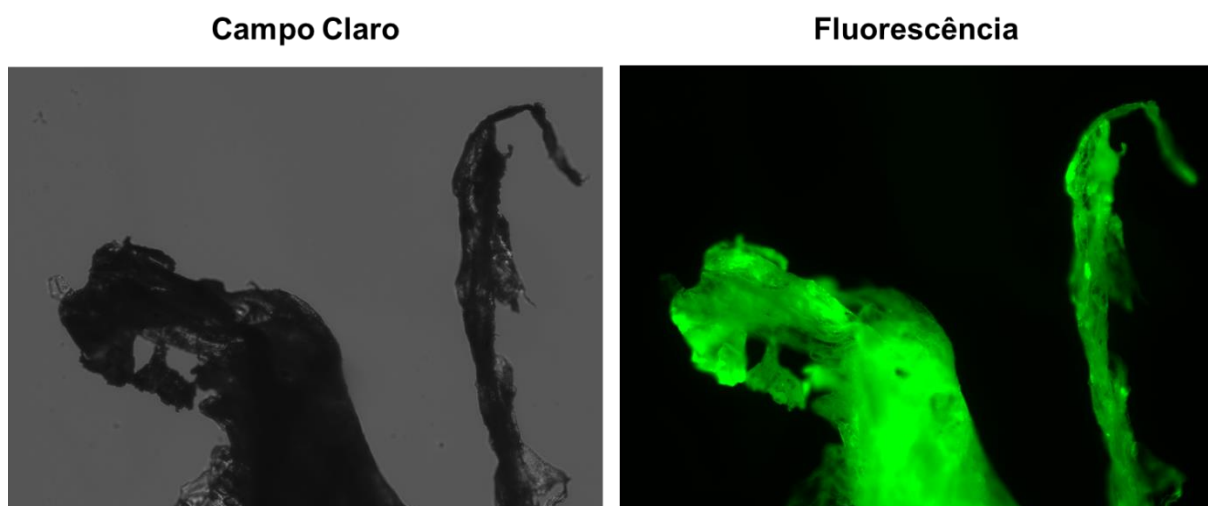


Fonte: Do autor (2022)

A figura 22 se refere à amostra coletada do intestino dos insetos, apresentando uma semelhança na afinidade de ligação com WGA-FITC, semelhante ao que ocorre com a quitina de caranguejo, o sólido se apresenta todo marcado com fluorescência. Também pode ser observado um aspecto mais de fibra e mais maleável da quitina retirada do conteúdo luminal.

Sendo assim é possível constatar que o material coletado do lúmen intestinal de *R. prolixus* é revelado com a sonda fluorescente do mesmo modo que a quitina de caranguejo, ou seja, o polímero de N-acetil glicosamina faz ligação com a sonda WGA-FITC por toda superfície.

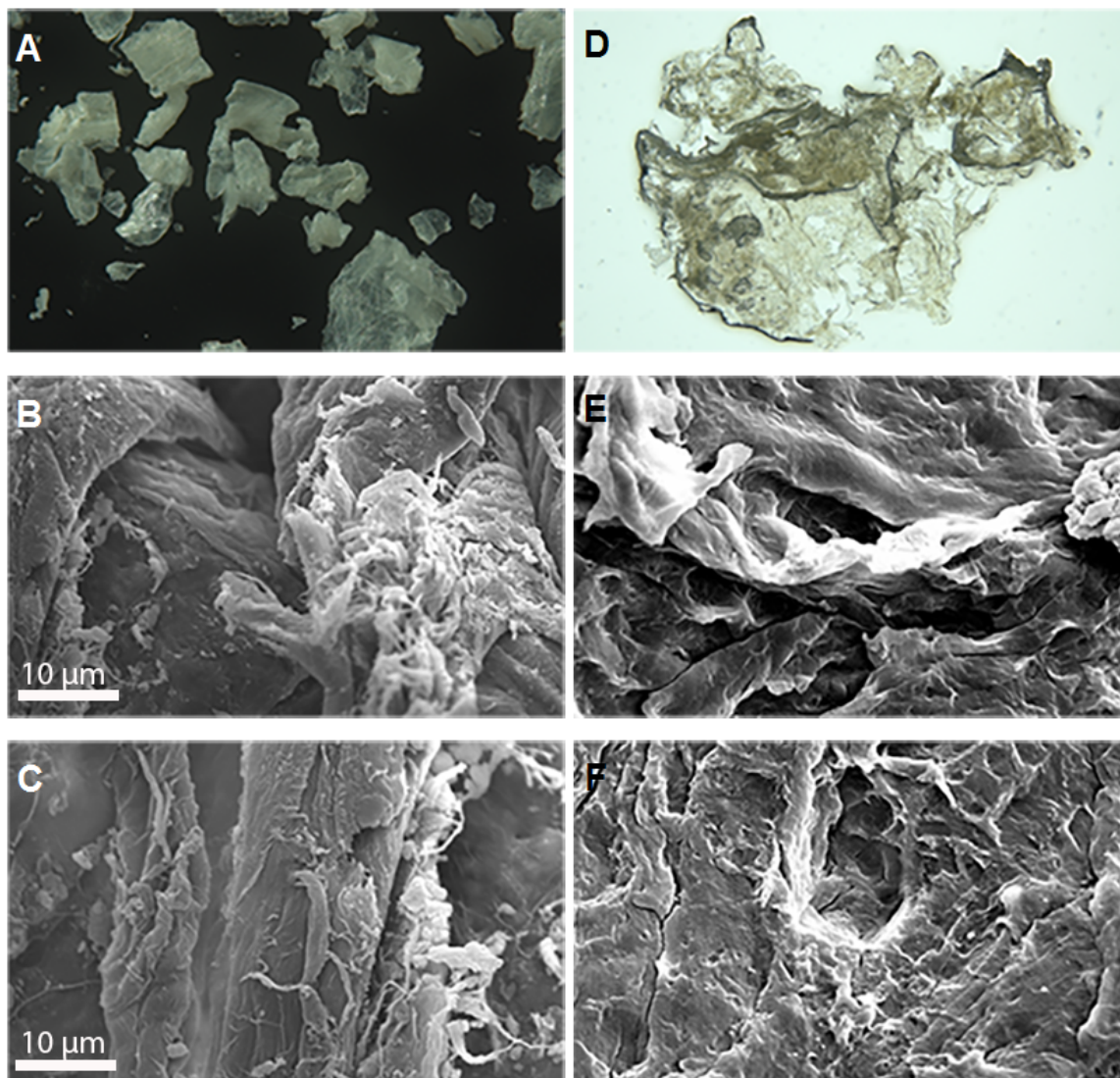
Figura 22: Microscopia de fluorescência do material encontrado



Fonte: Do autor (2022)

As técnicas de microscopia de varredura e fotografia com lupa foram realizadas para analisar a superfície do material extraído do lúmen de *R. prolixus* e comparar com a quitina comercial. Os resultados podem ser analisados nas figuras 23 e 24. De acordo com as figuras 23 e 24 é possível notar semelhanças tanto na análise por fotografia com lupa quanto nas análises de microscopia de varredura (10  $\mu\text{m}$ ), com destaque para a aparência fibrosa, amorfa e quebradiça de ambas.

Figura 23: Fotografias de lupa e microscopia de varredura de quitina de caranguejo e do material encontrado

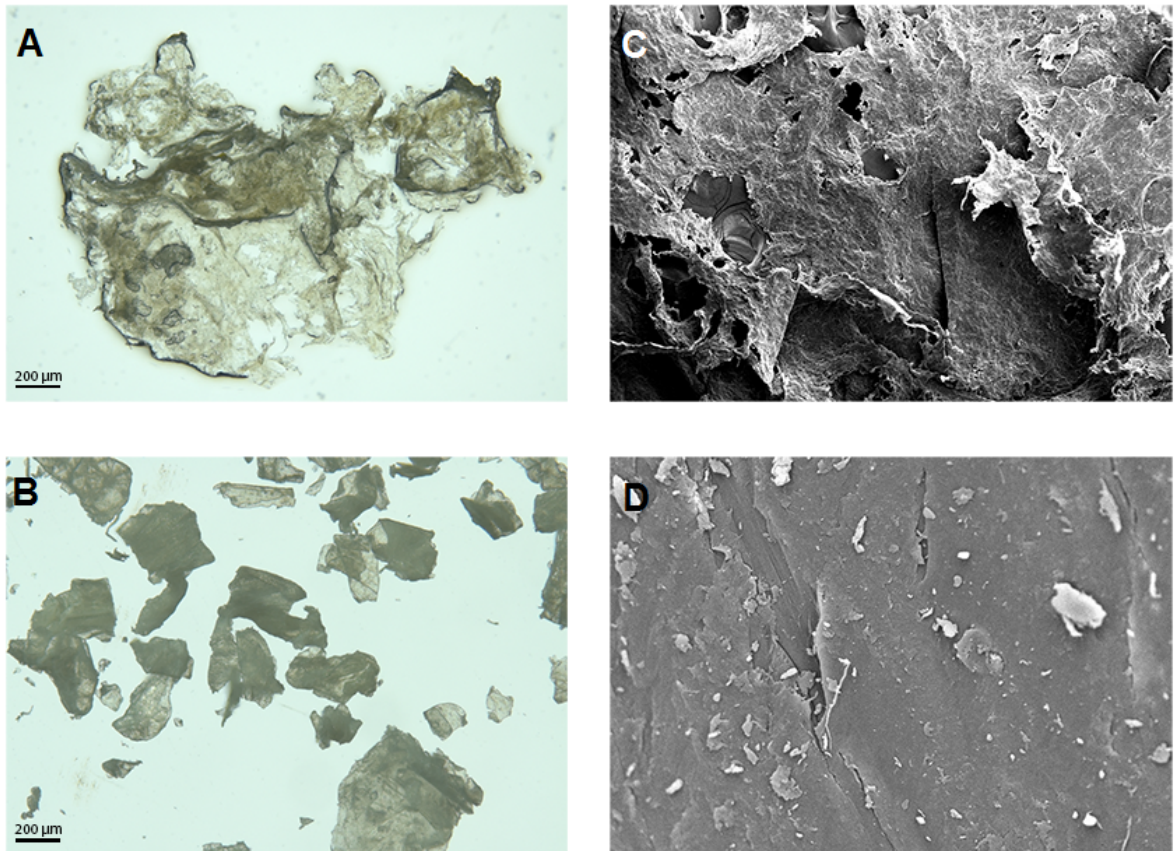


Legenda: A: Fotografia com lupa da quitina comercial de caranguejo. B: Microscopia de varredura da quitina comercial de caranguejo a 10 μm. C: Microscopia de varredura da quitina comercial de caranguejo a 10 μm. D: Fotografia com lupa do material tratado extraído do lúmen intestinal de *R. prolixus*. E: Microscopia de varredura do material tratado extraído do lúmen intestinal de *R. prolixus* a 10 μm. F: Microscopia de varredura do material tratado extraído do lúmen intestinal de *R. prolixus* a 10 μm.

Fonte: Do autor (2022)



Figura 24: Fotografia e microscopia de varredura de quitina de caranguejo e do material encontrado

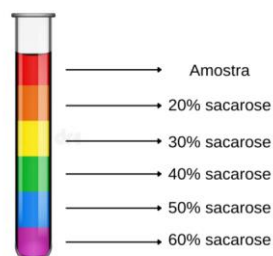


Legenda: A: Fotografia com lupa do material tratado extraído do lúmen intestinal de *R. prolixus* a 10 µm. B: Fotografia com lupa da quitina comercial de caranguejo a 10 µm. C: Microscopia de varredura do material tratado extraído do lúmen intestinal de *R. prolixus* a 200 µm. D: Microscopia de varredura da quitina comercial de caranguejo a 10 µm.

Fonte: Do autor (2022)

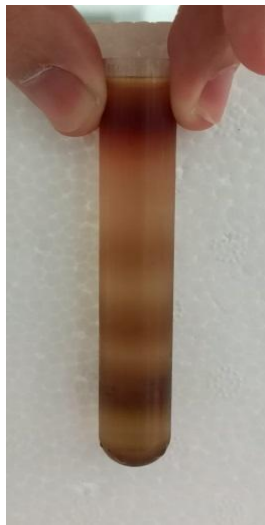
O conteúdo luminal sem tratamento foi incubado com WGA-FITC como descrito em Material e Métodos. Em seguida foi construído um gradiente de sacarose como esquematizado na figura 25.

Figura 25: Representação esquemática do gradiente de densidade com sacarose



Após o processo de ultracentrifugação, o gradiente de sacarose usado para separação por densidade permitiu a separação do conteúdo luminal em diferentes frações, conforme demonstrado na figura 26. Isso permitiu uma análise mais detalhada, visando o isolamento da membrana perimicrovilar.

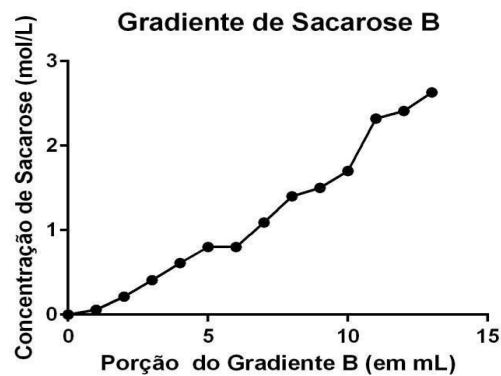
Figura 26: Gradiente de densidade com sacarose após a centrifugação



Fonte: Do autor (2021)

Para identificar a quitina ao longo do gradiente de sacarose foram realizadas análises individuais das diferentes frações. A primeira análise foi a determinação do índice de refração de cada tubo fracionado para calcular a concentração molar de sacarose em cada fração, como descrito em Material e Método. A figura 27 mostra que a concentração de em mol/L por cada 1ml do gradiente fracionado aumenta de maneira linear. A concentração de sacarose em cada fração do gradiente, facilitando o processo de identificação da MPM e a localização da quitina.

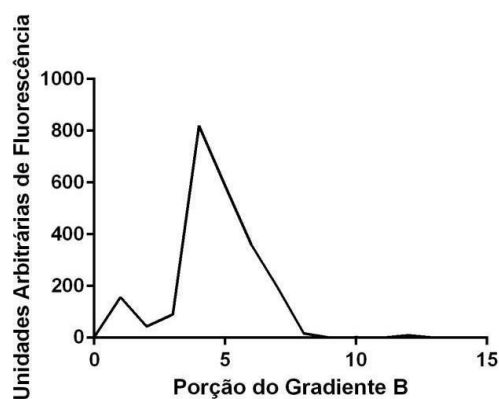
Figura 27: Gráfico de concentração de sacarose por fração individual do gradiente



Fonte: Do autor (2021)

Para a melhor análise e comparação das frações individuais separadas do gradiente de sacarose, foram realizadas as análises por espectroscopia de fluorescência das 13 frações dividindo o resultado fornecido pelo aparelho por 200 (escala arbitrária de fluorescência), conforme mostra a figura 28, para obter melhor análise e visualização gráfica. Pode ser observado que a fluorescência encontra-se um pouco no início do gradiente (20%) onde foi depositada a amostra do lúmen conjugado com WGA-FITC e um pico com muita fluorescência nos tubos 4 e 5, localizando a quitina predominantemente nestes tubos.

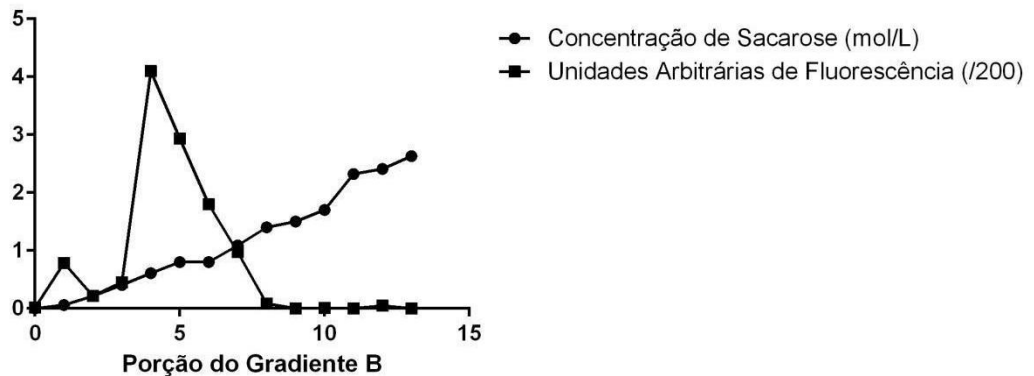
Figura 28: Gráfico de fluorescência por fração do gradiente



Fonte: Do autor (2021)

Para facilitar a visualização da localização da quitina com concentração de sacarose foi realizada a sobreposição dos gráficos de concentração de sacarose e intensidade de fluorescência, conforme demonstrado na figura 29.

Figura 29: Concentração de sacarose e fluorescência nas frações do gradiente

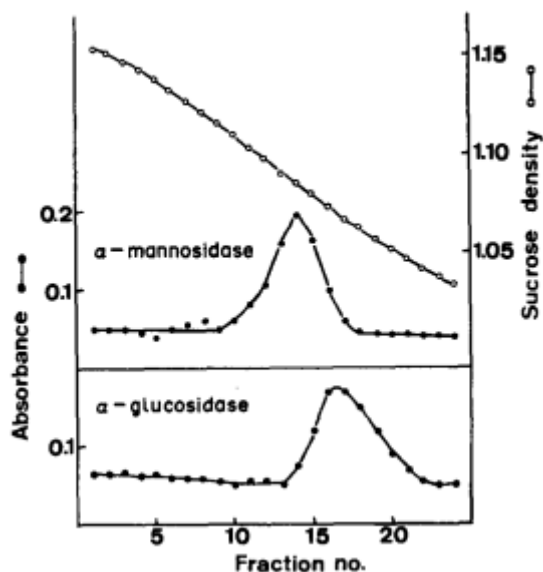


Fonte: Do autor (2021)

Isso indica que a maior incidência de fluorescência ocorre na fração 4, que decai até a fração 9 do gradiente de sacarose, o que se refere à concentração de sacarose aproximada entre 30% e 40%, conforme demonstrado na figura esquemática do gradiente de densidade com sacarose (figura 13).

No trabalho realizado por Ferreira *et al.* (1988), o qual serviu de base para a escolha deste método de separação com gradiente de sacarose, os pesquisadores analisaram proteínas digestivas associadas à membranas microvilares de *R. prolixus* utilizando a técnica de gradiente de densidade com sacarose. Eles separaram o gradiente em alíquotas de 0,2mL e identificaram através da enzima alfa-manosidase e a enzima alfa-glicosidase que são biomarcadores de membrana microvilar e perimicrovilar, a possível localização da densidade da membrana perimicrovilar do inseto, que naquela época era chamada de “membrana dupla”. Como mostrado abaixo.

Figura 30: Identificação da "membrana dupla" no gradiente de densidade



Adaptado de: Ferreira *et al.* (1988)

A interpretação de que uma fração do trabalho realizado por Ferreira *et al.* (1988) corresponde a 0,2mL, ou seja, cada 5 frações do experimento deles correspondem a 1 mL do nosso. Convertendo os resultados para comparação e localização da quitina e da MPM, temos que a maior presença de membrana perimicrovilar, supostamente, de acordo com Ferreira *et al.* (1988) se encontra aproximadamente nas frações 3 a 4 do trabalho aqui realizado e 15 a 20 no trabalho realizado por eles como mostrado no gradiente da Figura 26. Estes resultados também foram corroborados pelos dados de Bittencourt-Cunha *et al.* (2013) que encontrou a MPM pela marcação de lipídios radiativos na concentração de aproximadamente 30-40% no gradiente de sacarose.

Sendo assim, é possível notar que a maior presença de material fluorescente ligado à quitina está na mesma fração das proteínas digestivas ligadas à membrana perimicrovilar de *R. prolixus*.

Para confirmar a localização de quitina na mesma fração da MPM cada fração dos gradientes, tubos de 1 a 13, foram analisados por microscopia de fluorescência nas 13 frações do gradiente de sacarose e as análises podem ser visualizadas abaixo nas figuras 31 a 43.

Nas figuras 31 a 33, que representam as frações 1 a 3 do gradiente de sacarose, quase não se nota a presença de fluorescência, sendo irrelevante se

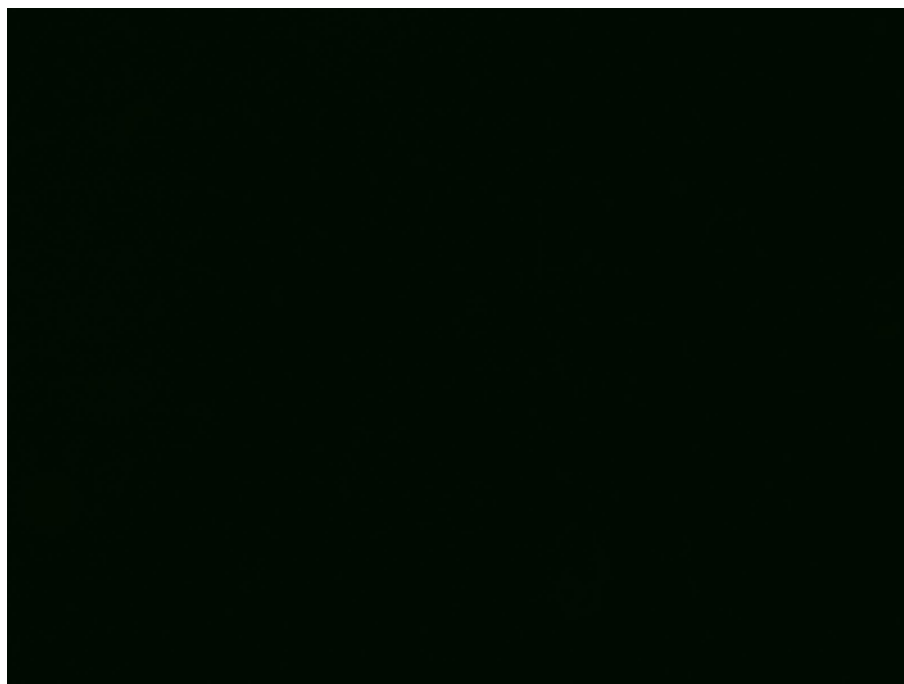


comparada às outras imagens. Isso se dá porque nessa porção encontra-se o material menos denso de toda a amostra, sendo assim, não há nenhuma substância com afinidade por WGA-FITC. Mas as gotículas visíveis nessas regiões podem representar as gotículas do marcador que não se ligaram a nenhum material denso e ficaram soltas no gradiente, na fração de igual densidade. De acordo com as fotografias tiradas é possível identificar estruturas diferenciadas nas frações 4 (figura 34) e 5 (figura 35), sendo que essas são as frações com maior fluorescência conforme demonstrado na análise por espectroscopia de fluorescência realizada na etapa anterior e também onde Ferreira *et al.* (1988) encontraram a possível localização da membrana perimicrovilar. Essas partículas fluorescentes possuem aparência amorfa, fibrosa e mais desenvolvida do que as outras visíveis, sendo semelhantes a pequenos grânulos ou aglomerados estruturais.

As partículas menores, presentes nas outras frações assemelhavam-se às gotículas, podendo ser devido ao arraste da WGA-FITC pelo gradiente sem um ligante específico ou até mesmo o material fluorescente ligado a proteínas contendo fragmentos de N-acetil glicosamina, já que nesta fase do protocolo, o material não foi tratado com a enzima papaína e nem com 10 M KOH a quente.

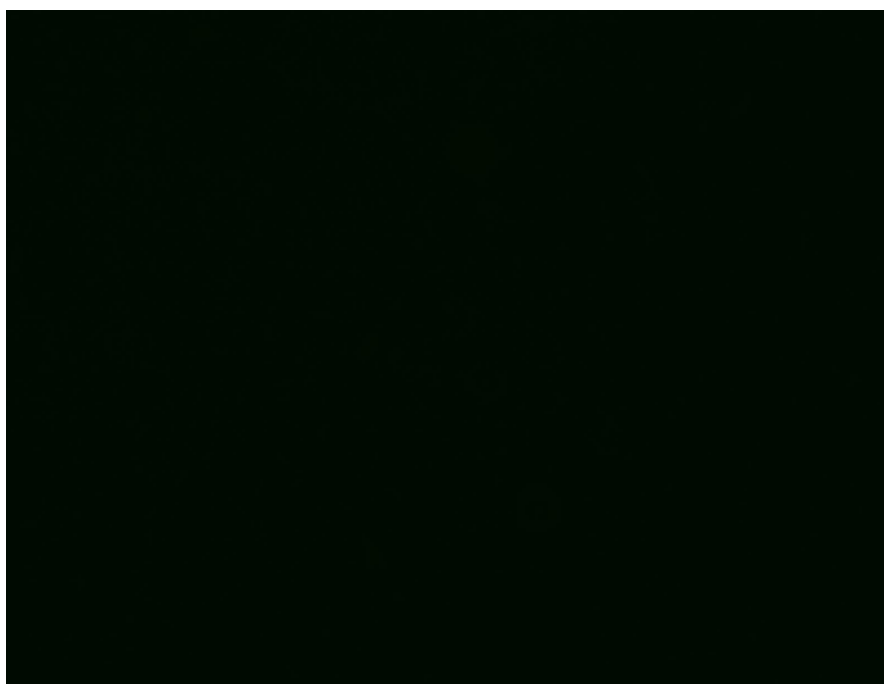
Portanto, através desta análise é possível identificar a presença de materiais semelhantes à quitina com afinidade por WGA-FITC (que se liga às cadeias de N-acetil glicosamina presentes no biopolissacarídeo investigado) com predominância nas porções 4 e 5 do gradiente de sacarose, o que condiz com os experimentos realizados e identificados anteriormente.

Figura 31: Microscopia de Fluorescência da fração 1



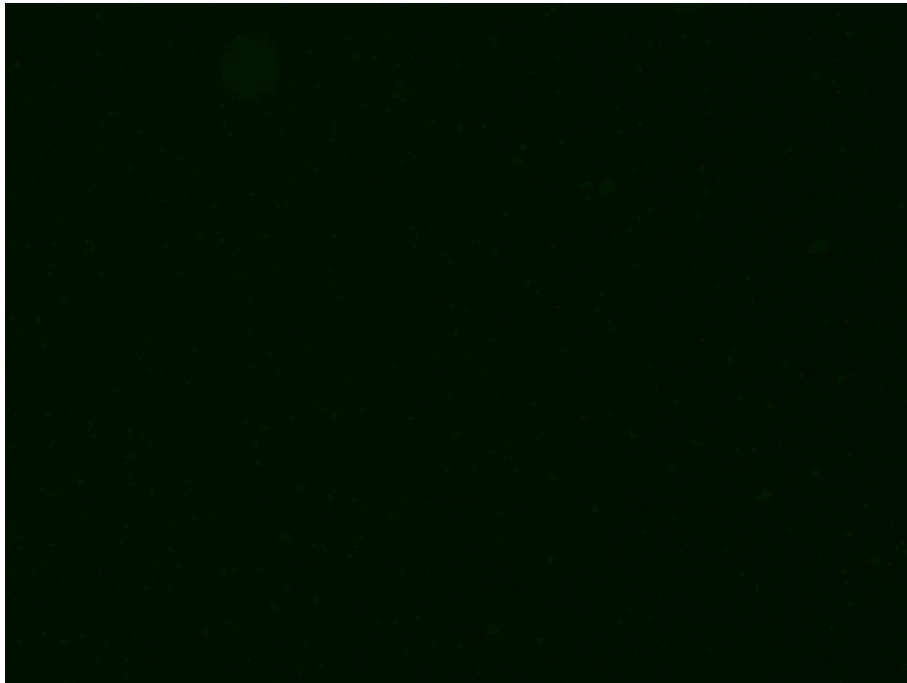
Fonte: Do autor (2022)

Figura 32: Microscopia de Fluorescência da fração 2



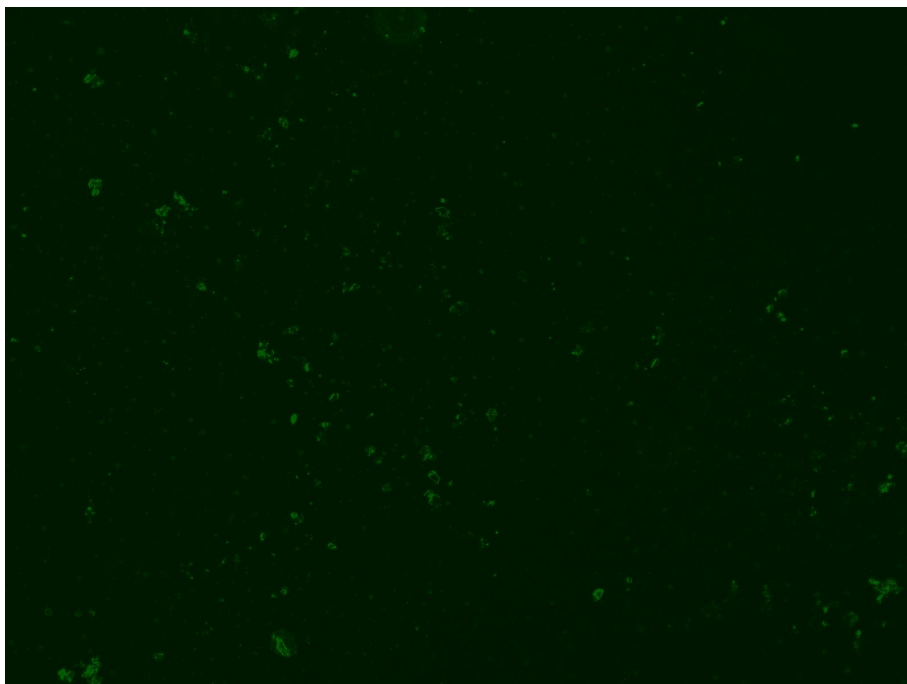
Fonte: Do autor (2022)

Figura 33: Microscopia de Fluorescência da fração 3



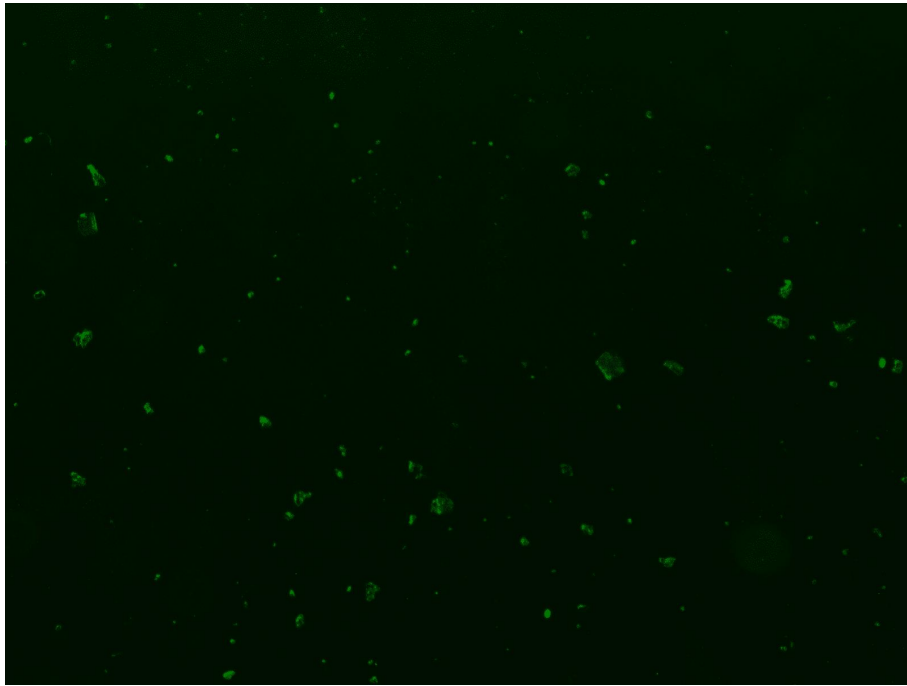
Fonte: Do autor (2022)

Figura 34: Microscopia de Fluorescência da fração 5



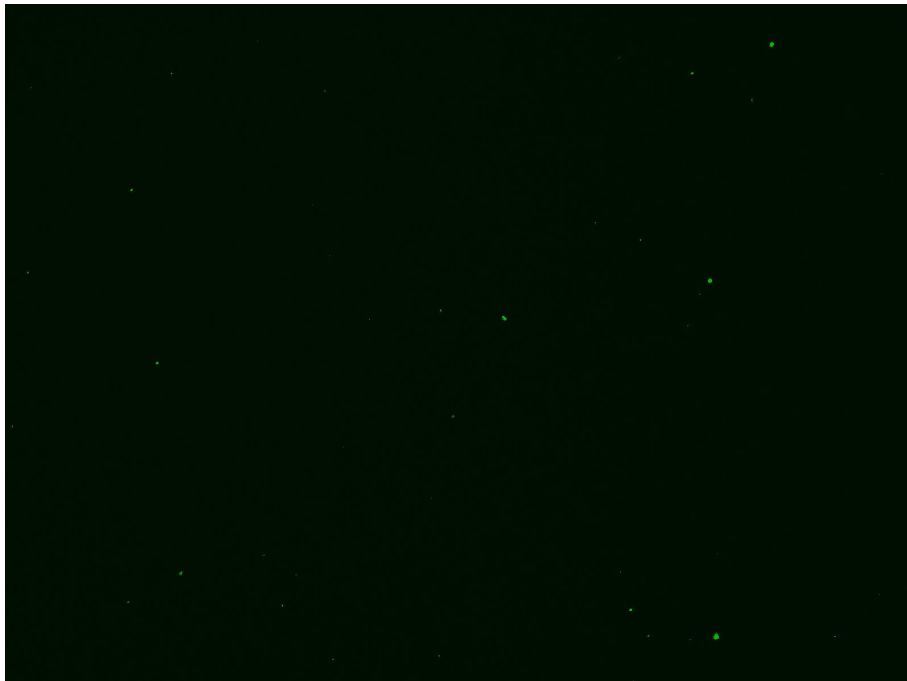
Fonte: Do autor (2022)

Figura 35: Microscopia de Fluorescência da fração 5



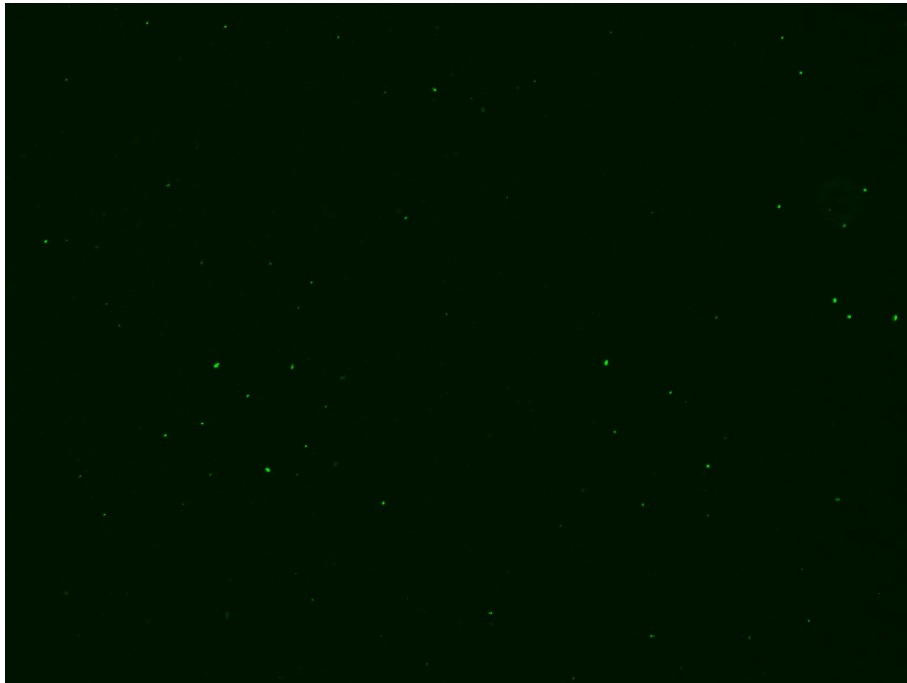
Fonte: Do autor (2022)

Figura 36: Microscopia de Fluorescência da fração 6



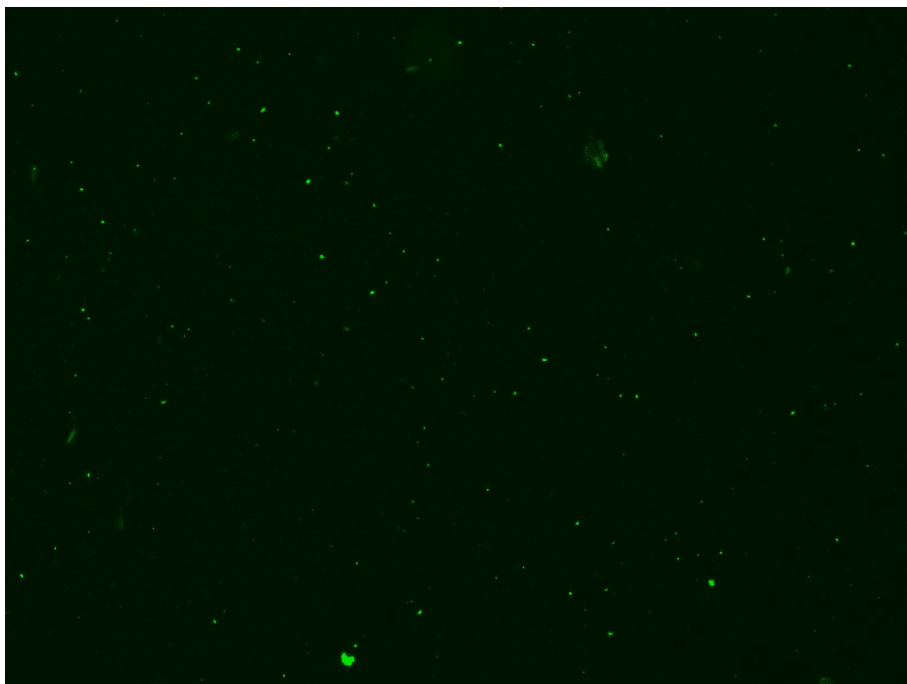
Fonte: Do autor (2022)

Figura 37: Microscopia de Fluorescência da fração 7



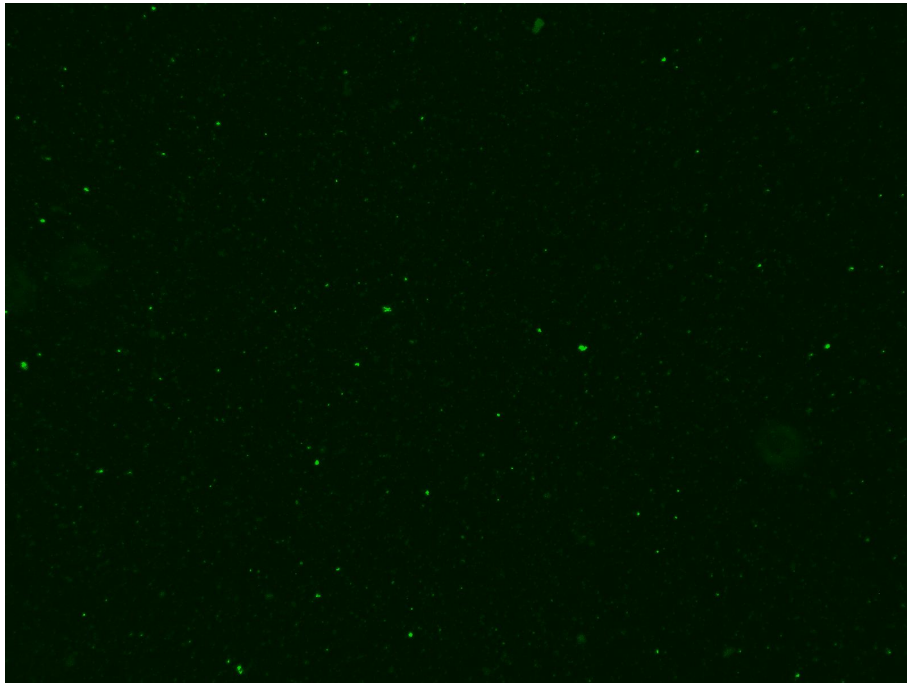
Fonte: Do autor (2022)

Figura 38: Microscopia de Fluorescência da fração 8



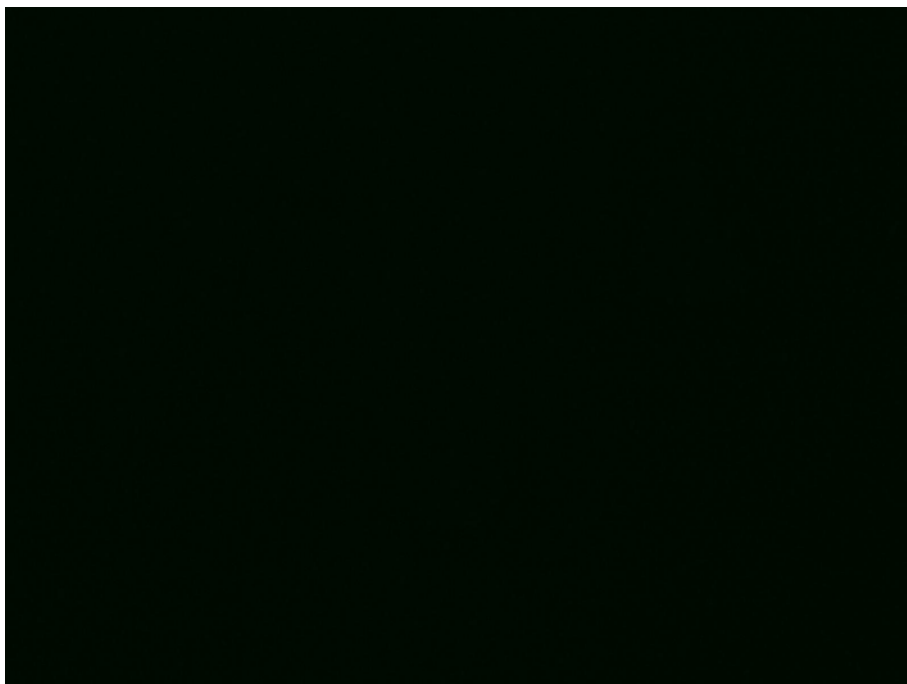
Fonte: Do autor (2022)

Figura 39: Microscopia de Fluorescência da fração 9



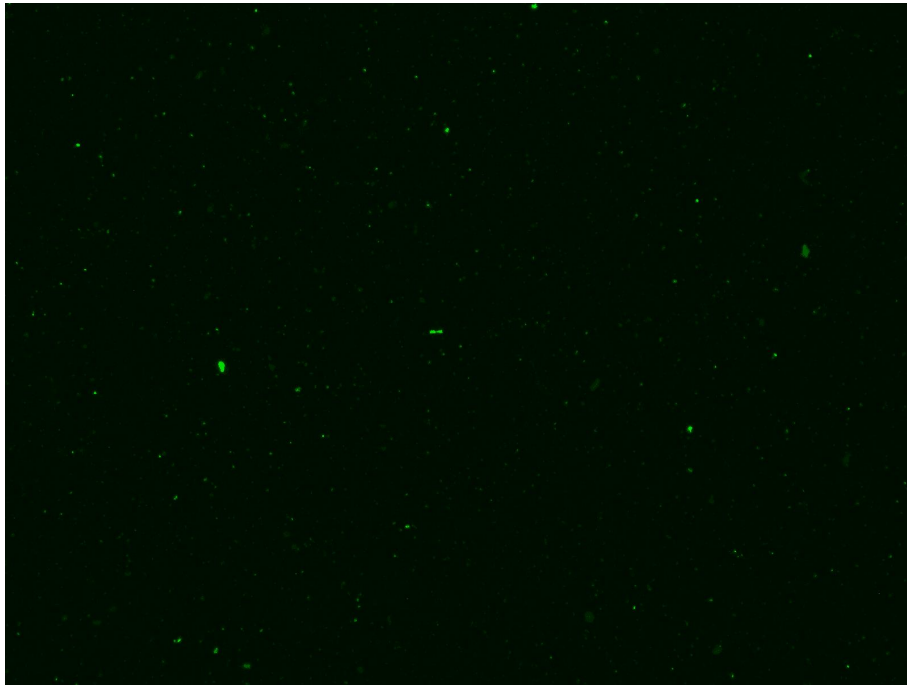
Fonte: Do autor (2022)

Figura 40: Microscopia de Fluorescência da fração 10



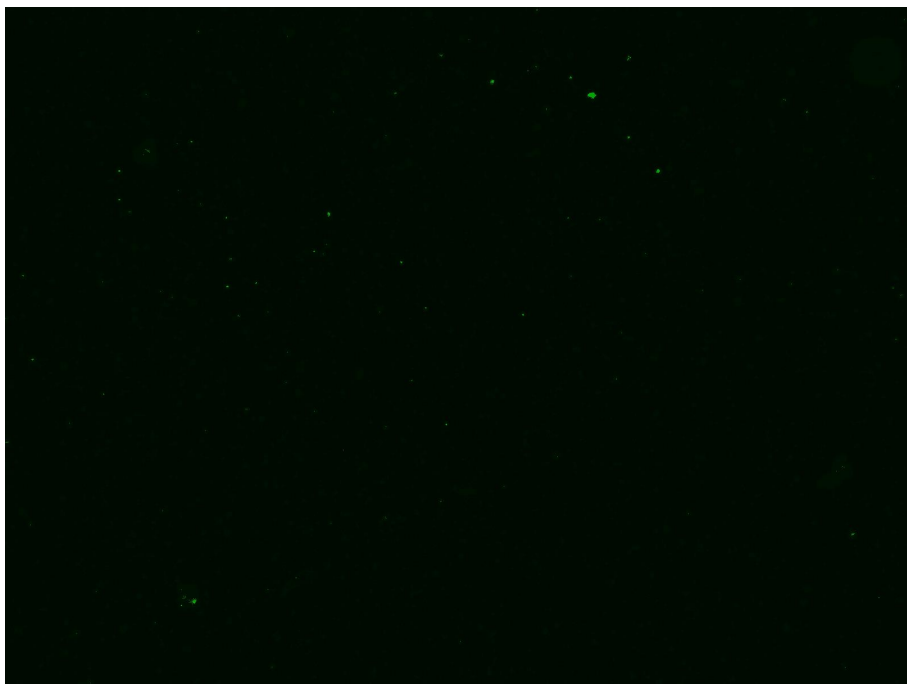
Fonte: Do autor (2022)

Figura 41: Microscopia de Fluorescência da fração 11



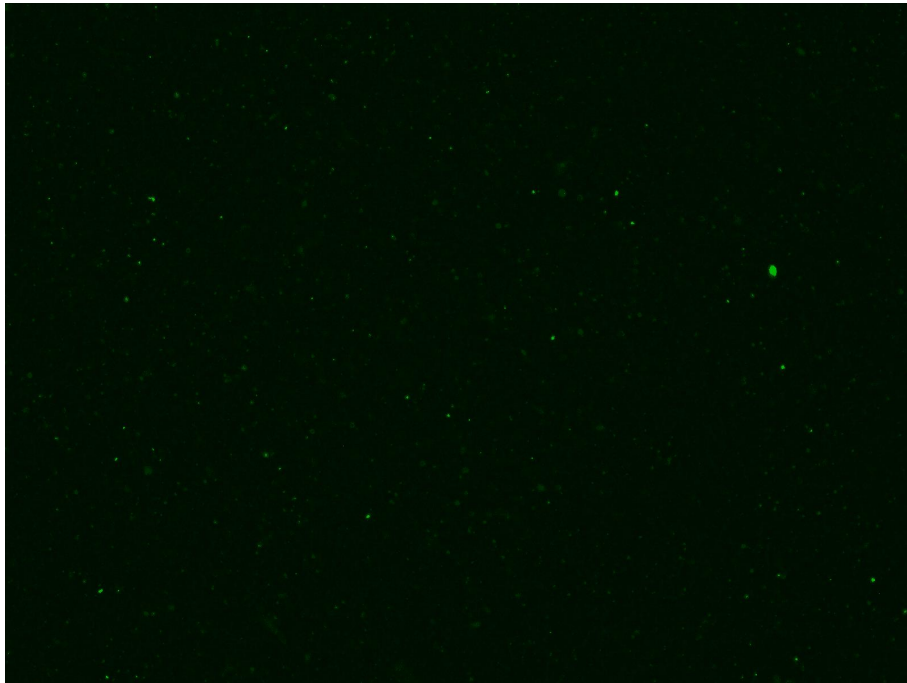
Fonte: Do autor (2022)

Figura 42: Microscopia de Fluorescência da fração 12



Fonte: Do autor (2022)

Figura 43: Microscopia de Fluorescência da fração 13



Fonte: Do autor (2022)

A MPM é uma estrutura essencial para a diferenciação do *T. cruzi* no intestino dos insetos. Nesta estrutura também está envolvida com a digestão do inseto e a formação de hemozoína, polímero de heme, formado dentro do intestino do inseto durante a degradação de hemoglobina no processo da digestão, a formação de hemozoína diminui o estresse oxidativo do barbeiro (MURY *et al.*, 2009, OLIVEIRA *et al.*, 2000). Mais estudos são necessários para caracterizar a função da quitina encontrada na fração da MPM, mas a esta quitina pode estar direta ou indiretamente envolvida com o ciclo de vida do *T. cruzi*, com a digestão e com a formação de hemozoína. Alvarenga *et al.*, (2015) observou que ao silenciar o gene de quitina sintase alterava a digestão do sangue da alimentação do inseto, o intestino de insetos silenciados era volumoso quando comparado aos controles apresentando sangue ainda vivo dentro e com menor quantidade de hemozoína.



## 5 CONCLUSÃO

Com o trabalho aqui apresentado, foi possível analisar e agregar maior conhecimento sobre uma estrutura de extrema importância para um dos principais vetores da doença de Chagas, a membrana perimicrovilar. Essa estrutura está presente em todas as formas de vida de barbeiros vetores da doença e compreender mais sobre ela torna possível maior entendimento das interações parasito-vetor já que estudos comprovam que a MPM é essencial para a diferenciação do *T. cruzi* no intestino dos insetos. Esta estrutura também está envolvida com a digestão do inseto e a formação do polímero de heme para evitar o estresse oxidativo e a quitina pode ter papel relevante nos processos de digestão e redução do estresse oxidativo.

Através dessa pesquisa foi possível investigar e identificar um material muito semelhante à quitina, coletado do conteúdo luminal em maior quantidade principalmente nos dias de 15 a 18 após a alimentação, na mesma fração de densidade do gradiente de sacarose que se encontra a membrana perimicrovilar do inseto vetor. O que também foi confirmado pela identificação do material isolado tratado com hidróxido de potássio sob calor, dessa forma degradando qualquer contaminante que pudesse causar um resultado falso positivo.

A identificação de material semelhante à quitina na mesma porção de densidade da membrana perimicrovilar foi possível graças à identificação desse biopolissacarídeo isolado do conteúdo luminal total e analisados pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, microscopia de fluorescência, microscopia de varredura e fotografia com lupa em comparação com quitina comercial de caranguejo da empresa Sigma. Através desses testes foi possível verificar extrema semelhança entre os materiais. Além de que a separação por densidade tornou possível a confirmação da semelhança através das técnicas de espectroscopia de fluorescência e microscopia de fluorescência após a conjugação do conteúdo luminal de *R. prolixus* com WGA-FITC, material com afinidade de ligação por N-acetil glicosamina, monômero que forma do polímero de quitina.

Para agregar maior conhecimento sobre essas descobertas, estudos para a identificação da afinidade do *T. cruzi* por quitina devem ser realizados *in vivo*, através de técnicas de silenciamento do gene quitina sintase, já que ao silenciar

esse gene, a produção de quitina durante a alimentação do inseto na membrana perimicrovilar será comprometida e será possível comparar a ligação do parasito à MPM do inseto. Além disso, é possível identificar a estrutura da quitina encontrada entre  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  através de técnicas de difração de raios-X e dicroísmo.

Portanto, este trabalho representa um possível avanço no entendimento do sistema estrutural da membrana perimicrovilar, uma estrutura que ainda possui funções desconhecidas e até mesmo pode ser o início da descoberta de uma nova matriz de ligação para o parasito causador da doença de Chagas.

## REFERÊNCIAS

- ABRAM, Ana Pastor de. **Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**. Lima, Peru: Nacional de Ciencia y Tecnología : Centro de Investigación de Alimentos y Desarrollo. 312 p. 2004.
- ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P.; SOUZA, W de; GONZALEZ, M. S.; NOGUEIRA, N. F. Effect of blood components, abdominal distension, and ecdysone therapy on the ultrastructural organization of posterior midgut epithelial cells and perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 99, n. 8, p. 815-822, 2004.
- ALVARENGA, Evelyn S.L.; MANSUR, Juliana F.; JUSTI, Silvia A.; FIGUEIRA-MANSUR, Janaina; SANTOS, Vivian M. dos; LOPEZ, Sheila G.; MASUDA, Hatisaburo; LARA, Flavio A.; MELO, Ana C.A.; MOREIRA, Monica F.. Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 69, p. 61-70. 2016.
- ALVES, C.R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; NOGUEIRA, N.F.; BOURGUINGNON, S.C.; SOUZA, W. de; AZAMBUJA, P.; GONZALEZ, M.S.. Trypanosoma cruzi: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 116, n. 1, p. 44-52, 2007.
- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, p.311-31, 2009.
- AMRI, E.; MAMBOYA F. Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.8, n.2, p.99-104, 2012.-8, 2014.
- ARAKANE, Yasuyuki; SPECHT, Charles A.; KRAMER, Karl J.; MUTHUKRISHNAN, Subbaratnam; BEEMAN, Richard W.. Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 38, n. 10, p. 959-962, 2008.
- AZEVEDO, Dihego Oliveira; NEVES, Clóvis Andrade; MALLETT, Jacenir Reis dos Santos; GONÇALVES, Teresa Cristina Monte; ZANUNCIO, José Cola; SERRÃO, José Eduardo. Notes on Midgut Ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: cimicidae). **Journal Of Medical Entomology**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 435-441, 2009.
- BILLINGSLEY, P.F. & LEHANE, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. **Acta Tropica**. Canada. v. 43, p. 355-366, 1986.
- BILLINGSLEY, Peterf.; DOWNE, A.e.R.. Cellular localisation of aminopeptidase in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: reduviidae) during blood digestion. **Cell And Tissue Research**, [S.L.], v. 241, n. 2, p. 421-428, 1985.

BILLINGSLEY, P. F.; DOWNE, A. E. R.. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: reduviidae). **Canadian Journal Of Zoology**, [S.L.], v. 61, n. 11, p. 2574-2586, 1983.

BIROLI, Willian Garcia; DELEZUK, Jorge Augusto de Moura; CAMPANA-FILHO, Sérgio Paulo. Ultrasound-assisted conversion of alpha-chitin into chitosan. **Applied Acoustics**, [S.L.], v. 103, p. 239-242, 2016.

BITTENCOURT-CUNHA, Paula Rego; SILVA-CARDOSO, Livia; OLIVEIRA, Giselle Almeida de; SILVA, Jose Roberto da; SILVEIRA, Alan Barbosa da; KLUCK, George Eduardo Gabriel; SOUZA-LIMA, Michele; GONDIM, Katia Calp; DANSA-PETRETSKY, Marilvia; SILVA, Carlos Peres. Perimicrovillar membrane assembly: the fate of phospholipids synthesised by the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 108, n. 4, p. 494-500, 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J.. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal Of Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOLOGNESI, Renata; TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency. **Journal Of Insect Physiology**, [S.L.], v. 54, n. 10-11, p. 1413-1422, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. . **Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção**. 2021. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>. Acesso em: 21 set. 2021

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. **Clinica e terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.

BRUGNEROTTO, J; LIZARDI, J; GOYCOOLEA, F.M; ARGÜELLES-MONAL, W; DESBRIÈRES, J; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, [S.L.], v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001.

CALOR, A. R. 2009. **Insecta**. Disponível em: Museu de Zoologia Virtual, Universidade Federal da Bahia, disponível em: <<http://www.mzufba.ufba.br/insetos.html>>. Acesso em 17 ago. 2021.

CAMPANA-FILHO, Sergio P.; BRITTO, Douglas de; CURTI, Elisabete; ABREU, Fernanda R.; CARDOSO, Marcia B.; BATTISTI, Marcos V.; SIM, Priscilla C.; GOY, Rejane C.; SIGNINI, Roberta; LAVALL, Rodrigo L.. Extração, estruturas e propriedades de alfa- e beta-quitina. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CHAGAS, Carlos. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade

morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. . **American Trypanosomiasis**: trypanosoma cruzi. Trypanosoma cruzi. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>. Acesso em: 22 ago. 2021.

FALK, J.E. **Porphyryns and Metalloporphyryns**. New York: Elsevier Publishing Company, 1964.

FERREIRA, Clélia; RIBEIRO, Alberto F.; GARCIA, Eloi S.; TERRA, Walter R.. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. **Insect Biochemistry**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 521-530, 1988.

FERREIRA, Raquel A.; LAZZARI, Claudio R.; LORENZO, Marcelo G.; PEREIRA, Marcos H.. Do Haematophagous Bugs Assess Skin Surface Temperature to Detect Blood Vessels? **Plos One**, [S.L.], v. 2, n. 9, p. 932, 2007.

GONZALEZ, M.S.; HAMED, A.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M.; NOGUEIRA, N.F.S.; SOUZA, W. de; RATCLIFFE, N.A.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S.; MELLO, C.B.. Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 114, n. 4, p. 297-304, 2006.

GUTIÉRREZ-CABRERA, Ana E.; ALEJANDRE-AGUILAR, Ricardo; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Salvador; ESPINOZA, Bertha. Development and glycoprotein composition of the perimicrovillar membrane in *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: reduviidae). **Arthropod Structure & Development**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 571-578, 2014.

GUTIÉRREZ-CABRERA, A.E.; CÓRDOBA-AGUILAR, A.; ZENTENO, E.; LOWENBERGER, C.; ESPINOZA, B.. Origin, evolution and function of the hemipteran perimicrovillar membrane with emphasis on Reduviidae that transmit Chagas disease. **Bulletin Of Entomological Research**, [S.L.], v. 106, n. 3, p. 279-291, 2015.

EL KNIDRI, Hakima; BELAABED, Raja; ADDAOU, Abdellah; LAAJEB, Ali; LAHSINI, Ahmed. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 120, p. 1181-1189, 2018.

KRAMEROV, A.A.; ROZOVSKY, Ya.M.; BAIKOVA, N.A.; GVOZDEV, V.A.. Cognate chitinoproteins are detected during *Drosophila melanogaster* development and in cell cultures from different insect species. **Insect Biochemistry**, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 769-775, 1990.

KROPF, Simone Petraglia; AZEVEDO, Nara; FERREIRA, Luiz Otávio. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 347-365, 2000.

KUMAR, Majeti N.V Ravi. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive And Functional Polymers**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

KUMIRSKA, Jolanta; CZERWICKA, Małgorzata; KACZYŃSKI, Zbigniew; BYCHOWSKA, Anna; BRZOZOWSKI, Krzysztof; THÖMING, Jorg; STEPNOWSKI, Piotr. Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 1567-1636, 2010.

LANA, M.; TAFURI, W. L. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. In: NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 13. ed. Cap. 11. p. 85-108. São Paulo, Sp: Atheneu, 2016.

LAZZARI, C. R., Biologia e Comportamento. In: GALVÃO, C., org. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6. p.64-74. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014

LAZZARI, Claudio Ricardo; PEREIRA, Marcos Horacio; LORENZO, Marcelo Gustavo. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 108, n. 1, p. 34-47, 2013.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P.F.. **Biology of the Insect Midgut**. 486 p. London, UK: Chapman & Hall, 1996.

LEHANE, Michael J.. **The Biology of Blood-Sucking in Insects**. 2. ed. 321 p. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

LOPES, Wilson Araújo; FASCIO, Miguel. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LIDE, David R. "Concentrative properties of aqueous solutions: density, refractive index, freezing point, depression and viscosity." **Handbook of Chemistry and Physics**. 90. ed. Boca Raton, Fl: Crc Press. 2804 p. 2009.

MACALOOD, J.S. et al. Revisiting Carica papaya L. latex potentials may resolve agricultural infestation problems. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v.3, n.1, p.95-98, 2014.

MANSUR, Juliana F.; FIGUEIRA-MANSUR, Janaina; SANTOS, Amanda S.; SANTOS-JUNIOR, Heliomar; RAMOS, Isabela B.; MEDEIROS, Marcelo Neves de; MACHADO, Ednildo A.; KAISER, Carlos R.; MUTHUKRISHNAN, Subbaratnam; MASUDA, Hatisaburo. The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of Rhodnius prolixus. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 98, n. 1, p. 59-67, 2010.

MASSARO, Débora Cristina; REZENDE, Denise Silva; CAMARGO, Luis Marcelo Aranha. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 228-240, 2008.

MOREIRA, Mônica F.; COELHO, Heloisa S.L.; ZINGALI, Russolina B.; OLIVEIRA, Pedro L.; MASUDA, Hatisaburo. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 23-28, 2003.

MOREIRA, Mônica F.; SANTOS, Amanda S. dos; MAROTTA, Humberto R.; MANSUR, Juliana F.; RAMOS, Isabela B.; MACHADO, Ednildo A.; SOUZA, Gustavo H.M.F.; EBERLIN, Marcos N.; KAISER, Carlos R.; KRAMER, Karl J.. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 37, n. 12, p. 1249-1261, 2007.

MURY, F.B.; SILVA, J.R.; FERREIRA, L. S.; FERREIRA, B.S.; SOUZA-FILHO, G.A.; SOUZA-NETO, J.A.; RIBOLLA, P.E.M.; SILVA, C.P.; NASCIMENTO, V.V.; MACHADO, O.L.T.; BERBERT-MOLINA, M.A.; DANSA-PETRETSKI, M. Alpha-Glucosidase Promotes Hemozoin Formation in a Blood-Sucking Bug: An Evolutionary History. **PLoS ONE**, v.4, 2009.

MUTHUKRISHNAN, S. & KRAMER, K. J. Chitin metabolism in insects: a revisit. In: Gilbert, L., I., Iatrou, K., & Gill, S. eds., *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol. 4, **Biochemistry and Molecular Biology**, Chapter 3. Elsevier Press, Oxford, UK., 2005.

OLIVEIRA, Marcus F.; SILVA, José R.; DANSA-PETRETSKI, Marílvia; SOUZA, Wanderley de; BRAGA, Cláudia M.s.; MASUDA, Hatisaburo; OLIVEIRA, Pedro L.. Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Febs Letters**, [S.L.], v. 477, n. 1-2, p. 95-98, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. . Hagas disease in Latin America : an epidemiological update based on 2010 estimates: maladie de chagas en Amérique latine : le point épidémiologique basé sur les estimations de 2010.. **Weekly Epidemiological Record**, [s. l.], v. 90, n. 6, p. 33-44, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis**. [s.l.]: Organização Mundial de Saúde, 2012. 100 p.

PEREIRA, M.H.; SOUZA, M.E.L.; VARGAS, A.P.; MARTINS, M.S.; PENIDO, C.M.; DIOTAIUTI, L.. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). **Acta Tropica**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 255-261, 1996.

PETERS, Werner. **Peritrophic Membranes**. 238 p. (30). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992.

Reynolds, S. **The biology of the insect midgut**. Edited by M.J. Lehane and P.F. Billingsley. Edição XVI London: Chapman & Hall, 1996.

ROCHA, Fernanda Faria. **Cultivo primário da glândula salivar, canal salivar e intestino médio anterior de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) para o estudo moléculas bioativas relacionadas com a hematofagia**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SAGF-8ACMSC>. Acesso em: 21 set. 2021.

ROMOSER, William S.. The vector alimentary system. In: BEATY, Barry J.. **The Biology of Disease Vectors**. Cap. 18. p. 298-317. Niwot, Co: University Press Of Colorado, 1996.

SCHOFIELD, C.J.; GALVÃO, Cleber. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.

SHIGEMASA, Yoshihiro; MATSUURA, Hiroaki; SASHIWA, Hitoshi; SAIMOTO, Hiroyuki. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 237-242, 1996.

SIRVAS-CORNEJO, Susana; PEROCHENA-ESCALANTE, Eduardo. Biotechnological recovery of chitin from crustacean waste. **Revista Peruana de Biología**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 095-102, 2020.

SPINDLER, Klaus-Dieter; SPINDLER-BARTH, Margarethe; LONDERSHAUSEN, Michael. Chitin metabolism: a target for drugs against parasites. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 76, n. 4, p. 283-288, 1990.

TERRA, W R. Evolution of Digestive Systems of Insects. **Annual Review Of Entomology**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 181-200, jan. 1990.

TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, [S.L.], v. 109, n. 1, p. 1-62, 1994.

TERRA, Walter R.. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 47-61, 2001.

**Triatomíneos - O elo de uma enfermidade**. Direção: Fenilton José Vieira. Produção de Genilton José de Oliveira e Leonardo Perim. Brasil: Setor de Produção e Tratamento de Imagem/IOC, 2011. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=xZGv1m-2KEs>> Acessado em 17 de agosto de 2021.



UPADHYAY, R.K. Latex and plant food allergens, its clinical effects and diagnosis: a review. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences**, v.3, p.120-31, 2013.

VARDANIS, A.. An assay system for chitin synthesis in insect tissue. **Life Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 1949-1956, dez. 1976.

ZEISS. **ZEISS Axio Zoom.V16 for Biology**: your fluorescence stereo zoom microscope for large fields. 2022. Disponível em: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/stereo-zoom-microscopes/axio-zoom-v16.html#applications>. Acesso em: 04 jun. 2022.

ZEISS. **MEV EVO 10 Zeiss**: Alternativa inteligente para MEVs de bancada. 2022. Disponível em: <https://www.zeiss.com.br/microscopy/cmp/mab/18/evo-10-br.html>. Acesso em: 04 jun. 2022.