

**Moreno de Souza Rodrigues**

**Aprimoramento e avaliação da eficiência de protótipos da armadilha  
BG-Malária para a captura de adultos de *Anopheles darlingi***

**Belo Horizonte**

**Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**

**2013**

**Moreno de Souza Rodrigues**

**Aprimoramento e avaliação da eficiência de protótipos da armadilha BG-  
Malária para a captura de adultos de *Anopheles darlingi*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a tese de Doutorado em Ciências.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Dr. Álvaro Eduardo Eiras  
Co-orientador: Dra. Ivoneide M Silva

**Belo Horizonte**

**Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**

**2013**

Trabalho desenvolvido no  
Laboratório de Ecologia de Insetos,  
Departamento de Parasitologia  
Vetores da Universidade Federal de  
Minas Gerais em parceria  
Laboratório de Entomologia da  
FIOCRUZ/RO.

*“Existe uma quantidade infinita de números entre o 0 e 1. Obviamente, existe um conjunto ainda maior entre o 0 e o 2, ou entre o a e o 1 milhão. Alguns infinitos são maiores que outros...”*

## **Agradecimentos**

A Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia pela oportunidade a mim oferecida e a CAPES pela bolsa a mim concedida.

Ao professor Álvaro Eduardo Eiras, pela orientação, confiança em mim depositada por toda a sua ajuda e dedicação ao nosso trabalho e, por no decorrer desta jornada, ter tornado um grande amigo meu. À Ivoneide M. Silva, pelos puxões de orelha, pela ajuda e por me ensinar um pouco mais sobre trabalho de campo.

Ao professor Carlos F. Sperber por todo seu ensinamento nas análises estatístico. Ao professor Alexandre A. Silva e a Luiz Herman Gil Soares por terem me aberto às portas do antigo IPEPATRO e terem possibilitado o desenvolvimento desse trabalho

Ao pessoal do laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores, Célia, Lu, Ana, Kelly, Tati, Andrey, Laila, Pri e todos os outros integrantes que durante esse tempo se tornaram pessoas muito queridas das quais irei sentir muito falta em qualquer lugar que eu vá.

Aos amigos Bruno Gomes e Pedro Henrique Correa pelos tempos de república, pela amizade e, pelos momentos de descontração proporcionando ao longo do trabalho de campo. A Frances T. Trindade pelo tempo dedicado a nossa amizade, pelos momentos de discussão científica e pelas horas gastas nas discussões filosóficas.

A Elisangela por me mostrar que todos são capazes de mudar, por ter me suportado quando até eu mesmo não era capaz e por ter me dado, a sua maneira, um lugar para onde eu tivesse vontade de voltar.

A minha família que sempre me incentivou e acreditou em mim. Aos meus irmãos por mesmo longe ainda me ajudarem. A minha mãe pela fé depositada em mim e ao meu pai por toda a determinação em manter meu sonho vivo.

Existe uma série de outras pessoas a quem gostaria, a e acima de tudo a quem tenho que agradecer por esse trabalho ter se tornado real. Alguns me ensinaram ciências, outros me ensinaram coisas cotidianas e há até mesmo, alguns que me ensinaram sobre a vida. Mesmo que seus nomes não estejam aqui em meu coração e em minha mente serei eternamente grato a vocês

A Deus por no decorrer desta jornada ter me dado a força necessária para lutar por um sonho.

## Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Aspectos da doença.....	15
1.2 Vetores de malária.....	20
1.3 Controle da malária.....	25
1.4 Monitoramento de mosquitos vetores.....	27
1.4.1 Respostas a estímulos luminosos.....	30
1.4.2 Respostas a estímulos químicos.....	31
1.5 O papel do CO2 como atrativo.....	34
1.6 Armadilhas para a captura de anofelinos.....	37
1.7 Armadilhas para a captura de <i>Anopheles darlingi</i> .....	41
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>44</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>46</b>
3.1 Objetivos específicos.....	46
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>47</b>
4.1 Área de trabalho.....	47
4.2 Armadilha BG-Malária.....	47
4.3 Aprimoramento do sistema de retenção dos mosquitos na armadilha.....	48
4.3.1 Desenvolvimento de diferentes protótipos de tubo coletor.....	48
4.3.2 Avaliação em campo dos protótipos de tubos coletores.....	49
4.3.3 Avaliação dos protótipos coletores em laboratório: influência do tempo de permanência do mosquito no tubo coletor na quantidade de danos sofrida pelo inseto.....	50
4.4 Aprimoramento dos liberadores de CO <sub>2</sub> .....	51
4.4.1 Desenvolvimento de novos protótipos liberadores de CO <sub>2</sub> .....	51
4.4.2 Avaliação em campo do uso de diferentes taxas de CO <sub>2</sub> como atraente de anofelinos na BG-Malária.....	52
4.5 Utilização de leveduras como atraente em armadilhas BG-Malária.....	52
4.5.1 Desenvolvimento de liberadores de CO <sub>2</sub> utilizando o processo de	52

	fermentação do açúcar por leveduras.....	
	4.5. 2 Avaliação da taxa de captura de anofelinos em armadilhas BG-Malária utilizando liberadores de CO <sub>2</sub> a partir de gelo seco e leveduras.....	53
	4.6 Comparação do novo protótipo da armadilha BG-Malária com a coleta por atração em humanos.....	54
	4.6.1 Comparação da taxa de captura de <i>An. darlingi</i> em armadilhas BG-Malária com a coleta por atração em humanos.....	54
	4.7 Análise de dados.....	55
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
	5.1 Resultados gerais.....	56
	5.2 Aprimoramento do sistema de retenção dos mosquitos na armadilha.....	56
	5.2.1 Avaliação em campo dos protótipos de tubos coletores.....	56
	5.2.2 Avaliação em laboratório dos protótipos coletores: influência do tempo de permanência do mosquito no tubo coletor na quantidade de danos sofrida pelo inseto.....	60
	5.3 Aprimoramento dos liberadores de CO <sub>2</sub> .....	61
	5.3.1 Desenvolvimento de novos protótipos liberadores de CO <sub>2</sub> .....	61
	5.3.2 Avaliação em campo do uso de diferentes taxas de CO <sub>2</sub> como atraente de anofelinos na BG-Malária.....	64
	5.4 Utilização de leveduras como atraente em armadilhas BG-Malária.....	68
	5.4.1 Desenvolvimento de liberadores de CO <sub>2</sub> utilizando o processo de fermentação do açúcar por leveduras.....	68
	5.4.2 Comparação da taxa de captura de anofelinos entre armadilhas BG-Malária utilizando liberadores de CO <sub>2</sub> a partir de gelo seco e leveduras.....	70
	5.5 Comparação do novo protótipo da armadilha BG-Malária com a coleta por atração em humanos	71
	5.5.1 Comparação da taxa de captura de <i>An. darlingi</i> em armadilhas BG-Malária com a coleta por atração em humanos.....	71
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>84</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1 Distribuição das espécies de *Plasmodium* em áreas endêmicas de malária no mundo (área em vermelho). Os pontos correspondem à ocorrência de determinada espécie de Plasmodium na região: Cinza = *Plasmodium falciparum*; Preto = *Plasmodium vivax*; Amarelo = *Plasmodium malariae*; Azul = *Plasmodium ovale*. Fonte: Talman et al. 2007. 16
- Figura 2 Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. (A) Inoculação dos esporozoítos na derme em (i) ou depositado dentro do *pool* de sangue formado após os mosquitos danificarem os capilares sanguíneos; (B) Invasão dos hepatócitos; (C) formação de merozoítos no fígado; (D) Liberação dos merozoítos na corrente sanguínea. 17
- Figura 3 Número estimado de mortes por malária a cada 1000 habitantes. Fonte: (WHO 2010) 18
- Figura 4 Número de casos anual de malária no Brasil. A linha continua em vermelho escuro indica faixa próxima a 300 mil casos. A seta indica o ano 1983, quando ocorreu aumento gradual no número de casos da doença. Fonte Oliveira-Ferreira et al. 2010 19
- Figura 5 Distribuição mundial dos principais vetores de malária. Fonte: Kiszewski et al. 2004) 22
- Figura 6 Flutuação populacional de adultos de *Anopheles* amostrados através da coleta por atração em Humanos em Porto Velho-RO. Fonte: SIVEP – Vetores 28
- Figura 7 Coleta de larvas de mosquitos. (A) Coleta em grande coleção de água utilizando concha coletora (B) Coleta em pequenos reservatórios naturais utilizando pipeta de Pasteur. 29
- Figura 8 Métodos de captura ativa não atrativa de mosquitos adultos: (A) Capturador de Castro (B) Capturador mecânico. 29
- Figura 9 Métodos de captura ativa de mosquitos adultos utilizando iscas atrativas: (A) Atração em humanos, (B) Armadilha luminosa do tipo CDC, (C) Armadilha de Shannon. 30
- Figura 10 *Ifakara tent trap*: (A) Parte externa da armadilha, (B) Desenho esquemático da armadilha. Fonte Govella et al. 2011. 38
- Figura 11 *Resting box*: (A) Armadilha e liberador de CO<sub>2</sub> (B) Posicionamento da armadilha em campo. Fonte: Kweka et al. 2013. 39
- Figura 12 *Mosquito landing box*. (A) Desenho da armadilha, (B) Armadilha em campo. Fonte: Matowo et al. 2013. 40
- Figura 13 Armadilha MM-X: (A) Desenho esquemático e (B) Foto. Fonte: Schmied et al. (2008) 41
- Figura 14 Armadilha BG-Sentinel: (A) Foto, (B) Desenho esquemático da armadilha. G = Malha de cobertura; CB = Funil de entrada; T = Tubo 41

	preto; F= Ventilador de 12 V; BGL = Atraente sintético. Setas indicam o fluxo de ar	
Figura 15	Armadilha BG-Malária: (A) Instalação em campo, (B) Esquema de funcionamento.	44
Figura 16	Protótipos dos coletores avaliados na armadilhas BG-Malária. (A) – Padrão; (B) Sem Funil; (C) Rígido Curto; (D) Rígido Longo. Seta Preta - Funil de entrada do coletor; Seta Branca tracejada - Funil de nylon; Seta preta tracejada - Bolsa coletora; (a) Cobertura de nylon; (b) Cilindro acrílico	49
Figura 17	Sistema de quantificação da taxa de liberação de CO <sub>2</sub> em mL/min.	53
Figura 18	Boxplot de anofelinos danificados nos diferentes protótipos de coletores da armadilha BG-Malária (Belém, PA). Colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa p<0.05.	58
Figura 19	Proporção de anofelinos danificados nos diferentes protótipos de coletores da armadilha BG-Malária (Porto Velho, RO). Colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa p<0.05	59
Figura 20	Número de anofelinos danificados em função da densidade de insetos capturados nos coletores na armadilha BG-Malária. P = Padrão, RC = Rígido curto, RL = Rígido Longo (Regressão D.F = 12; p<0.05).	60
Figura 21	ANCOVA indicando a influência do tempo na proporção de anofelinos danificados nos diferentes protótipos de coletores. P = Padrão; RC= Rígido curto; RL = Rígido Longo	61
Figura 22	Taxa de liberação de CO <sub>2</sub> g/h em liberadores composto por isopor, e mangueira plástica. Diâmetro das mangueiras de liberação: R1 = 2.00mm; R2 = 3.6; R3= 6.62; R4 = de 9.65.	61
Figura 23	Taxa de liberação de CO <sub>2</sub> em liberadores composto por isopor, e mangueira plástica ao longo do tempo. R1 = mangueira 2.00mm; R2 = mangueira 3.6; R3= mangueira 6.62; R4 = mangueira de 9.65.	62
Figura 24	Efeito da temperatura (A) e da umidade (B) na taxa de liberação de CO <sub>2</sub> em liberadores de isopor e mangueira plástica.	63
Figura 25	Taxa de liberação de CO <sub>2</sub> em liberadores composto por isopor, garrafa de alumínio e mangueira plástica. Barras seguidas por letras diferentes indicam diferença estatística (F <sub>51,3</sub> = 29,984; p < 0.05) L1 = mangueira 2,00mm sem garrafa metálica; L2 = mangueira 2,00; L3= mangueira 6.62mm; L4 = mangueira de 9.65mm.	63
Figura 26	Taxa de liberação de CO <sub>2</sub> em liberadores composto por isopor, garrafa de alumínio e mangueira plástica.	64
Figura 27	Média de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> coletada por noite utilizando armadilhas BG-Malária com diferentes liberadores. R1 = mangueira 2.00mm; R2 = mangueira 3.6; R3= mangueira 6.62; R4 = mangueira de 9.65. Barras seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa.	65

- Figura 28 Boxplot de anofelinos capturados por noite com armadilhas BG-Malária utilizando diferentes liberadores. L1 = mangueira 2,00mm sem garrafa metálica; L2 = mangueira 2,00; L3= mangueira 6.62mm; L4 = mangueira de 9.65mm. \* indica diferença significativa ( $p < 0.05$ ). 66
- Figura 29 Boxplot de anofelinos capturados por noite em Candeias do Jamari – RO utilizando armadilhas BG-Malária com os diferentes liberadores. L1 = mangueira 2,00mm sem garrafa metálica; L2 = mangueira 2,00; L3= mangueira 6.62mm; L4 = mangueira de 9.65mm. Colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ). 67
- Figura 30 Taxa de liberação de gás carbônico nas diferentes concentrações de açúcar e levedura. 68
- Figura 31 Influência da temperatura na taxa de liberação de gás carbônico nos diferentes liberadores. Y1 = 10g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y1a = 10g *S. cerevisiae* + 500g açúcar; Y2 = 20g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y2a = 20g *S. cerevisiae* + 500g açúcar; Y3 = 30g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y3a = 30g *S. cerevisiae* + 500g açúcar 69
- Figura 32 Influência do tempo na taxa de liberação de gás carbônico nos diferentes liberadores. Y1 = 10g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y1a = 10g *S. cerevisiae* + 500g açúcar; Y2 = 20g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y2a = 20g *S. cerevisiae* + 500g açúcar; Y3 = 30g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y3a = 30g *S. cerevisiae* + 500g açúcar 69
- Figura 33 Boxplot de *Anopheles darlingi* coletado em Candeias do Jamari e Porto Velho – RO. Colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ). Controle = sem adição de CO<sub>2</sub>; L2 = 220mL/min; L4= 450 mL/min; Lev = 70 mL/min 70
- Figura 34 *Anopheles darlingi* coletados nos diferentes horários em Candeias do Jamari RO em Julho de 2012 e Março de 2013 utilizando armadilhas BG-Malária e coleta por atração em humanos. 72
- Figura 35 Correlação entre a densidade de anofelinos e a quantidade de *Anopheles darlingi* coletada utilizando armadilhas BG-Malária (A) e Atração humana (B). 72

## Lista de tabelas

Tabela 1	Principais espécies de anofelinos vetores de Malária no Brasil.	24
Tabela 2	Espécies de anofelinos coletados entre Março de 2010 a Fevereiro de 2013	56
Tabela 3	Espécies de anofelinos coletados nos diferentes modelos de tubos coletores durante o experimento realizado em Belém-PA. RS= Rígido Curto; RL= Rígido Longo; NB= Sem Funil, ST= Padrão	57
Tabela 4	Espécies de anofelinos coletados nos diferentes modelos de tubos coletores durante o experimento realizado em Porto Velho-RO. . RS= Rigid Short; RL= Rigid Long; NB= No Bag, ST= Standard.	58
Tabela 5	Espécies de anofelinos coletadas utilizando os diferentes liberadores Belém-PA	66
Tabela 6	Espécies de anofelinos coletadas utilizando os diferentes liberadores em Candeias do Jamari – RO	67
Tabela 7	Taxa de liberação de CO <sub>2</sub> utilizando o processo de fermentação por <i>S. cerevisiae</i>	68
Tabela 8	Espécies de mosquitos coletados em Porto Velho (RO) e Candeias do Jamari (RO)	70

## Resumo

Atualmente o método mais utilizado e confiável para o monitoramento de anofelinos é a coleta por atração em humanos. Recentemente a armadilha BG-Malária foi desenvolvida e avaliada na captura de anofelinos apresentando resultados promissores. Entretanto, a armadilha apresentou limitações quanto à integridade dos insetos coletados e o atraente utilizado. Dessa forma, o presente trabalho objetivou: (i) o desenvolvimento de um tubo coletor capaz de manter a integridade dos insetos coletados, (ii) avaliar a resposta de *An. darlingi* a diferentes quantidade de CO<sub>2</sub>, (iii) testar a eficiência de *Saccharomyces cerevisiae* como atrativo em armadilhas BG-Malária e (iv) comparar o novo protótipo da armadilha a coleta por atração em humanos. Os trabalhos de campo foram realizados em Belém – PA, Porto Velho e Candeias do Jamari seguindo o delineamento experimental de quadrado latino onde o número de repetições foi ajustado de acordo com o experimento realizado. As coletas ocorreram nas quatro primeiras horas da escotofase (18:00 – 22:00) e os dados foram analisados no software estatístico R. Os resultados obtidos indicaram que o melhor sistema de contenção de insetos para a armadilha são os confeccionados em material rígido, uma vez que esses danificam uma quantidade menor de insetos quando comparados ao padrão ( $p < 0.05$ ). Ainda, foi verificado que a quantidade de CO<sub>2</sub> utilizada como atraente não aumenta significativamente ( $p > 0.05$ ) a quantidade de *An. darlingi* coletada em armadilhas BG-Malária. Armadilhas iscadas com *S. cerevisiae* capturam significativamente mais insetos do que armadilhas sem a adição de CO<sub>2</sub> ( $p < 0.5$ ), entretanto são menos eficientes do que armadilhas iscadas com gelo seco ( $p > 0.05$ ). Quando comparado à coleta por atração em humanos o novo protótipo da armadilha BG-Malária capturou significativamente menos insetos ( $p < 0.05$ ). Embora o novo protótipo apresente melhora quanto à quantidade de insetos danificados, o mesmo necessita de novos estudos visando à incorporação de outros atraentes para que a quantidade de mosquitos coletadas seja igual ou superior à observada na Atração humana.

## Abstract

Currently the most used and reliable method for monitoring Anopheles mosquitoes is the human landing catch. Recently, the BG-Malaria trap was developed and evaluated in capturing of anophelines presenting promising results. However, the trap had limitations as to the integrity of the insects collected and the attractive used as bait. Thus, this study aimed to: (i) developing a collector tube able to maintain the integrity of the collected insects, (ii) evaluate the response of *An. darlingi* to different amount of CO<sub>2</sub>, (iii) test the efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* as bait in traps BG-Malaria and, (iv) compare the new prototype of the trap with human landing catch. The field work was conducted in Belém - PA, Porto Velho and Candeias do Jamari - RO following the experimental Latin square design where the number of repetitions was adjusted according to the experiment. Samples were collected during the first four hours of scotophase (18:00 to 10:00 p.m.) and the data were analyzed using the statistical software R. The results indicated that the best containment system of insects to the trap are made of rigid material, since such damaging a minor amount of insects when compared to the standard ( $p < 0,05$ ). Further, it was found that the amount of CO<sub>2</sub> used as attractive does not increase significantly ( $p > 0,05$ ), the amount of *An. darlingi* collected in traps BG-Malaria. Traps baited with *S. cerevisiae* capture significantly more beetles than traps without the addition of CO<sub>2</sub> ( $p < 0,5$ ), but are less efficient than traps baited with dry ice ( $p > 0,05$ ). When compared to the collection by human attraction the new prototype BG-Malaria trap captured significantly fewer insects ( $p < 0,05$ ). Although the new prototype developed showed a improves in the amount of insect damaged, it needs further studies aiming the incorporation of other attractive so the amount of collected mosquitoes can be equal or greater than that observed in human attraction.

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos da Malária

Há mais de 130 anos, Charles Laveran descrevia no sangue humano um parasita. A doença decorrida da infecção com esse parasita ficou conhecida como malária e permanece como um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade (Raghavendra et al. 2011, WHO 2012). A malária é causada pela reprodução de protozoários do gênero *Plasmodium* no sangue humano, sendo o mesmo transmitido por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* (Diptera: Culicidae). O protozoário está inserido dentro da ordem Haemosporidia, na qual são descritos quatro gêneros de parasitas, *Haemoproteus* (202 espécies), *Hepatocystis* (202 espécies), *Leucocytozoon* (91 espécies) e *Plasmodium* (199 espécies), capazes de infectar aves, mamíferos e répteis (Martinsen et al. 2008). Atualmente, dentro do grupo de *Plasmodium* são descritas cinco espécies capazes de infectar o homem: (i) *Plasmodium falciparum*, (ii) *P. vivax*, (iii) *P. malarie*, (iv) *P. ovale* e (v) *P. knowlesi* (Lee et al. 2011, William et al. 2013).

*P. falciparum* é encontrada em todas as regiões endêmica para malária, embora sua incidência seja variada (e.g 15% continente sul americano e > 80% continente africano). Já *P. vivax* está distribuído em regiões tropicas ou de clima temperado, principalmente em países fora do continente africano, como por exemplo, Brasil, Venezuela entre outros. Essa espécie é responsável por cerca de 80% dos casos de malária no continente sul americano, enquanto que no continente africano apresenta uma baixa incidência (Figura 1) (Carlton et al. 2011).

Os casos de malária causados por *P. ovale* estão restritos ao continente africano, enquanto que infecções ocasionadas por *P. malarie* são mais comuns na região da África subsaariana e sudoeste do pacífico, embora possa ser encontrado em outras regiões tropicais como é o caso da América do Sul, América Central e algumas regiões da Ásia (Mueller et al. 2007). Ambas as espécies apresentam uma baixa incidência não ultrapassando 4% nas regiões

onde ocorrem. (Talman et al. 2007, Oliveira-Ferreira et al. 2010, WHO 2010). A quinta espécie com capacidade de infectar o homem é o *P. knowlesi*. Sua descrição em humanos ocorreu há cerca de 10 anos atrás após o seu diagnóstico molecular em 120 pessoas na região de Kapit na ilha de Borneo (Singh et al. 2004, Lee et al. 2011)

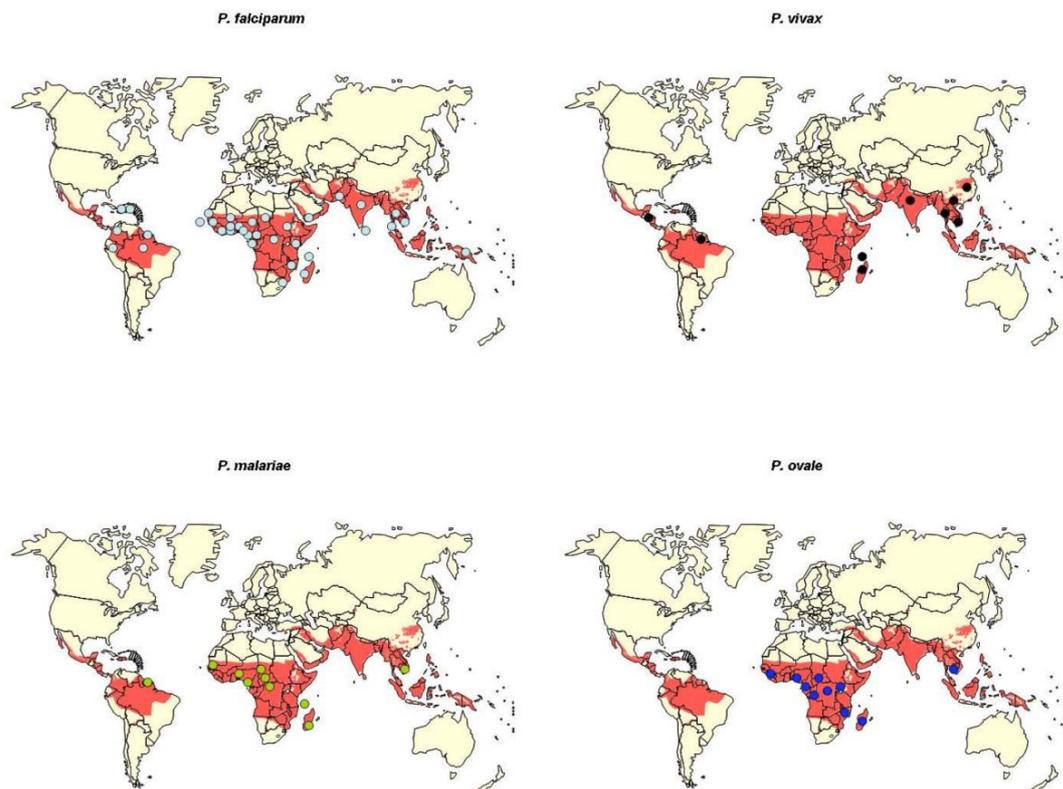


Figura 1. Distribuição das espécies de *Plasmodium* em áreas endêmicas de malária no mundo (área em vermelho). Os pontos correspondem à ocorrência de determinada espécie de Plasmodium na região: Cinza = *Plasmodium falciparum*; Preto = *Plasmodium vivax*; Amarelo = *Plasmodium malariae*; Azul = *Plasmodium ovale*. Fonte: Talman et al. 2007.

O ciclo de vida do *Plasmodium* no ser humano se inicia após a inoculação, por fêmeas de anofelinos, dos esporozoítos na derme (Figura 2A); devido a sua motilidade alguns esporozoítos invadem os capilares sanguíneos da derme migrando para os hepatócitos (fígado) (Figura 2B), no fígado ocorre a esquizogônia exoeritrocítica com formação de merozoítos (Figura 2C) (Kappe et al. 2003, Tuteja 2007). Após essa fase ocorre o rompimento do hepatócito infectado e os merozoítos são liberados na corrente sanguínea onde infectam os glóbulos vermelhos dando início a um novo processo de esquizogônia (ciclo eritrocítico)

(Figura 2D). Durante o ciclo eritrocítico ocorre a formação de gametócitos (macrogameta e microgameta) os quais, quando ingeridos por fêmeas de anofelinos durante a alimentação sanguínea, sofrem processo de esporogonia originando novos esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito sendo inoculados no hospedeiro durante o repasto sanguíneo, reiniciando assim o ciclo (WHO 2012).

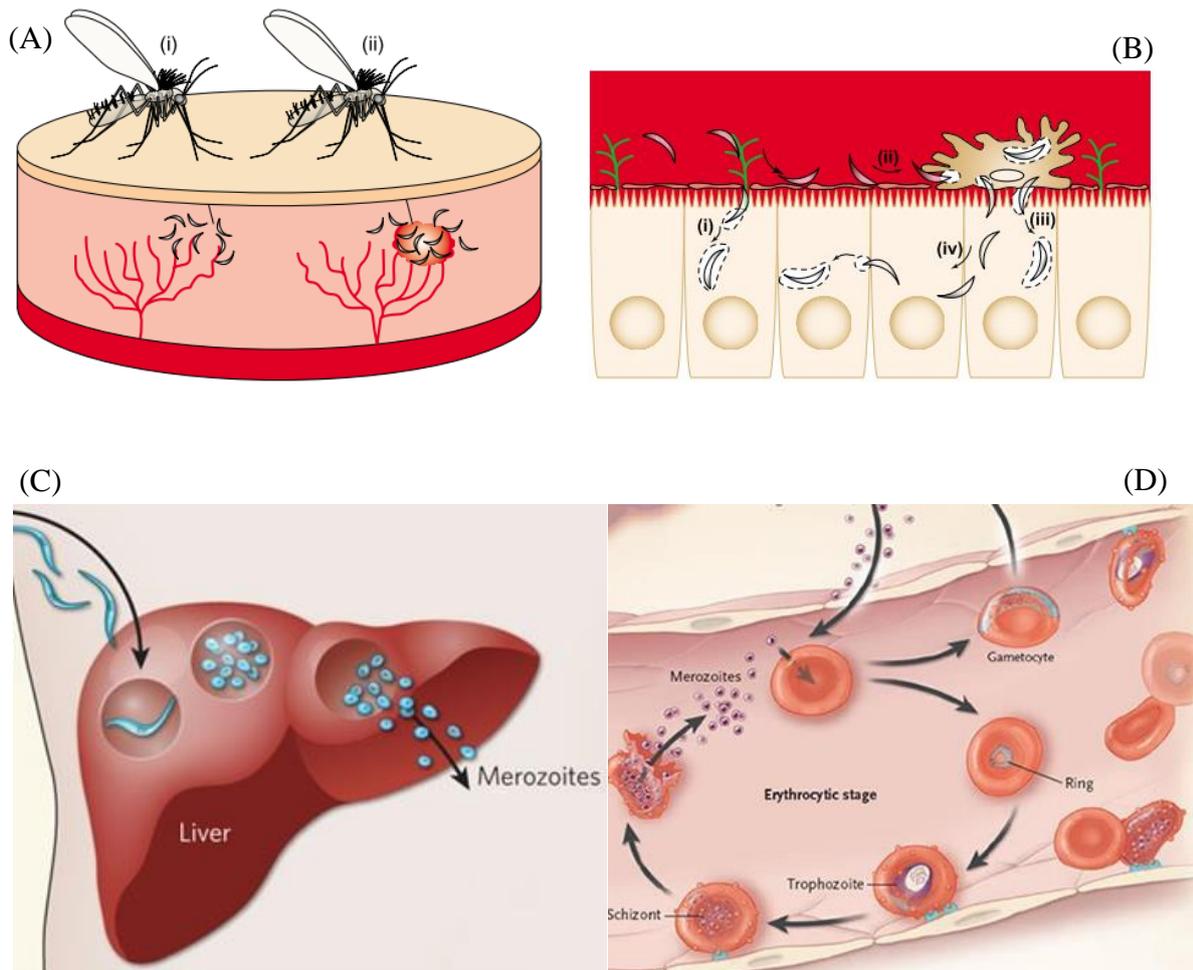


Figura 2. Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. (A) Inoculação dos esporozoítos na derme em (i) ou depositado dentro do *pool* de sangue formado após os mosquitos danificarem os capilares sanguíneos; (B) Invasão dos hepatócitos; (C) formação de merozoítos no fígado; (D) Liberação dos merozoítos na corrente sanguínea.

Cerca de 40% da população mundial habita áreas endêmicas ou de risco de transmissão de malária e são registrados cerca de 230 milhões de casos por ano no mundo, dos quais pelo menos 800 mil sofrem complicações levando o paciente à morte (WHO 2012). Essas mortes ocorrem principalmente em países africanos (Figura 3) sendo que, crianças com

idade inferior a cinco anos e gestantes são as mais afetadas (Dery et al. 2010, Raghavendra et al. 2011).

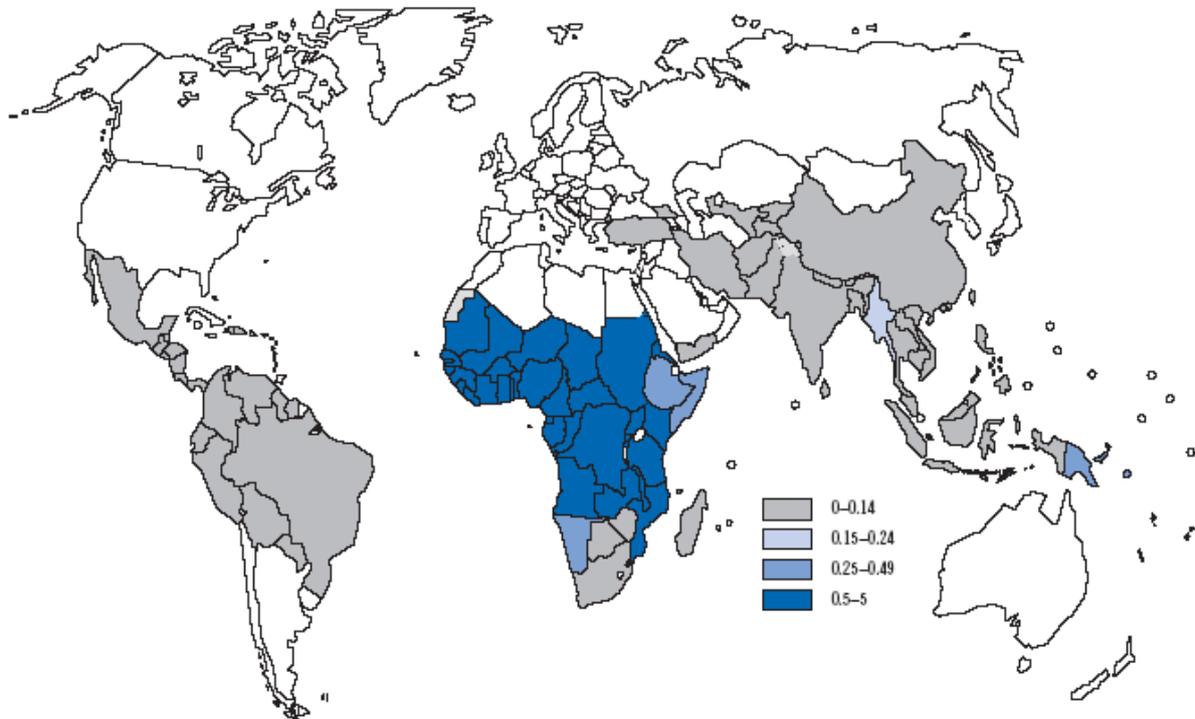


Figura 3. Número estimado de mortes por malária a cada 1000 habitantes. FONTE: (WHO 2010)

Os sinais da doença são evidenciados durante o ciclo eritrocítico e a febre vem precedida de sinais e/ou sintomas inespecíficos (e.g mal estar, cefaleia, cansaço e/ou dores muscular). Após esse período se iniciam os calafrios seguidos por episódios febris elevando bruscamente a temperatura corpórea. Esse primeiro ataque febril dura de duas a seis horas e após esse período ocorrerá sudorese profunda e fraqueza intensa. Posteriormente a febre assumirá caráter intermitente sendo que o ciclo poderá se repetir a, aproximadamente, cada 48 horas para infecções com *P. falciparum* e 72 horas para *P. vivax*. Caso não tratada a doença pode evoluir para quadro de anemia severa, icterícia acentuada, insuficiência renal, hipertermia e malária cerebral podendo levar o paciente a morte (Malik et al. 2000, Carter & Mendis 2002).

No Brasil, a doença é de caráter endêmico da região Amazônica, e a dinâmica de transmissão varia de acordo com aspectos de natureza econômica, social, ecológica e cultural. Fora da região amazônica o número de casos é baixo, resultando basicamente da introdução do parasito na área por portadores provenientes da região amazônica (Guimarães et al. 2004, Marques et al. 2008). Aproximadamente 85% dos casos da doença são causados por *P. vivax* enquanto que a incidência de *P. falciparum* é de apenas 15% e poucos casos de *P. malariae* são registrados anualmente. Esse panorama se deve principalmente as diferenças no ciclo dos protozoários, uma vez que o aparecimento de gametócitos em pacientes infectados com *P. falciparum* ocorre entre 8 a 10 dias após a infecção enquanto que em pacientes com *P. vivax* o tempo é de aproximadamente três dias, assim, as medias de controle adotadas pelo governo na década de 90 foram mais eficientes para a “malária falciparum” levando a um aumento no número de casos de “malária vivax” (Figura 4) (Oliveira-Ferreira et al. 2010).

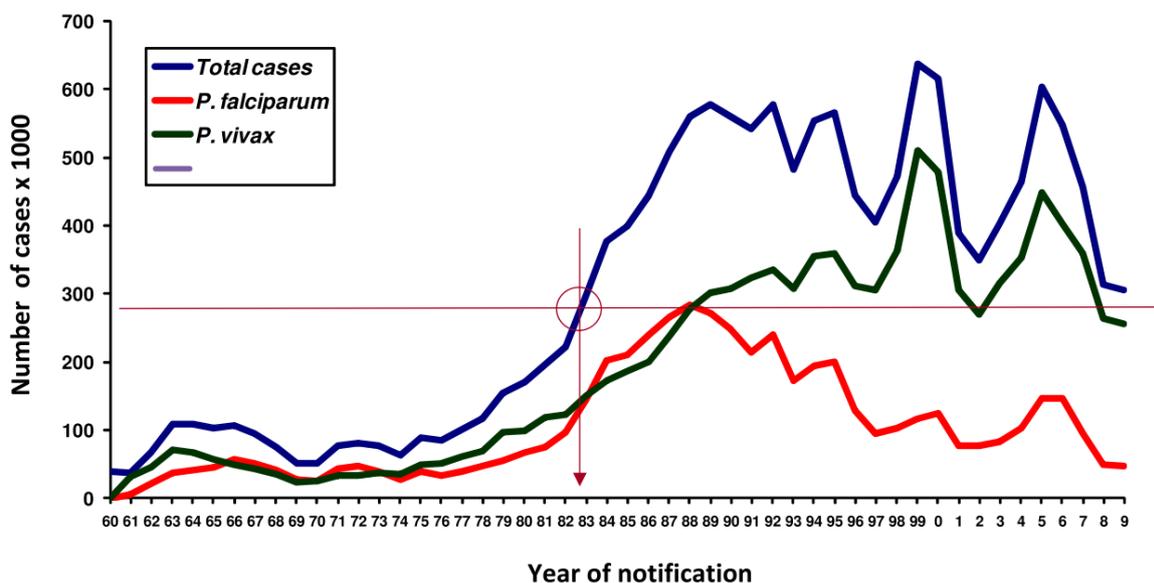


Figura 4. Número de casos anual de malária no Brasil. A linha contínua em vermelho escuro indica faixa próxima a 300 mil casos. A seta indica o ano 1983, quando ocorreu aumento gradual no número de casos da doença. Fonte Oliveira-Ferreira et al. 2010

Comumente a malária causada por *P. vivax* apresenta morbidade e mortalidade inferior à causada por *P. falciparum*, de forma que ainda não há uma definição de malária grave para

“malária vivax”, no entanto, nos últimos anos um padrão incomum de complicações clínicas com casos fatais associados a *P. vivax* foram relatados no Brasil (Oliveira-Ferreira et al. 2010).

## 1.2 Vetores de Malária

Os anofelinos são encontrados em regiões tropicas e neotropicais, sendo que, até o ano de 2004 haviam sido descritas 476 espécies (Kiszewski et al. 2004), das quais aproximadamente 100 são incriminadas como vetores ou potenciais vetores de malária em humanos (Harbach 2007, Raghavendra et al. 2011). São caracterizados por apresentarem os palpos maxilares com o comprimento equivalente ao da probóscide e as antenas mais curtas do que esta. Além disso, apresentam o mesonoto alongado e o escutelo com a margem arredondada (Forattini 2002). Do ponto de vista sistemático, distribuem-se em sete subgêneros (i) *Anopheles*, (ii) *Cellia*, (iii) *Stethomyia* (iv) *Nyssorhynchus* (v) *Kertessia*, (vi) *Lophopodomyia* e (vii) *Baimaia*, dos quais *Anopheles*, *Nyssorhynchus* e *Cellia* englobam o maior número de espécies (Forattini 2002, Harbach 2007).

A ocorrência de determinada espécie em área endêmica está relacionada com a fitofisionomia da região. Dessa forma, em diferentes áreas, são reportadas diferentes espécies de anofelinos como principal(is) vetor(es) da doença. Por exemplo, no Sul Asiático, *An. stephensi*, *An. culicifacies*, *An. fluviatilis*, *An. minimus*, *An. dirus*, *An. aconitus* e *An. maculates* são os principais vetores de malária (Klinkenberg et al. 2004, Sharma et al. 2006); já no leste Asiático as principais espécies são *An. stephensi*, *An. arabiensis* e *An. culicifacies* (Al-Taiar et al. 2009); enquanto que, na África, principal continente afetado pela doença, são encontradas as espécies do complexo *Anopheles gambiae* (*An. gambiae* s.s., *An. arabiensis*) (Coetzee et al. 2000, Ebenezer et al. 2012) e do complexo *Anopheles funestus* (Coetzee & Fontenille 2004) (Figura 5).

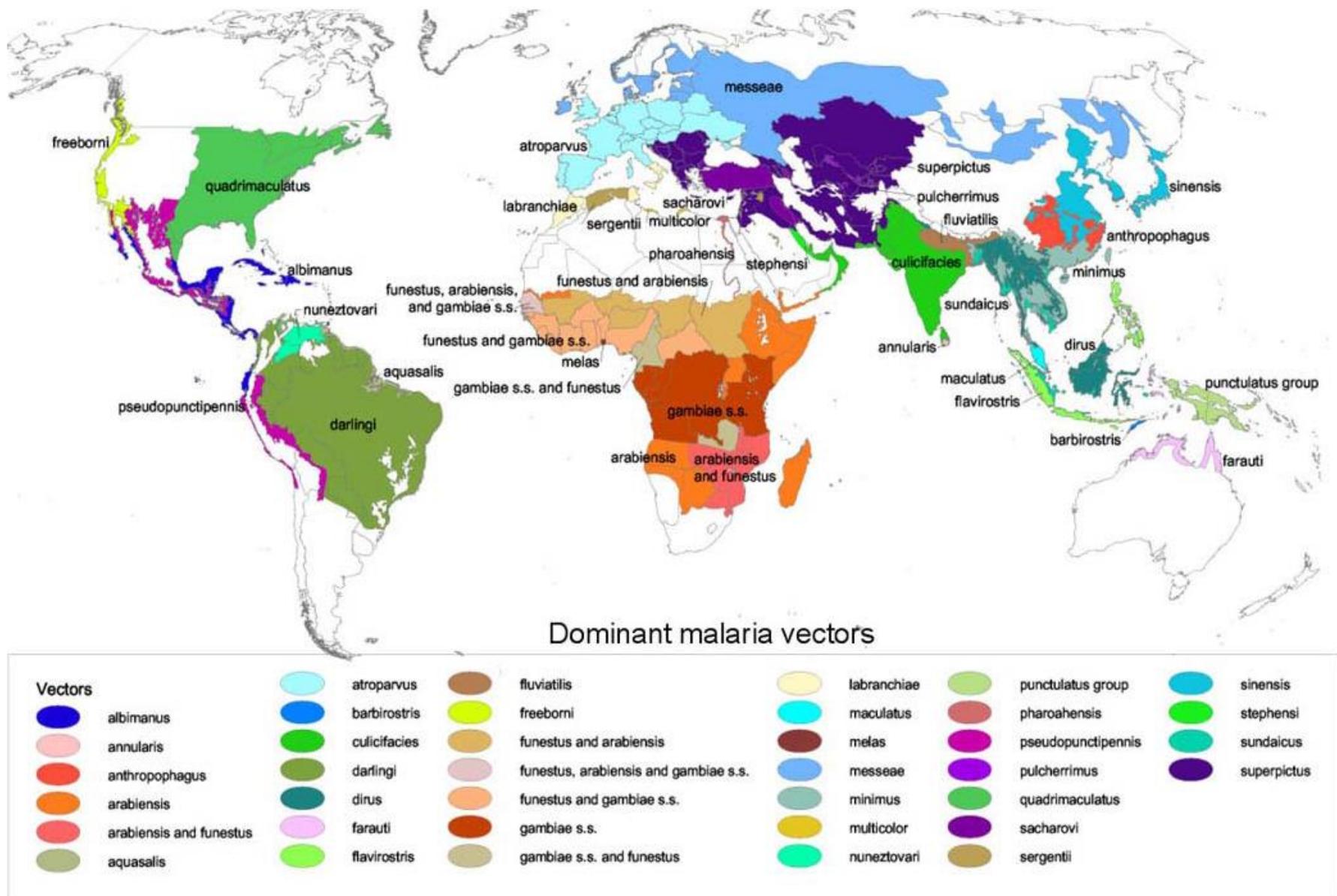


Figura 5. Distribuição mundial dos principais vetores de malária. Fonte: Kiszewski et al. 2004)

No Brasil destacam-se oito espécies como vetores de malária. *An. darlingi* é o principal vetor da doença no país, embora em regiões de água salina, como por exemplo, o estado do Pará, *An. aquasalis* desempenhe papel crucial na epidemiologia da doença. Espécies como *An. nuneztovari* e *An. triannulatus* são descritas como vetores secundários da doença na região norte, enquanto que espécies do complexo *An. albitarsis* podem transmitir a doença em regiões de mata atlântica (Tadei & Dutary Thatcher 2000, Póvoa et al. 2003, 2006, Laporta et al. 2011). Além disso, *An. bellator* e *An. cruzii* são responsáveis pela transmissão da “malária de bromélia” devido a utilização dessas plantas como criadouro (Gadelha 1994, Forattini et al. 1999).

Quanto à distribuição geográfica das espécies no país, *An. aquasalis* é encontrado em áreas costeiras com planícies que sofrem a influência marítima. Embora possa ser encontrados em localidades com distância superior a 100 km do litoral devido a elevada quantidade de cloreto de sódio no solo. A atividade dos adultos é essencialmente crepuscular, se iniciando nas primeiras horas do anoitecer e podendo se estender por várias horas após o pôr do sol. As fêmeas apresentam preferência por se alimentar em animais (zoofilia) e, eventualmente, em humanos quando há escassez de animais (Forattini 2002). Apesar do comportamento zoófilo, apresenta grande importância vetorial, e em determinadas regiões do norte brasileiro, como Belém (PA) e Amapá, é o principal vetor da malária (Póvoa et al. 2003).

*Anopheles albitarsis* é um complexo formado por quatro espécies (*An. albitarsis* s.s, *An. daeneorum*, *An. marajoara*, *An. albitarsis* B) e está distribuído por todo o continente sul americano (Wilkerson et al. 1995). As espécies apresentam morfologia similar sendo distinguidas muitas vezes por aspectos moleculares (Li & Wilkerson 2005). Nas áreas onde é encontrado o *An. albitarsis* s.s é considerado como vetor secundário da doença, sendo que essa espécie se mostrou suscetível a infecção experimental por *P. vivax*, mas não por *P. falciparum* (Klein et al. 1991a, b). O *An. daeneorum* é incriminado com um importante vetor de malária no

oeste da Amazônia e o *An. marajoara* já foi incriminado por possíveis surtos da doença em Costa Marques, RO (Wilkerson et al. 1995).

O *An. triannulatus* está distribuído predominantemente na América do Sul, as fêmeas apresentam comportamento zoófilo, sendo encontrada em baixa frequência no ambiente domiciliar. Entretanto, em alguns países, como por exemplo, Venezuela apresente uma preferência moderada por se alimentar em humanos (antropófila). Sua importância epidemiológica é controversa, pois mesmo podendo ser encontrada infectada com *P. vivax* ou *P. falciparum* apresentaria um baixo risco de transmissão devido ao hábito zoófilo e exófilo (Forattini 2002).

O *An. nuneztovari* distribui-se pela região norte da América do Sul. Na região amazônica suas fêmeas apresentam comportamento, predominantemente, zoófilo e exófilo. Pode ser considerado vetor secundário da doença em algumas regiões da bacia Amazônica, uma vez que, indivíduos infectados naturalmente com *P. vivax* e *P. falciparum* foram encontrados na região (Martins-Campos et al. 2012).

O *An. darlingi* é considerado o principal vetor de malária no Brasil e encontra-se distribuído praticamente em todo o território brasileiro só não estando presente nas áreas secas do nordeste, no extremo sul e nas áreas de elevada altitude (Forattini 2002, Póvoa et al. 2003, 2006, Hiwat & Bretas 2011). Seu habitat é constituído de grandes coleções de água com pouca matéria orgânica como lagoas, açudes e represas (Tadei & Dutary Thatcher 2000, Forattini 2002). Frequentemente são encontradas se alimentando no intradomicílio, sendo consideradas espécies com alto grau de antropofilia, embora sejam encontradas em maior quantidade nas áreas externas ao domicílio (peridomicílio) (Gil et al. 2007). É altamente susceptível a infecção por *P. vivax* e *P. falciparum* (Martins-Campos et al. 2012) sendo capaz, mesmo quando sua densidade populacional é baixa, de manter a endemicidade da malária na região (Tadei & Dutary Thatcher 2000).

A tabela abaixo resume os aspectos e distribuição das principais espécies de vetores de malária no Brasil (Tabela 1). A erradicação de qualquer um dos vetores citados é improvável, mas por se tratarem de componentes chave para o combate da malária, vários esforços têm sido empregados na busca por medidas para o controle de suas população (malERA 2011, Raghavendra et al. 2011, Adeogun et al. 2012, Sum et al. 2012, Martins-Campos et al. 2012, Matowo et al. 2013).

Tabela 1. Principais espécies de anofelinos vetores de Malária no Brasil.

<b>Espécie</b>	<b>Status</b>	<b>Ambiente</b>	<b>Antropofilia</b>	<b>Atividade</b>
<i>Anopheles albitarsis</i> (complexo)	Capacidade vetorial depende da localidade	lagoas; lagos; campos de arroz	Baixa	Crepuscular /noturna
<i>Anopheles aquasalis</i>	Vetor primário em regiões de água salobra	Zonas costeiras;	Moderada	Crepuscular /noturna
<i>Anopheles darlingi</i>	Vetor primário	Zonas florestais próxima a habitação humana; áreas rurais e ribeirinhas	Elevada	Crepuscular /noturna/am anhecer
<i>Anopheles marajoara</i>	Capacidade vetorial depende da localidade	Áreas de várzea; áreas úmidas; floresta secundária e ambientes impactados	Baixa	Crepuscular /noturna
<i>Anopheles nuneztovari</i> (complexo)	Vetor secundário	Água limpa, fresca e com vegetação; lagos; tanques de peixe	Baixa	Crepuscular /noturna

### 1.3 Controle da malária

Não existe vacina para a malária e o tratamento, embora na maioria das vezes seja eficiente, vem apresentando alguns problemas no que se refere à resistência dos plasmódios aos medicamentos utilizados.

Medidas como a Terapia baseada em artmisinina, o Tratamento Preventivo na Gravidez, o uso de “*spray*” interno de ação residual e o de Mosquiteiros Impregnados de Longa Duração (Okumu, MadumLa, et al. 2010) permanecem como as principais medidas de controle da doença. Essas medidas são muito efetivas quando utilizadas juntamente com medidas terapêuticas adequadas e, na África têm contribuído para o decréscimo da morbidade e mortalidade da malária em crianças (Fegan et al. 2007). No Brasil o controle da doença se baseia principalmente no diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos positivos, sendo que medidas que visam o controle do vetor são consideradas seletivas, ajustadas a realidade entomológica da área visando à redução/interrupção da transmissão.

A terapia baseada em artmisinina é uma alternativa ao tratamento convencional da malária, principalmente, em áreas onde há indícios de resistências às drogas convencionais (cloroquina, mefloquina, sulfadoxina, etc). Os derivados de artemisina são conhecidos por amenizarem os sintomas e reduzir a circulação sanguínea do parasito mais rapidamente do que as drogas convencionais. Entretanto, por apresentar meia-vida baixa vem sendo usualmente combinada a alguma outra droga que apresente modo ação diferente e tenha maior tempo de meia-vida (Sinclair et al. 2009).

No passado em áreas endêmicas, o tratamento preventivo na gravidez era realizado com doses semanais de cloroquina. Entretanto, devido à baixa adesão das gestantes ou mesmo da resistência apresentada por cepas de *P. falciparum* a cloroquina, houve alteração nesse tratamento. Atualmente, é realizado com duas doses de sulfadoxina-pirimetina durante o segundo e terceiro semestre de gestação (Kayentao et al. 2005).

Como medida de combate ao vetor, o uso de “*spray*” residual se constitui na aplicação de dose efetiva de inseticida, de uma a duas vezes ao ano, no interior das residências onde frequentemente as fêmeas de anofelinos repousam após o repasto sanguíneo. Esse método é uma medida de proteção comunitária, e para ser eficiente é necessário à aplicação do inseticida no maior número residências possível. Os inseticidas recomendados para esse tratamento pertencem a quatro diferentes classes (i) organoclorados, (ii) organofosforados, (iii) carbamatos e (iv) piretróides. O uso de uma dessas classes em determinada área é baseado em sua eficácia, custo, segurança e tipo de superfície a ser aplicado (Kleinschmidt et al. 2009, Padonou et al. 2012). Já o uso de mosquiteiro impregnado por inseticida de longa duração confere proteção física impedindo o contato do mosquito com a pessoa (Kleinschmidt et al. 2009). Ainda podem ser utilizadas medidas de manejo adequado do ambiente (e.g aterro de criadouros), e o uso de larvicidas. Vale ressaltar que, essas medidas devem ser adotadas levando em consideração conhecimento prévio da área onde serão aplicadas e da ecologia e comportamento dos vetores.

O combate aos insetos vetores associado à quimioprofilaxia em massa foram uma das principais causa de sucesso do controle da malária em determinados países (Raghavendra et al. 2011). Entretanto, nos últimos anos o desenvolvimento e a adoção de ferramentas alternativas para o controle do vetor têm sido excepcionalmente lentos. O fato é que muitas das medidas ignoram os padrões de distribuição natural do vetor e são incapazes de atingir vetores que se alimentam longe das habitações ou que sobrevivam em hospedeiros não humanos (Pates & Curtis 2005, Chaves et al. 2010). Além disso, o Programa Mundial de Combate a Malária enfatiza a necessidade do desenvolvimento de ferramentas e tecnologias sustentáveis (i.e que possam ser adotadas em regiões carentes onde a malária é endêmica) para a prevenção e redução do risco de transmissão da malária (WHO 2010).

## 1.4 Monitoramento de mosquitos vetores

Em áreas endêmicas o monitoramento de espécies vetores é de suma importância, uma vez que, a população sofre flutuações durante as estações do ano, e a época mais crítica, em que pode ocorrer maior transmissão, pode ser prevista antecipadamente (Figura 6). Existem duas maneiras de se realizar o monitoramento dos mosquitos vetores: (i) captura de imaturos e (ii) captura de adultos.

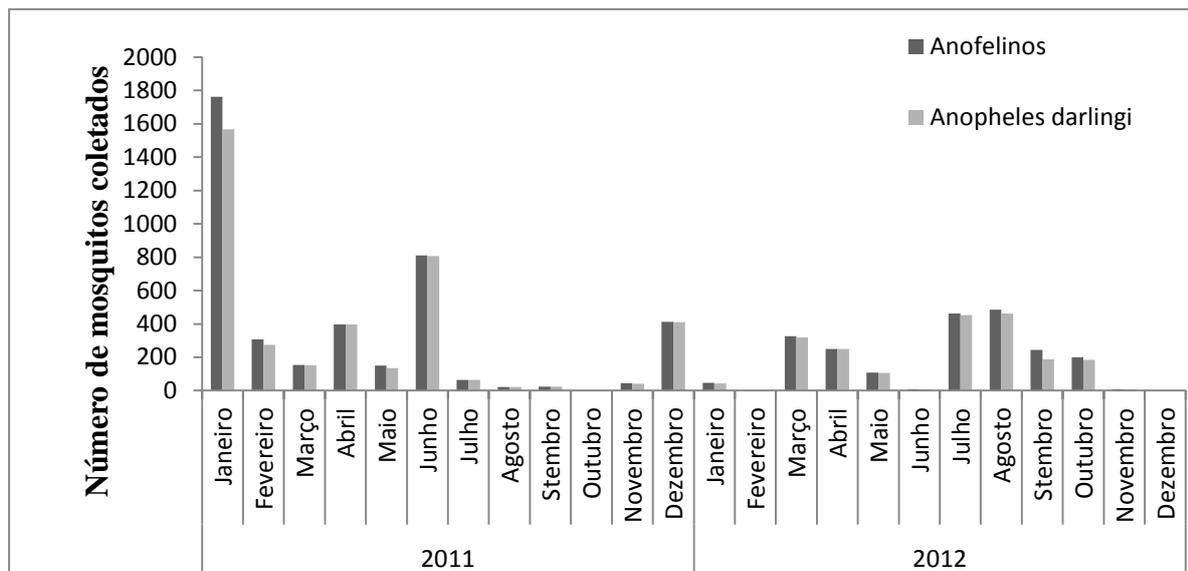


Figura 6. Flutuação populacional de adultos de *Anopheles* amostrados através da coleta por atração em Humanos em Porto Velho-RO. Fonte: SIVEP - Vetores

A captura de formas imaturas é realizada ativamente em grandes coleções de água, com o auxílio de conchas de coleta ou em pequenos reservatórios naturais, como bromélias, com o auxílio de conta-gotas ou pipeta de Pasteur (Figura 7). O material coletado é encaminhado a um laboratório para posterior identificação. Esse procedimento além de ser demorado, exige um grande conhecimento sobre a biologia e ecologia das espécies de interesse para a procura dos possíveis locais de criadouro (Forattini 2002).

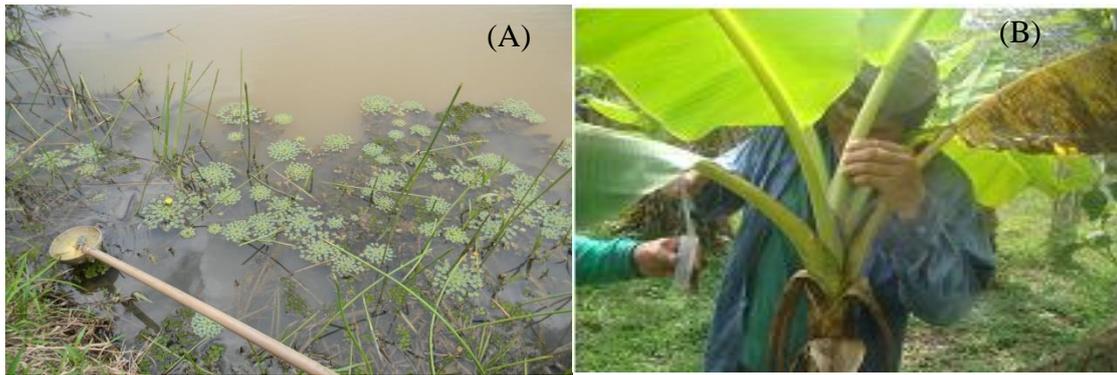


Figura 7. Coleta de larvas de mosquitos. (A) Coleta em grande coleção de água utilizando concha coletora (B) Coleta em pequenos reservatórios naturais utilizando pipeta de Pasteur.

O monitoramento de adultos, além de possibilitar uma estimativa mais sensível da densidade vetorial, permite também estudos de população em área de transmissão sob o ponto de vista de frequência, distribuição espacial, paridade, desenvolvimento ovariano, conteúdo de intestino médio, suscetibilidade a patógenos e presença de resistência a inseticidas (Mathenge et al. 2004, 2005, Govella et al. 2011, Raghavendra et al. 2011).

A captura de formas adultas pode ser realizada utilizando-se métodos atrativos e não atrativos. O método não atrativo consiste na busca ativa de adultos em repouso ou em voo. Esses métodos levam em consideração o tempo que os indivíduos permanecem inativos, o que ocorre basicamente após a eclosão, cópula ou repasto sanguíneo. O maior número de fêmeas é encontrado após a realização do repasto sanguíneo e sua captura pode ser realizada individualmente utilizando mecanismo de aspiração manual (e.g capturador de Castro) ou coletivamente utilizando capturadores mecânicos (e.g capturador de Nasci) (Figura 8).



Figura 8. Métodos de captura ativa não atrativa de mosquitos adultos: (A) Capturador de Castro (B) Capturador mecânico.

Os métodos atrativos se baseiam na utilização de determinados estímulos (iscas) para a atração dos mosquitos. Os estímulos usados com maior frequência são os luminosos e os químicos. Dessa forma, os métodos de coleta mais utilizados são: (i) a coleta por atração em humanos (ou animal), (ii) a armadilha luminosa do tipo CDC e (iii) Shannon (Mathenge et al. 2004, 2005). Esses métodos são baseados na biologia dos culicídeos, sendo que os atrativos utilizados nos métodos citados são, respectivamente, os odores do hospedeiro e a luz (Figura 9).



Figura 9. Métodos de captura ativa de mosquitos adultos utilizando iscas atrativas: (A) Atração em humanos, (B) Armadilha luminosa do tipo CDC, (C) Armadilha de Shannon.

Atualmente, a atração humana é o método mais eficiente para captura e monitoramento de populações de mosquitos antropofílicos, incluindo anofelinos (Mathenge et al. 2004, 2005, Angêlla et al. 2007, Hiwat and Bretas 2011). O método consiste na utilização de pessoas

devidamente treinadas como atrativo para o mosquito. Dessa forma, o indivíduo deve expor uma de suas pernas, protegida por meia preta, aguardar o mosquito pousar e coletá-lo utilizando o capturador de castro (Figura 9A).

Esse método permite a indicação da presença do vetor em determinada localidade, além de fornecer o índice de picada/hora/homem (IPHH), parâmetro usado para estimar a capacidade vetorial (Mathenge et al. 2004, 2005, Hiwat and Bretas 2011). Entretanto, devido a questões éticas e logísticas relacionadas a essa técnica, como por exemplo, a exposição do agente de coleta a mosquitos infectados com patógenos e diferenças na habilidade de captura, o desenvolvimento de nova metodologia para amostragem de anofelinos é necessário (Mathenge et al. 2004, 2005, Govella et al. 2011, Raghavendra et al. 2011, Hiwat et al. 2011a). Neste sentido, armadilhas iscadas com atraentes físicos e/ou químicos se apresentam como uma alternativa em substituição a Atração em Humanos.

#### **1.4.1 Respostas a estímulos luminosos**

Os fotorreceptores encontrados nos insetos são responsáveis pela percepção de forma, distância, brilho e luz polarizada, auxiliando assim na manutenção do ritmo circadiano e em seu funcionamento biológico adequado. De uma maneira geral a atração à luz é atribuída a uma desordem no sistema de localização dos mosquitos que fazem com que o mesmo esbarre ou circundem uma fonte luminosa (Briscoe & Chittka 2001). As armadilhas luminosas se utilizam dessa característica para a captura de fêmeas durante a busca por hospedeiro, embora não seja seletiva e ocorra a atração de machos (Ramirez et al. 2009).

As armadilhas luminosas mais conhecidas e utilizadas para coleta de mosquitos são a Armadilha de Shannon e a CDC-luminosa. A utilização de armadilhas para o monitoramento de vetores é interessante uma vez que não oferece riscos ao operador e nem sofre a influência da variação de atratividade, como ocorre com a utilização de iscas (humana ou animal).

Entretanto, ainda tem se observado resultados conflitantes no que diz respeito à atratividade e eficiência de armadilhas luminosas quando comparada à coleta por atração em humanos (Mathenge et al. 2004, 2005).

Forattini e colaboradores (1996) ao realizarem coletas de *Anopheles* em algumas localidades no Estado de São Paulo observaram que a armadilha de Shannon se mostrou mais eficiente do que a coleta por atração em humanos. Resultados semelhantes foram obtidos por Mathenge et al. (2004) que ao compararem a coleta por atração em humanos com armadilhas luminosas em áreas endêmicas na África, observaram maior eficiência das armadilhas. Entretanto, há trabalhos que contradizem esses resultados, mostrando que a luz não é tão eficiente quanto os atraentes químicos naturais (coleta por atração em humanos) ou sintéticos (Mboera LEG et al. 2000, Mathenge et al. 2004, Overgaard et al. 2012), e outros que relatam a igual eficiência desses métodos (Hii et al. 2000, Mathenge et al. 2005, Brown et al. 2008). Além disso, armadilhas luminosas não são eficientes para espécies antropófilas, uma vez que, essas espécies utilizam o odor como principal pista para a localização do hospedeiro (Takken & Knols 1999, Mukabana et al. 2002, Dekker et al. 2005, Brown et al. 2008, Okumu et al. 2010a, Qiu et al. 2011, Smallegange et al. 2013).

#### **1.4.2 Respostas a estímulos químicos**

A busca pela alimentação sanguínea (repasto sanguíneo) em insetos hematófagos envolve uma série de estratégias que variam intra e interespecificamente e dentro de seus habitats naturais (Bowen 1991). Assim, o processo de localização do hospedeiro pode ser dividido em uma série de comportamentos e respostas a estímulos, entre eles o odor (Bowen 1991). O odor emanado da fonte está presente no tempo e espaço na forma de “pluma”. A pluma de odor é uma mistura de moléculas químicas emanadas de uma fonte que apresenta natureza irregular e

se movimenta a favor do vento de maneira que o inseto recebe uma série de estímulos intermitentes (Murlis et al. 1992).

Mais de 100 compostos voláteis podem ser emanados pelos diferentes processos metabólicos realizados pelo corpo humano (Bernier et al. 2000, Curran et al. 2005). São substâncias incluídas no grupo dos álcoois, ácido carboxílicos, cetonas entre outras, e, graças ao desenvolvido sistema olfatório, os mosquitos antropófilos são capazes de utilizar pequena quantidade desses compostos para diferenciar e orientar seu voo em direção ao hospedeiro (Bowen 1991, Murlis et al. 1992, Takken & Knols 1999, Mukabana et al. 2002, Smallegange et al. 2005, 2009, 2013, Li & Wilkerson 2005, Lacroix et al. 2005). Essas substâncias recebem o nome de *caïromônio*, uma classe de semioquímico que vem sendo atualmente muito utilizada em testes com armadilhas para o monitoramento de diversos insetos. Por definição caïromônio é uma substância química emanada por um organismo que eliciará resposta comportamental em outro organismo o qual se beneficiará dessa interação (Eiras 2001).

Dentre os principais caïromônios utilizados e testados em armadilhas para a captura de insetos hematófagos, destacam-se o ácido láctico, a acetona, a amônia, o ácido caprótico (ou hexanótico), o octenol (1-octen-3-ol) e o gás carbônico (CO<sub>2</sub>), (Eiras & Jepson 1991, Geier et al. 1999, Mukabana et al. 2002, Dekker et al. 2005, Njiru et al. 2006, Kröckel et al. 2006, Okumu et al. 2010b, Hiwat et al. 2011).

A primeira substância isolada e identificada a partir do odor humano foi o ácido láctico. Alguns trabalhos demonstraram que armadilhas iscadas apenas com ácido láctico não são tão eficientes, entretanto quando associado a outros caïromônios, principalmente o CO<sub>2</sub>, essa eficiência aumenta significativamente (Eiras 2001, Qiu et al. 2011). Na década de 90, estudos de campo avaliando a eficiência do octenol verificaram que essa substância possui um efeito sinergista junto ao CO<sub>2</sub> aumentando em até cinco vezes quantidade de *Anopheles atropos* coletada (Kline et al. 1990). Posteriormente, Cork & Park (1996) demonstraram através de

eletroantenografia que antenas intactas de fêmeas de *An. gambiae* s.s apresentam uma resposta dose-dependente a esse caïromônio .

Estudo comparando a atratividade de suor fresco e suor incubado (i.e suor coletado e mantido em freezer por período de tempo determinado) demonstrou que fêmeas de *An. gambiae* s.s apresentam preferência pelo suor incubado, fato que pode estar associado a maior concentração de amônia encontrada no suor após determinado tempo de incubação (Braks & Takken 1999, Smallegange et al. 2005, Dekker et al. 2005). Em condições de laboratório e de semi-campo, o ácido lático e amônia foram adicionados a uma mistura de cerca de 10 outros componentes do suor, armadilhas iscadas com esse *blend* atraíram até quatro vezes mais *An. gambiae* s.s do que a coleta por atração em humanos (Verhulst et al. 2010, 2011a).

Uma série de trabalhos relatam a influência, positiva, negativa ou neutra, de vários compostos encontrados no suor humano, respiração ou do subproduto produzido por bactérias presente na pele na atração de anofelinos (Njiru et al. 2006, Qiu et al. 2007, 2011, Smallegange et al. 2009, Verhulst et al. 2010, 2011b). Smallegange et al. (2005) verificaram a resposta olfativa de *An. gambiae* s.s a compostos presentes no odor humano em olfatometro de dupla escolha. Nesse caso, a amônia foi atrativo enquanto que o ácido lático não apresentou nenhum tipo de efeito. Já, o odor sintético composto por 12 tipos de ácidos carboxílicos tiveram um efeito repelente nos mosquitos. Okumu et al. (2010a) testando mistura composta de CO<sub>2</sub>, amônia e ácidos carboxílicos (e.g ácido lático) verificaram que o odor sintético capturou de 3 a 5 vezes mais mosquitos do que a atração humana quando os tratamentos se encontravam entre 10 e 100m de distância. Entretanto quando o odor sintético foi testado em um mesmo ponto onde se encontrava a atração humana o mesmo teve desempenho inferior.

A maior parte dos estudos realizados nessa área apresenta como foco principal o desenvolvimento de atraentes para *An. gambiae* s.s (Braks & Takken 1999, Dekker et al. 2005, Govella et al. 2009, Okumu et al. 2010a, Verhulst et al. 2011a, Qiu et al. 2011). Para *An.*

*darlingi*, vetor responsável pela transmissão de 90% dos casos de malária no Brasil, o número de estudos nessa área ainda é escasso. Um dos poucos trabalhos realizados nessa área verificou que tanto o ácido láctico quanto a combinação de amônia e ácido hexanóico apresentou pior desempenho na média de captura de anofelinos do que a utilização apenas de gás carbônico (Gama, 2009).

### **1.5 O papel do CO<sub>2</sub> como atrativo**

O gás carbônico está presente na atmosfera a uma concentração que varia normalmente de 0.03 - 0.1% (Berner 1990, Pearson & Palmer 2000, Lüthi et al. 2008). É um importante estímulo químico para a maioria dos insetos, sendo que a resposta comportamental a esse composto é altamente espécie-específica.

Larvas de besouro da família Elateridae podem se orientar em resposta a quantidade de CO<sub>2</sub> liberada durante o processo de respiração de plantas hospedeiras (Johnson & Gregory 2006). Mariposas da espécie *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) que se alimentam do néctar de várias espécies de plantas (e.g *Datura wrightii*) são capazes de avaliar sua qualidade pela quantidade de gás carbônico que a flor produz (Thom et al. 2004). Em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) concentrações de 0.1% de CO<sub>2</sub> acima da concentração ambiental funciona como repelente tanto para machos quanto para fêmeas (Faucher et al. 2006, Jones et al. 2007). Em outros grupos, como por exemplo: (i) Muscidae (Warnes & Finlayson 2009), (ii) Glossinidae (Mohamed-Ahmed & Mihok 2007), (iii) Tabanidae (Vale 2009), (iv) Simuliidae (Sutcliffe 1986), (v) Triatominae (Barrozo & Lazzari 2004) e Culicidae (Healy & Copland 1995) já foi comprovada a eficiência da atração que o CO<sub>2</sub> exerce, desempenhando importante papel, principalmente, na busca pela alimentação sanguínea.

O CO<sub>2</sub> é um componente natural eliminado durante o processo de respiração de vertebrados. Em humanos a concentração desse gás na respiração é de aproximadamente 5%,

ou seja, tem que ser diluída cerca de 130 vezes para atingir a concentração atmosférica (Nicolas & Sillans 1989). Dessa forma, é considerado o principal caioromônio utilizado por muitas fêmeas de culicídeos, uma vez que, pode ser percebido à longa distância e assim orientar o voo na busca pelo hospedeiro (Eiras & Jepson 1991, Takken & Knols 1999, Gillies 2009). Estudos demonstraram que fêmeas de *An. gambiae* são capazes de detectar variações de cerca de 0.01% na concentração de CO<sub>2</sub> presente no ambiente, sendo capazes de orientar o voo em direção a fonte (Healy & Copland 1995).

Atualmente o CO<sub>2</sub> utilizado como atraente em armadilhas pode ser obtido de quatro principais maneiras: (i) líquido em cilindros metálicos (Verhulst et al. 2011a), (ii) no processo de combustão do propano (Brown et al. 2008, Rubio-Palis et al. 2012), (iii) sólido na forma de gelo seco (Jones et al. 2004, Oli et al. 2005) e (iv) no processo de fermentação do açúcar por leveduras (Saitoh et al. 2004, Smallegange et al. 2010).

*Líquido em cilindros metálicos:* A utilização de cilindros industriais para a liberação de CO<sub>2</sub> em armadilhas apresenta como importante ponto positivo a capacidade de regular o volume de gás liberado, em contrapartida, é uma método caro e de difícil logística de campo, uma vez, que os cilindros são metálicos e alguns deles chegam a pesar até 100 kg. Normalmente é utilizado para obter taxas de liberação de 500mL/min a qual, em campo, é capaz de atrair espécies como *An. arabienesis*, *An. funestus* entre outras (Smallegange et al. 2010, Verhulst et al. 2011a, Matowo et al. 2013).

*Processo de combustão do propano:* Determinadas armadilhas tem a capacidade de converter o propano (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>) em CO<sub>2</sub>, calor e vapor de água, através do processo de combustão. Nesse caso, o uso dessa fonte apresenta as mesmas limitações de cilindros industriais. Em campo são capazes de liberar taxas de até 500mL/min, sendo que estudos relataram que armadilhas iscadas com essa fonte foram capazes de capturar significativamente mais *Anopheles punctipennis* do armadilhas que utilizavam gelo seco (Brown et al. 2008).

*Gelo seco*: O uso de gelo seco é uma ótima alternativa as fontes convencionais de obtenção de CO<sub>2</sub>, uma vez que apresenta baixo custo e fácil manuseio em campo. Entretanto, esse método apresenta meia vida curta necessitando de reabastecimento diário, ainda a quantidade de CO<sub>2</sub> liberada não pode ser controlada e aumenta ou diminui de acordo com a quantidade de gelo seco utilizada, tipo de recipiente utilizado como liberador entre outros fatores. Testes em campo indicaram que armadilhas iscadas com gelo seco apresentam eficiência cerca de 50% maior na captura de anofelinos do que armadilhas controle (Jones et al. 2004, Oli et al. 2005).

*Fermentação do açúcar por leveduras*: algumas espécies de leveduras (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*) são capazes de produzir CO<sub>2</sub> e álcool como subproduto de seu processo de respiração (i.e fermentação) necessitando para isso apenas de açúcar e água. Esse método é extremamente barato e de fácil utilização em campo, embora apresente limitações quanto à taxa de gás liberada (Guerenstein et al. 1995, Saitoh et al. 2004, Oli et al. 2005, Smallegange et al. 2010). O uso dessa técnica é capaz de produzir até 135mL/min de CO<sub>2</sub>, sendo que não foi verificada diferença significativa na coleta de *An. gambiae* quando comparado armadilhas iscadas com levedura e armadilhas iscadas com cilindro de CO<sub>2</sub> (Smallegange et al. 2010).

Vários trabalhos relatam o efeito positivo do uso de CO<sub>2</sub> na captura de anofelinos, sendo que, a adição dessa substância em armadilhas a diferentes concentrações (i) 135 mL/min (Okumu et al. 2010a) (ii) 200mL/min (Kline et al. 1990); (iii) 500mL/min (Matowo et al. 2013); (iv) 800mL/min (Dekker & Takken 1998) aumenta significativamente a quantidade de anofelinos coletados quando comparadas a armadilha controle (i.e sem adição de CO<sub>2</sub>). Dessa forma, o CO<sub>2</sub> é considerado um dos mais eficientes compostos utilizados em armadilhas para vetores (Kline et al. 1990, 1991, Mboera LEG et al. 2000, Gillies 2009, Kweka et al. 2013).

Entretanto, em áreas carentes, onde a malária é endêmica existe uma dificuldade na obtenção de fontes CO<sub>2</sub> confiáveis e de longa duração.

## **1.6 Armadilhas para captura de anofelinos**

Várias armadilhas têm sido desenvolvidas e avaliadas para a captura de anofelinos em substituição a coleta por atração humana, essas podem ser divididas em: (i) ativas: utilizam fluxo de ar para a sucção do mosquito (Qiu et al. 2007, Xue et al. 2008, Rubio-Palis et al. 2012, Gama et al. 2013) e (ii) passivas: capturam os mosquitos sem artefatos mecânicos de sucção (Okumu, MadumLa, et al. 2010, Kweka et al. 2013, Matowo et al. 2013, Ritchie et al. 2013, Sikaala et al. 2013). Além disso, é possível incorporar a armadilha atraente natural (i.e odor humano ou animal) ou sintético (e.g CO<sub>2</sub>).

Recentemente pesquisadores do *Ifakara Health Institute*, localizado na Tanzânia, desenvolveram armadilha passiva que, se baseia na importância dos atrativos emanados do odor humano, para a coleta de anofelinos. A armadilha, denominada *Ifakara Tent Trap* (ITT), consiste em uma estrutura de madeira/ferro revestida por lona onde são inseridas três aberturas circulares para a entrada dos mosquitos. Para que funcione é necessário que uma pessoa fique deitada na parte inferior armadilha para atrair e capturar os mosquitos (Figura 10). Testes de campo demonstraram que, embora utilize uma pessoa (odor humano) como atraente, a armadilha apresenta apenas 25% da eficiência obtida quando se utiliza a atração humana (Govella et al. 2011). Ainda, por necessitar de uma pessoa para o funcionamento está sujeito a viés de erro e questões éticas semelhantes à atração humana.

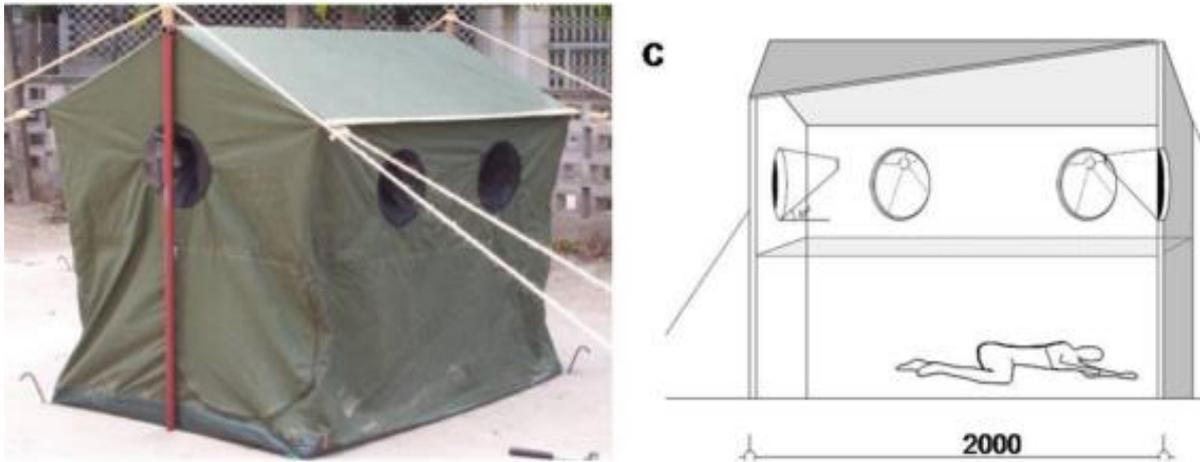


Figura 10. *Ifakara tent trap*: (A) Parte externa da armadilha, (B) Desenho esquemático da armadilha. Fonte Govella et al. 2011.

Outra armadilha passiva é a *Resting Box* (RB) que consiste em uma caixa (45cm x 30cm x 45cm) revestida internamente com lona preta e diferente da ITT se baseia na utilização de odores animais (e.g urina de gado) e sintéticos (e.g CO<sub>2</sub>) (Figura 11) (Kweka et al. 2009). Em campo RB iscadas com CO<sub>2</sub> apresentaram melhor desempenho na coleta de *An. gambiae* s.l do que armadilhas do tipo CDC (Kweka et al. 2013) e, quando iscadas com urina bovina coletaram até cinco vezes mais mosquitos do que a atração humana (Kweka et al. 2009).



Figura 11. *Resting box*: (A) Armadilha e liberador de CO<sub>2</sub> (B) Posicionamento da armadilha em campo. Fonte: Kweka et al. 2013.

O fato é que os métodos de coleta que utilizam odor natural humano ou animal estão sujeitos a viés de erro, uma vez que, pode existir diferença de atratividade entre os indivíduos utilizados. Nesse contexto a utilização de armadilhas que utilizem atraentes sintéticos é uma importante alternativa a essas metodologias.

Um exemplo de armadilha que utiliza odor sintético é a *Mosquito Landing Box* (MLB). A MLB é uma armadilha ativa que foi desenvolvida para a coleta de mosquitos exofílicos. Consiste em caixa de madeira (0.7 x 0.7 x 0.8 m) posicionada acima de pés de 10 cm de comprimento (Figura 12). O atraente é dissipado através de um tubo de PVC de 20 cm de comprimento e 5.7 cm de diâmetro localizado no interior da armadilha, um ventilador é utilizado para sugar o ar externo para que o mesmo entre em contato com o atraente e produza a pluma de odor. Estudo realizado na Tanzânia indicou que a armadilha poderia ser incorporada em programas de combate ao vetor, uma vez que tem a capacidade de atrair as mesmas populações de mosquitos que se alimentam em humanos (i.e *An. arabiensis* e *An. funestus*) (Matowo et al. 2013).

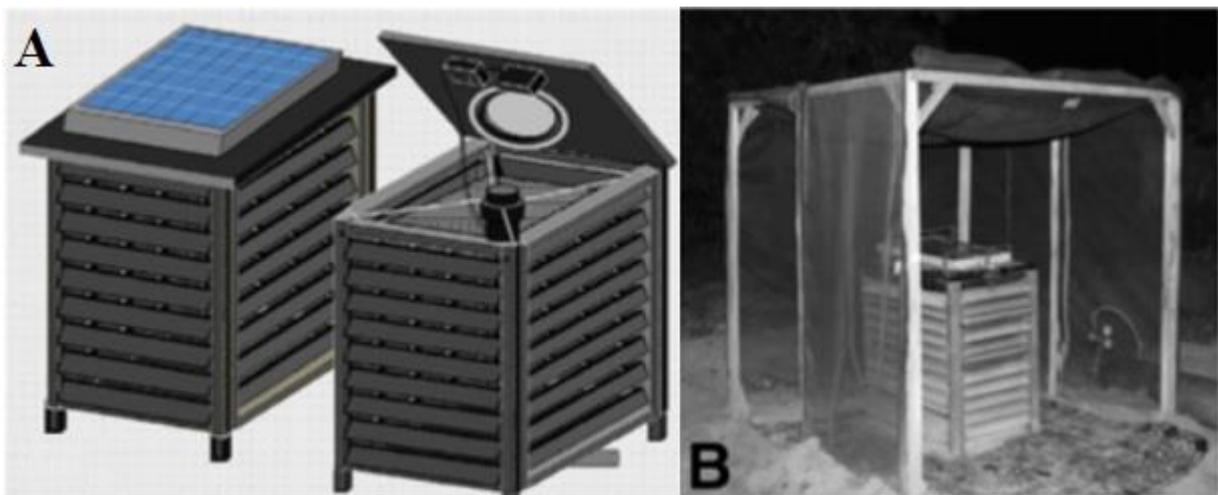


Figura 12. *Mosquito landing box*. (A) Desenho da armadilha, (B) Armadilha em campo. Fonte: Matowo et al. 2013.

Outras duas importantes armadilhas ativa que utilizam atraente sintético são a BG-Sentinel (Geier et al. 1999, Kröckel et al. 2006) e a MM-X trap (Njiru et al. 2006, Qiu et al. 2007). A MM-X é composta por um recipiente plástico acoplado a um tubo central, possui dois ventiladores, um para liberar o ar e formar a pluma de odor e outro para a sucção dos mosquitos que se aproximam da entrada da armadilha (Figura 13). Já a BGS apresenta uma forma cilíndrica e coloração branca, o odor sintético é dissipado para o meio através de ventilador interno que aspira o ar de fora da armadilha para o interior fazendo com que esse

entre em contato com o atraente sintético e saia da armadilha pela parte superior (Kröckel et al. 2006) (Figura 14).

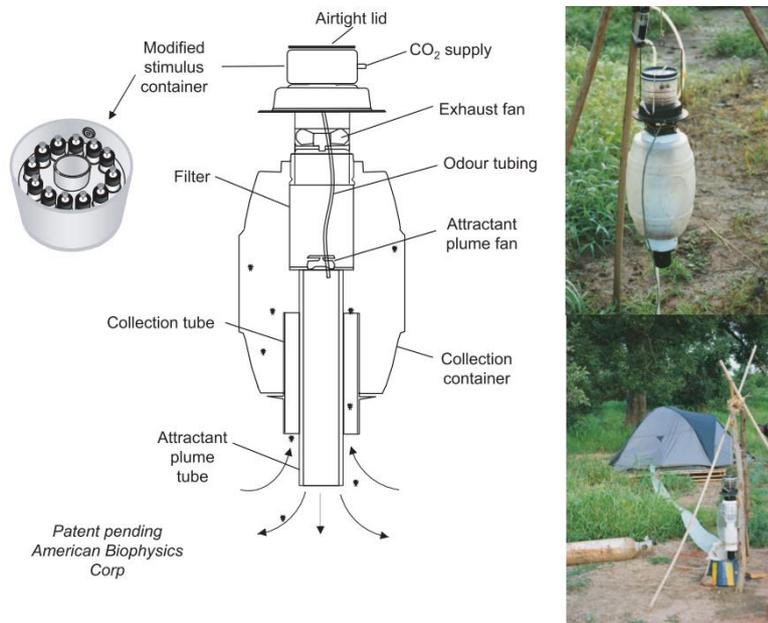


Figura 13. Armadilha MM-X: (A) Desenho esquemático e (B) Foto. Fonte: Schmied et al. (2008)



Figura 14. Armadilha BG-Sentinel: (A) Foto, (B) Desenho esquemático da armadilha. G = Malha de cobertura; CB = Funil de entrada; T = Tubo preto; F= Ventilador de 12 V; BGL = Atraente sintético. Setas indicam o fluxo de ar

Schmied et al. (2008) compararam a taxa de captura de anofelinos entre a armadilha BGS e a MM-X, ambas iscadas com odor humano do pé e CO<sub>2</sub>. O experimento foi realizado em uma área de semi-campo onde as duas armadilhas foram dispostas a aproximadamente 10

m de distância. Cada noite 200 fêmeas de *An gambiae* eram liberadas e, ao final do experimento foi verificada que a quantidade de mosquitos coletados na armadilha BGS foi significativamente superior à observada nas MM-X.

Embora essa lista ainda possa ser estendida (ver: Sithiprasasna et al. 2004, Okumu, MadumLa, et al. 2010, Sikaala et al. 2013) dois importantes aspectos devem ser ressaltados: (i) as armadilhas são desenvolvidas e testadas para anofelinos africanos levando em consideração aspectos da ecologia e comportamento dessas espécies e, (ii) escassez de trabalhos para *An. darlingi*, uma vez que, essa espécie não ocorre no continente africano sua coleta é feita apenas com armadilhas generalistas.

### **1.7 Armadilhas para captura de *Anopheles darlingi***

Na América do Sul o *An. darlingi* é considerado o principal vetor da malária desde a década de 30 (Tadei et al. 1998, Tadei & Dutary Thatcher 2000, Oliveira-Ferreira et al. 2010) e até o presente momento não existe armadilha eficiente para a coleta e monitoramento desse vetor. Existem armadilhas generalistas disponíveis, tais como a CDC luminosa, Shannon, MMX-Trap, MLB, RB entre outras. No entanto, essas armadilhas foram desenvolvidas e avaliadas para anofelinos africanos (Mathenge et al. 2004, 2005, Xue et al. 2008, Hiwat et al. 2011a), o que faz com que seu uso em programas de monitoramento no continente sul americano possa fornecer dados de qualidade duvidosa.

Os principais trabalhos realizados na América do Sul foram desenvolvidos nos anos de 2008 (Rubio-Palis et al. 2012) e 2009 (Hiwat et al. 2011b), utilizando, respectivamente as armadilhas *Mosquito Magnet Liberty Plus* (MMLP) e BGS. No trabalho de Rubio-Palis et al. (2012) a quantidade de *An. darlingi* coletada em armadilhas MMLP foi aproximadamente três vezes menor do que a observada na atração humana. Resultado similar foi observado no

trabalho Hiwat, Rijk, et al. (2011) no qual a média de *An. darlingi* coletada diariamente na atração humana foi significativamente superior a observada em armadilhas BGS.

No Brasil, o número de trabalhos visando o desenvolvimento de armadilhas é escasso, sendo que a grande maioria dos estudos visa o levantamento da fauna local e utilizam armadilhas luminosas do tipo CDC ou Shannon (Gomes & Forattini 1987, Guimarães & Mello 1997, Duarte et al. 2013). Gomes et al. (2007) utilizaram diversas metodologias de coleta para culicídeos, entre elas armadilhas do tipo CDC e Shannon, sendo que os resultados demonstraram que a frequência de captura *An. darlingi* nessas metodologias foi muito baixa (< 1%). Já Kleber et al. (2013) utilizando armadilhas de Shannon para amostrar a fauna de anofelinos na Reserva Biológica de Sorotema Vila Valério - ES coletaram sete diferentes espécies de anofelinos entre elas *An. darlingi*. Entretanto em ambos os trabalhos não foi realizada comparação entre as metodologias de coleta ou mesmo entre armadilhas e a atração humana.

Um dos poucos trabalhos realizado no Brasil visando à utilização de armadilhas na substituição da atração humana foi realizado em localidades rurais de Porto Velho. O trabalho envolveu mudanças e adaptações na armadilha BGS (Gama et al. 2013). Adaptações físicas (presença/ausência de luz, tipo de luz, cor, posição, altura do solo) e químicas (CO<sub>2</sub> e odor humano natural) foram realizadas de modo que a nova armadilha recebeu o nome de BG-Malária.

A armadilha BG-Malária difere da BG-Sentinel quanto ao padrão de coloração e a posição de instalação, sendo a mesma instalada com a abertura e o fluxo de ar voltado para baixo, invertendo assim a direção de sucção dos mosquitos pelo ventilador. Utiliza como isca o CO<sub>2</sub>, o qual é liberado a uma taxa de 25g/h (Biogents 2012), sendo dissipado para o ambiente com o auxílio do ventilador interno, que aspira o ar de fora da armadilha para o interior e promove a sua saída pela parte inferior da mesma, formando assim uma pluma de odor

próximo a abertura de captura da armadilha. Os insetos atraídos por essa pluma são sugados pela corrente de ar e permanecem presos em sacos de nylon posicionado anteriormente ao ventilador (Figura 15) (Gama et al. 2013).

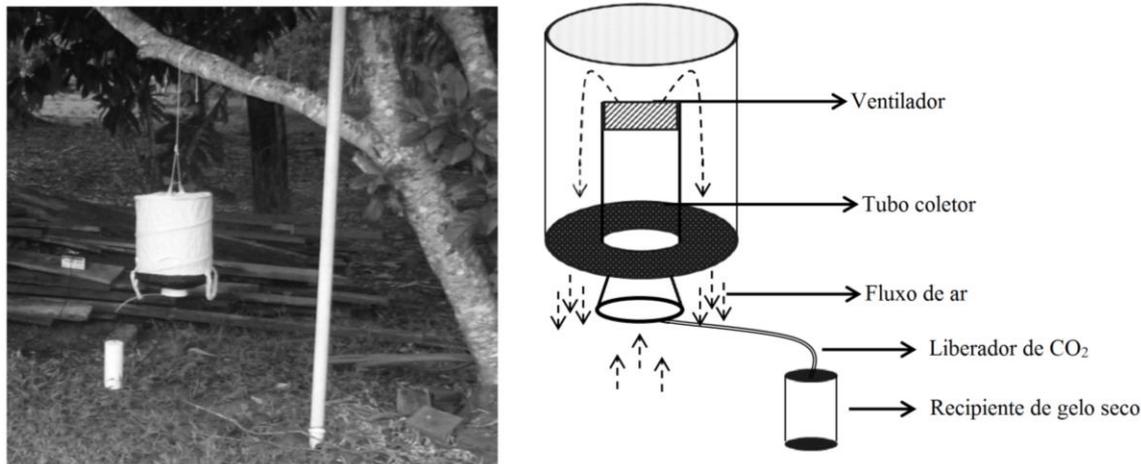


Figura 15. Armadilha BG-Malária: (A) Instalação em campo, (B) Esquema de funcionamento.

Em campo Gama et al. (2013) compararam a armadilha BG-Malária com outras armadilhas presentes no mercado (e.g CDC, CFG e Fay Prince) e os resultados demonstraram que a nova armadilha capturou significativamente maior número de *An. darlingi* em comparação as demais armadilhas. Em condições de campo, comparando a armadilha BG-Malária com a atração humana não foi encontrada diferença significativa na taxa de captura de anofelinos entre os dois métodos, sugerindo que esta armadilha poderia ser uma importante alternativa à coleta por Atração humana (Gama et al. 2013). Entretanto, mais da metade dos insetos coletados não puderam ser identificados devido a danos causados em suas pernas posteriores. Ainda, o número de anofelinos coletados pela armadilha foi superior nas três primeiras horas de coleta, sendo que após esse período houve diminuição da eficiência da armadilha quando comparada a atração humana (Gama et al. 2013).

## 2. Justificativa

Por serem os principais elos na transmissão da malária, os mosquitos do gênero *Anopheles* merecem atenção especial nas ações de controle e prevenção dessa doença. O seu monitoramento constante além de fornecer informações da distribuição e densidade das espécies presentes em determinada área é de suma importância para a predição de riscos de transmissão. Dentre as medidas atuais de monitoramento, a coleta por atração em humanos ainda é a mais eficiente metodologia para a coleta de anofelinos. Esta metodologia além de expor os trabalhadores a picadas de fêmeas de *Anopheles* que podem estar infectadas pode produzir resultados conflitantes devido às diferenças no grau de atratividade e na habilidade dos capturadores.

Algumas armadilhas (e.g MLB, RB MMLP) podem ser utilizadas no monitoramento desse mosquito, entretanto por terem sido desenvolvidas baseadas na biologia e comportamento de anofelinos africanos podem não ser tão eficazes a ponto de substituir a atração humana na coleta de *An. darlingi*. Os resultados promissores obtidos com a armadilha BG-Malária em testes de campo sugerem que a mesma pode se tornar uma importante ferramenta no auxílio do combate à malária em regiões da América do Sul.

O desenvolvimento de uma armadilha específica e sensível na detecção de variações na densidade populacional da espécie alvo, seria uma valiosa ferramenta, principalmente em áreas com elevada transmissão. Ainda, a utilização de tal metodologia em substituição a coleta por atração em humanos diminuiria os riscos de infecção a que os agentes de captura se expõem, amenizando os problemas logísticos e éticos existentes para monitoramento de anofelinos.

Embora os resultados de campo tenham demonstrado não haver diferença significativa na quantidade de anofelinos coletados entre a BG-Malária e a atração humana, cerca de 80% dos mosquitos coletados na BG-Malária não puderam ser identificados devido à perda de importantes estruturas morfológicas (e.g pernas posteriores). Além disso, o número de

mosquitos coletados na BG-Malária após os três primeiros horários de amostragem sofre uma redução quando comparado à atração humana, o que poderia indicar uma insuficiência na quantidade de CO<sub>2</sub> liberada. Uma vez que a armadilha BG-Malária utiliza o gelo seco como fonte de obtenção de CO<sub>2</sub> o que pode causar problemas logísticos devido à dificuldade de aquisição dessa substância em áreas endêmicas da doença é necessário desenvolver fontes alternativas de produção e liberação de CO<sub>2</sub>.

Portanto, o presente trabalho foi direcionado para desenvolver novos protótipos da BG-Malária visando solucionar as três limitações do uso da armadilha: (i) sistema de contenção de insetos, (ii) durabilidade do atrativo utilizado e (iii) procurar fonte alternativa de produção de CO<sub>2</sub>. Portanto o objetivo do presente trabalho foi continuar o aprimoramento da BG-Malária de maneira que a mesma possa ser incorporada aos programas de monitoramento de *An. darlingi*.

### 3. OBJETIVO GERAL

Esse estudo teve como objetivo o aprimoramento e avaliação da eficiência de um novo protótipo da armadilha BG-Malária para a captura de adultos de *Anopheles darlingi* como uma possível alternativa de substituição da coleta por atração em humanos.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Aprimoramento do sistema de retenção dos mosquitos na armadilha para evitar injúrias que dificultam a identificação taxonômica dos insetos capturados;
- Avaliação em campo do uso de diferentes taxas de CO<sub>2</sub> como atraente de anofelinos em armadilhas BG-Malária;
- Comparar a taxa de captura de *An. darlingi* entre o CO<sub>2</sub> proveniente de gelo seco e o liberado durante o processo de fermentação do açúcar por *Sacharomyces cerevisiae*;
- Comparar a captura de *An. darlingi* entre armadilhas BG-Malária iscada com a melhor fonte de CO<sub>2</sub> com a coleta por atração em humanos.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Área de trabalho**

O trabalho foi desenvolvido em três diferentes localidades, sendo uma localizada em Belém (PA) e duas pertencentes ao estado de Rondônia.

Em Belém o trabalho foi realizado no Parque Ambiental do Utinga (W 01°23' 13'' a S 01 26' 02''). O Parque apresenta floresta aberta de igapó, vegetação primária e secundária em áreas mais antropizadas, ocupando aproximadamente 1.340 hectares. Os experimentos ocorreram na Unidade Experimental Dr. Felisberto Camargo da Embrapa Amazônia Oriental, localizada no interior do parque, que se constitui em uma fazenda de criação de búfalos apresentando um lago coberto de macrófitas adjacente aos currais de manejo.

Em Porto Velho o trabalho foi realizado na Chácara Boa Esperança (S 08° 52'' 39.1' W 64° 03'' 45') e Fazenda Recanto dos Sonhos (S 08° 52'' 25' W 64° 03'' 38.3') pertencentes a zona rural denominada Cachoeira do Teotônio localizada a aproximadamente 27 km do centro urbano de Porto Velho. A vegetação é classificada como Floresta Tropical Aberta, a temperatura média anual varia entre 23 a 25 °C e a precipitação média na região é de aproximadamente 2.500 mm, com 180 dias de chuvas por ano. A umidade relativa do ar varia de 90% em janeiro a 75% em julho, ficando a média anual em torno de 85%.

### **4.2 Armadilha BG-Malária**

A BG-Malária apresenta formato cilíndrico com coloração branca tendo a parte superior coberta com um tecido preto no qual há uma abertura circular onde é inserido o tubo coletor. Utiliza como isca o CO<sub>2</sub> o qual é armazenado em um recipiente acoplado a uma mangueira plástica de 2 mm de diâmetro. Em campo a armadilha é instalada com a abertura e o fluxo de ar voltado para baixo à aproximadamente 40 cm de distância do solo (Gama et al. 2013, Figura 15).

### **4.3 Aprimoramento do sistema de retenção dos mosquitos na armadilha**

#### *4.3.1 Desenvolvimento de diferentes protótipos de tubo coletor*

Visando minimizar os danos causados aos mosquitos capturados três novos protótipos de tubos coletores foram desenvolvidos e comparados ao coletor padrão (P):

**Tubo Coletor - 1 “Sem funil” (SF):** consistiu no funil de captura da BG-Malária (12,2cm de altura, diâmetros superior de 12cm e inferior de 10cm) onde removeu-se o saco coletor fechando a extremidade inferior com tela de nylon, impedindo a passagem do inseto para o interior da armadilha (Figura 16A).

**Tubo Coletor - 2 “Rígido Curto” (RC):** consistiu de um cilindro de acrílico transparente de 7.5 cm de comprimento e 11 cm de diâmetro. A extremidade inferior do tubo foi fechada com tela de nylon e a extremidade superior apresentava rosca que permitia acoplá-los ao funil de captura na entrada da armadilha (Figura 16B).

**Tubo Coletor - 3 “Rígido Longo” (RL):** tubo semelhante ao RS, porém com o comprimento de 15 cm (Figura 16C).

**Tubo Coletor Padrão – (P): bolsa coletora** apresentando um pequeno funil na entrada, confeccionada toda em nylon e totalmente flexível que constitui o coletor convencional da armadilha (Figura 16D).

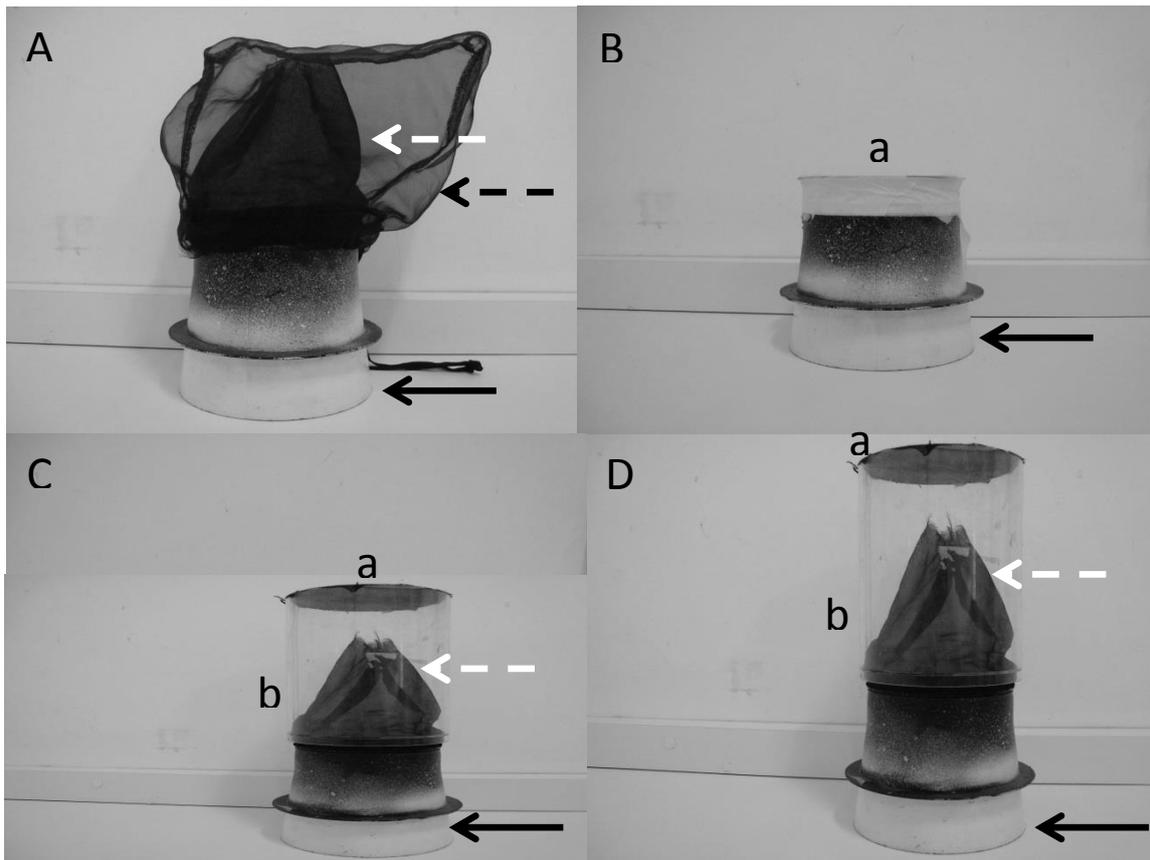


Figura 16. Protótipos dos coletores avaliados em armadilhas BG-Malária. (A) – Padrão; (B) Sem Funil; (C) Rígido Curto; (D) Rígido Longo. Seta Preta - Funil de entrada do coletor; Seta Branca tracejada - Funil de nylon; Seta preta tracejada - Bolsa coletora; (a) Cobertura de nylon; (b) Cilindro acrílico.

#### 4.3.2 Avaliação em campo dos protótipos de tubos coletores

Os tubos coletores foram avaliados em três diferentes áreas, (a) Parque Ambiental do Utinga – Belém, PA; (b) Chácara Boa Esperança – Porto Velho, RO; (c) Fazenda Recanto dos Sonhos – Porto Velho, RO.

Em Belém – PA quatro armadilhas BG-Malária utilizando um dos diferentes modelos de coletores foram instaladas a aproximadamente 40 cm do solo respeitando a distância mínima de 10 m entre os pontos amostrados. As armadilhas foram equipadas com liberadores de CO<sub>2</sub> (taxa de liberação de 25g/h) e instaladas as 18:00 permanecendo por período de 3 horas nos pontos de coleta (Gama et al. 2013). Utilizou-se desenho experimental tipo Quadrado Latino

(4x4), o qual foi repetido três vezes. Já em Porto Velho RO foram utilizadas três armadilhas, uma vez que, nessa localidade não foi utilizado o coletor SF, assim nessa localidade utilizou-se o desenho experimental de quadrado latino (3x3) o qual foi repetido quatro vezes.

Cada noite os mosquitos capturados foram triados, contados, verificado o número de pernas e identificados com o auxílio de chave dicotômica (Forattini 2002). O número de mosquitos capturados e danificados foi utilizado como parâmetro para comparar a eficiência dos diferentes tubos coletores.

#### *4.3.3 Avaliação dos protótipos coletores em laboratório: influência do tempo de permanência do mosquito no tubo coletor na quantidade de danos sofrida pelo inseto*

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Pará (UFPA). A armadilha utilizada foi instalada em sala (4 x 5 x 2,5m) mantida a 28°C e aproximadamente 70% de umidade relativa do ar. Adaptações nas portas e janelas foram realizadas visando evitar a fuga dos mosquitos.

Para observar e comparar os danos causados aos mosquitos nos diferentes protótipos de tubos coletores e a influência do tempo nesse dano 50 fêmeas de *Anopheles sp* de laboratório foram inseridas no interior do tubo coletor da armadilha em funcionamento onde permaneciam por diferentes intervalos de tempo. Foram realizados experimentos com duração de 30, 60, 120 e 360 minutos. Para cada modelo de tubo coletor foram realizadas cinco réplicas de cada experimento, totalizando 250 mosquitos por experimento. Os mosquitos utilizados nesta fase do estudo eram verificados antes do experimento para confirmação de sua integridade, de forma que os danos observados posteriormente eram considerados efeitos da armadilha.

## **4.4 – Aprimoramento dos liberadores de CO<sub>2</sub>**

### *4.4.1 Desenvolvimento de novos protótipos liberadores de CO<sub>2</sub>*

*Protótipos de isopor (R):* Visando a obtenção de liberadores de gás carbônico a partir de gelo seco de fácil manuseio em campo e que mantivessem uma taxa de liberação constante foram desenvolvidos liberadores de CO<sub>2</sub> baseados no liberador padrão, porém com mangueiras de diâmetro diferentes. Assim, foram utilizadas garrafas de isopor apresentando em sua parte superior um furo onde era acoplada uma mangueira plástica de silicone com um dos diferentes diâmetros: (i) 2,00mm, (ii) 4,00mm, (iii) 6,62mm e (iv) 9,65mm. Para aferir a taxa de liberação foi adicionada de 200 – 350g de gelo seco aos liberadores e três réplicas de cada modelo de liberador foram deixados evaporar em ambiente aberto.

*Protótipos de isopor e metal (L):* Um segundo experimento utilizando diferentes tipos de liberadores foi realizado. Os novos liberadores foram compostos por garrafas metálicas de 500mL acopladas a mangueiras plásticas de silicone com os seguintes diâmetros: (i) 2,00mm, (ii) 6,62mm e (iii) 9,65mm. Esta garrafa era encerrada dentro de uma de isopor cuja tampa era furada de acordo com o diâmetro da mangueira utilizada, permitindo a liberação do CO<sub>2</sub> no ambiente.

Para aferir a taxa de liberação deste sistema foram adicionadas de 200 – 350g de gelo seco aos liberadores e a cada hora, durante o período de 6 horas, os liberadores foram pesados em balança analítica, e a diferença entre o peso final e o peso inicial foi utilizada para obter a taxa de liberação de CO<sub>2</sub>. Além disso, dados de temperatura e umidade foram verificados a cada hora, para verificar o efeito dessas variáveis na taxa de liberação de gás carbônico.

#### 4.4.2 Avaliação em campo do uso de diferentes protótipos de liberadores de CO<sub>2</sub> como atraente de anofelinos na BG-Malária;

A avaliação dos diferentes protótipos de liberadores de CO<sub>2</sub> ocorreram em dois diferentes experimentos: (*Experimento 1*): Avaliação do protótipos R (isopor com mangueiras de diferentes diâmetros) foi realizada em Porto Velho – RO; (*Experimento 2*): Avaliação do protótipos L (isopor, garrafa de alumínio com mangueiras de diferentes diâmetros) realizada em Belém – PA e Porto Velho – RO. Ambos os experimentos seguiram delineamento experimental de quadrado latino, sendo que as armadilhas foram instaladas em campo as 18:00 h permanecendo por período de três horas.

### 4.5 Utilização de leveduras como atraente em armadilhas BG-Malária

#### 4.5.1 Desenvolvimento de liberadores de CO<sub>2</sub> utilizando o processo de fermentação do açúcar por leveduras

Seis diferentes soluções foram utilizadas: (Y1) 10g levedura + 250g de açúcar cristal, (Y1a) 10g de levedura + 500g de açúcar cristal, (Y2) 20g de levedura + 250g de açúcar cristal, (Y2a) 20g de levedura + 500g de açúcar cristal, (Y3) 30g de levedura + 250g de açúcar cristal e (Y3a) 30g de levedura + 500g de açúcar cristal. As soluções foram preparadas em garrafas pet de 5L nas quais na parte superior (tampa) foi acoplada a mangueira de 7mm de diâmetro. Cada solução foi preparada em 2l de água e a levedura da espécie *S. cerevisiae* da marca Dr. Oetker<sup>Tm</sup> foi utilizada.

Para verificar a taxa de liberação de gás carbônico pelo processo de fermentação foi utilizado o método de deslocamento de água. O método consiste na liberação do gás em um recipiente graduado submerso em um container com água (Figura 17). O gás desloca a água do recipiente graduado para o container e o tempo que o liberador leva para deslocar 100mL da água é cronometrado, sendo utilizado para obter a taxa de liberação em mL/min (Saitoh et al.,

2004; Smallegange et al., 2010). Além disso, os dados de temperatura e umidade foram coletados durante as medidas para verificar a influência desses fatores na taxa de liberação de CO<sub>2</sub>.

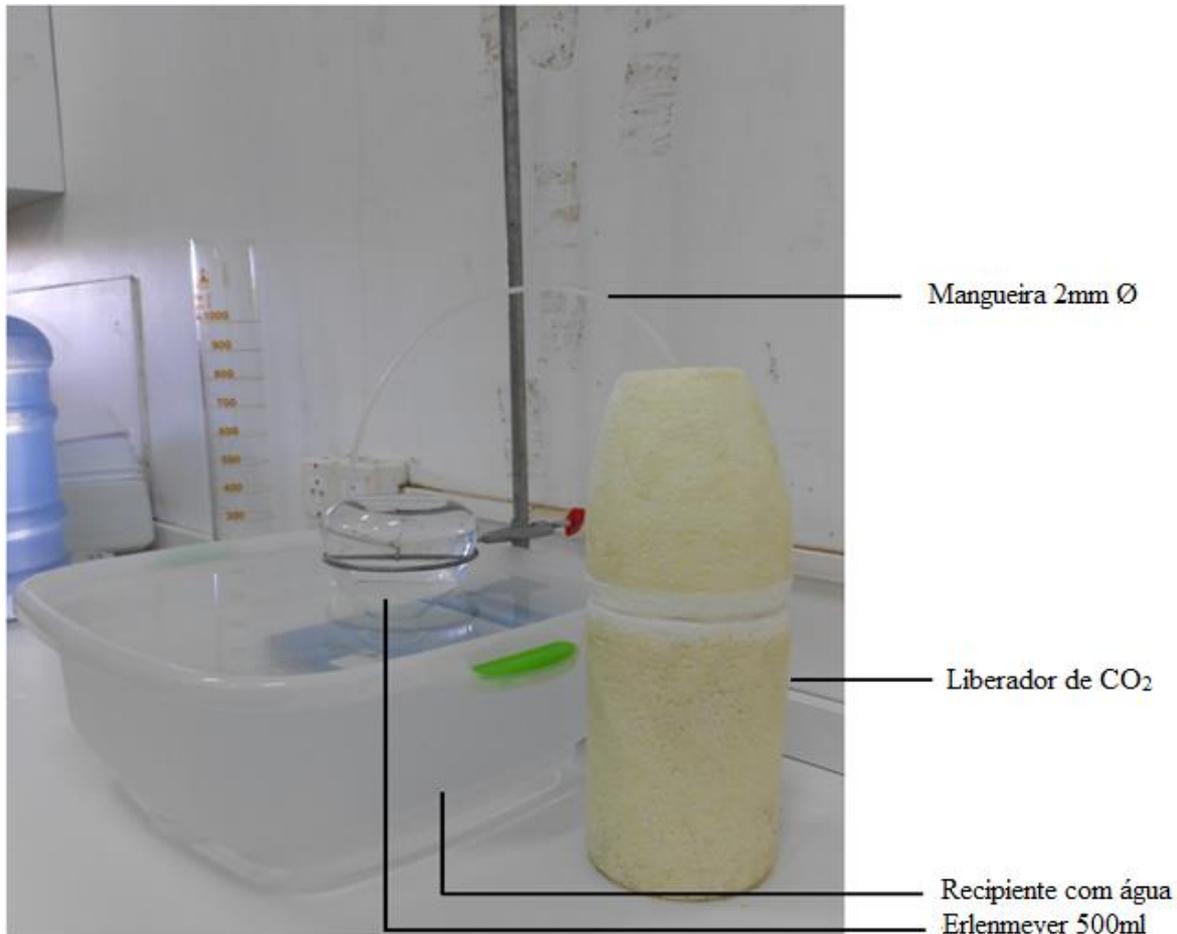


Figure 17- Sistema de quantificação da taxa de liberação de CO<sub>2</sub> em mL/min.

#### 4.5.2 Avaliação da taxa de captura de anofelinos em armadilhas BG-Malária utilizando liberadores de CO<sub>2</sub> a partir de gelo seco e leveduras

A solução que apresentou a melhor taxa de liberação de gás carbônico foi testada em campo e comparada com os liberadores de gelo seco. Dessa forma, os liberadores foram testados junto às armadilhas BG-Malária de modo que quatro diferentes tratamentos foram utilizados: (i) Controle – sem adição de CO<sub>2</sub>, (ii) L2 – garrafa metálica e mangueira de 2,00mm de diâmetro, (iii) L4 - garrafa metálica e mangueira de 9,65mm de diâmetro e (iv) Levedura - garrafa 5L pet e mangueira de 7,00mm de diâmetro. As coletas foram realizadas em Candeias

do Jamari – RO, seguindo o delineamento experimental de Quadrado Latino (4 x 4), sendo respeitado a distância mínima de 10m entre cada tratamento.

#### **4.6 – Comparação do novo protótipo da armadilha BG-Malária com a coleta por atração em humanos**

*4.6.1* Comparação da taxa de captura de *An. darlingi* em armadilhas BG-Malária com a coleta por atração em humanos.

Visando comparar a taxa de captura de *An. darlingi* das armadilhas BG - Malária iscada com a melhor fonte de CO<sub>2</sub> (L2 – protótipo de liberador de metal com mangueira plástica de 2mm) com a coleta por atração em humanos foram realizadas coletas de quatro horas (18:00 – 22:00h) em Candeias do Jamari, RO.

O delineamento experimental de quadrado latino (2 x 2) foi utilizado, sendo que havia uma distância mínima de 10m entre a armadilha e a pessoa que estava realizando a Atração humana. A atração humana foi realizada por três diferentes indivíduos do sexo masculino com idade entre 25 a 35 anos, os quais fazem parte da equipe do Laboratório de Entomologia da FIOCRUZ/RO. Nessa instituição fazem parte do projeto de Monitoramento de Insetos Vetores o qual foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisas (CAAE 02285812.3.0000.0011), onde realizam a atração humana rotineiramente.

Os mosquitos foram coletados utilizando capturador de castro e armazenados em copos plásticos de 10cm de altura com a parte superior coberta com tela fina 2mm. Nos copos foram anotados os dados de data e hora da captura, coletor, temperatura e umidade. A cada hora o tubo de contenção da armadilha e o copo de coleta da atração humana foram substituídos e os dados de temperatura e umidade registrados. Os mosquitos coletados foram levados para laboratório e identificados em esteriomicroscópio com o auxílio de chave dicotômica.

#### 4.7 Análise de dados

Os dados obtidos foram analisados no *software* estatístico gratuito *R* (R Development Core Team 2007) utilizando GLM (Modelos Lineares Generalizados). Quando a variável explicativa (x) se tratava de variável categórica os dados foram analisados utilizando ANOVA, quando a variável resposta (y) apresentou mais de um nível os dados foram submetidos à análise de contraste. Quando variável explicativa (x) se tratava de variável contínua os dados foram ajustados a Regressão, e o tipo de regressão utilizada (i.e logística, quadrada ou contínua) era selecionado de acordo com a variável resposta.

A distribuição de erros foi ajustada de acordo com o tipo de dado obtido: (i) Poisson – dados de contagem, (ii) Binomial – dados de proporção e (iii) Gaussian – dados normais, além disso, os modelos foram checados para sob ou sobredispersão e quando necessário os dados ajustados para quasipoisson, quasibinomial ou binomial negativa.

Quando haviam co-variáveis (e.g temperatura, umidade etc), as mesmas eram incorporadas de forma que as análises foram realizadas com o modelo mais complexo até atingir o MMA (Modelo Mínimo Adequado) (Crawley 2007, Bolker et al. 2009, O’Hara & Kotze 2010, Warton & Hui 2011, Lindén & Mäntyniemi 2011).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Resultados Gerais

Durante o período de realização do projeto foram coletados 11345 anofelinos em três diferentes localidades: (i) Belém – PA, (ii) Porto Velho – RO e (iii) Candeias do Jamari – RO (Tabela 2). Em Belém foi coletada maior diversidade de espécies (9), entretanto nessa localidade houve predominância de *An. triannulatus*, enquanto que nas cidades do Estado de Rondônia foram coletadas seis espécies, sendo que nessas localidades *An. darlingi* representou 95% do total de anofelinos coletados.

Tabela 2. Espécies de anofelinos coletados entre Março de 2010 a Fevereiro de 2013

	Área		
	Belém	Porto Velho	Candeias do Jamari
<i>Anopheles darlingi</i>	4	3361	6750
<i>Anopheles triannulatus</i>	322	110	0
<i>Anopheles nuneztovari</i>	243	9	28
<i>Anopheles aquasalis</i>	43	0	0
<i>Anopheles evansae</i>	39	0	0
<i>Anopheles benarrochi</i>	37	0	0
<i>Anopheles intermedius</i>	14	0	0
<i>Anopheles konderi</i>	0	2	7
<i>Anopheles minor</i>	0	0	2
<i>Anopheles argyritarsis</i>	2	0	0
<i>Anopheles sp.</i>	40	220	112

### 5.2 Aprimoramento do sistema de retenção dos mosquitos na armadilha

#### 5.2.1 Avaliação em campo dos protótipos de tubos coletores

Nos experimentos realizados na área pertencente a Belém-PA foram coletadas 488 fêmeas de *Anopheles*, pertencentes a cinco diferente espécies. A espécie coletada em maior abundância foi *Anopheles nuneztovari* representando cerca de 50% do total de mosquitos coletados seguida por *An. triannulatus* com 28,5% do total coletado. Dos indivíduos coletados

apenas 40 não puderam ser identificados devido a danos nas pernas posteriores, o que representa menos de 10% do total de mosquitos coletados (Tabela 3).

Tabela 3. Espécies de anofelinos coletados nos diferentes modelos de tubos coletores durante o experimento realizado em Belém-PA. RC= Rígido Curto; RL= Rígido Longo; SF= Sem Funil, P= Padrão

	Tubos Coletores				TOTAL
	RC	RL	SF	P	
<i>Anopheles nuneztovari</i>	72	55	50	54	231
<i>Anopheles triannulatus</i>	49	16	28	46	139
<i>Anopheles evansae</i>	14	5	10	8	39
<i>Anopheles benarrochi</i>	13	12	7	7	37
<i>Anopheles argyritarsis</i>	0	0	1	1	2
<i>Anopheles</i> sp.	5	5	10	20	40
<b>TOTAL</b>	153	93	106	136	488

A quantidade média de mosquitos coletados diferiu significativamente entre os coletores, sendo que a análise de contraste indicou que os protótipos Sem funil e Rígido longo capturaram significativamente menos mosquitos do que o coletor Rígido curto (ANOVA -  $\chi^2=4.75$ ,  $df = 35$ ,  $p < 0.05$ ). Além disso, diferente dos demais tubos coletores o SF não apresenta funil em seu interior apresentando maior dificuldade para manutenção dos mosquitos capturados quando a armadilha era desligada, sendo, portanto, excluído dos experimentos posteriores em Porto Velho-RO. Quando considerado o dano aos insetos foi observado a maior proporção de mosquitos danificados foi encontrada no coletor Padrão ( $4,00 \pm 1,24$ ;  $\chi^2 = -2.82$ ;  $df=44$ ;  $p=0.01$ ) seguido por Sem funil ( $2.25 \pm 0.77$ ), Rígido curto ( $1,66 \pm 0,63$ ) e Rígido longo ( $0,91 \pm 0,48$ ), embora não tenha sido observada diferença significativa entre os modelos Rígido curto e Rígido longo ( $\chi^2=-0.07$ ;  $df=43$ ;  $p=0.62$ ; Figura 18).

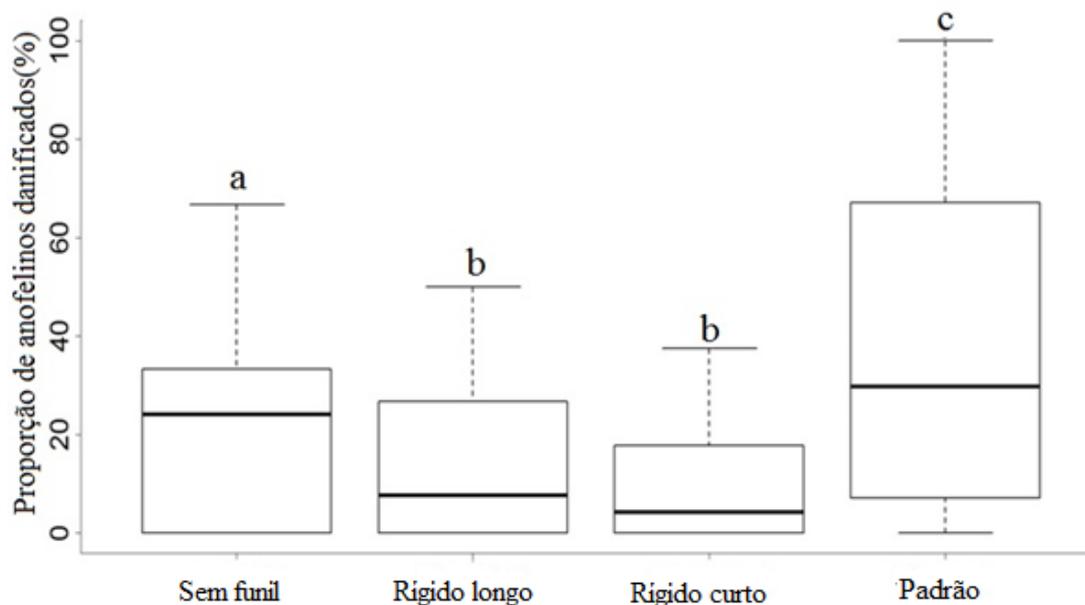


Figura 18. Boxplot de anofelinos danificados nos diferentes protótipos de coletores da armadilha BG-Malária (Belém, PA). Colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa  $p < 0.05$ .

No experimento realizado em Porto Velho foi coletado um total de 1796 fêmeas de *Anopheles* sp das quais 1604 (89%) foram identificadas como *An. darlingi*. Dos mosquitos coletados 192 não puderam ser identificados devido a danos ocorridos nas pernas posteriores (Tabela 4). Nesse caso, a quantidade de mosquitos danificados foi de cerca de 10%, similar à observada em Belém-PA.

Tabela 4. Espécies de anofelinos coletados nos diferentes modelos de tubos coletores durante o experimento realizado em Porto Velho-RO. P= Padrão; RC= Rígido Curto e RL= Rígido Longo.

	Tubo Coletor			TOTAL
	P	RC	RL	
<i>Anopheles darlingi</i>	514	481	609	1604
<i>Anopheles</i> sp.	135	30	27	192
<b>TOTAL</b>	<b>649</b>	<b>511</b>	<b>636</b>	<b>1796</b>

A média de mosquitos coletados diferiu significativamente entre os coletores (ANOVA,  $df = 34$ ;  $\chi^2 = -7.70$ ;  $p < 0.01$ ), sendo que a análise de contraste indicou não haver diferença apenas

entre os coletores Padrão e Rígido longo ( $\chi^2 = -0.31$ ;  $df = 33$ ;  $p = 0.57$ ). Entretanto, quando considerado a proporção de insetos danificados foi observado diferença significativa entre os protótipos utilizados (ANOVA;  $df = 32$ ;  $\chi^2 = 5.48$ ;  $p < 0.05$ ), sendo que a análise de contraste indicou que a maior proporção de anofelinos danificados foi encontrada no coletor Padrão ( $\chi^2 = 4.7587$ ;  $df = 33$   $p > 0.05$ ) (Figura 19).

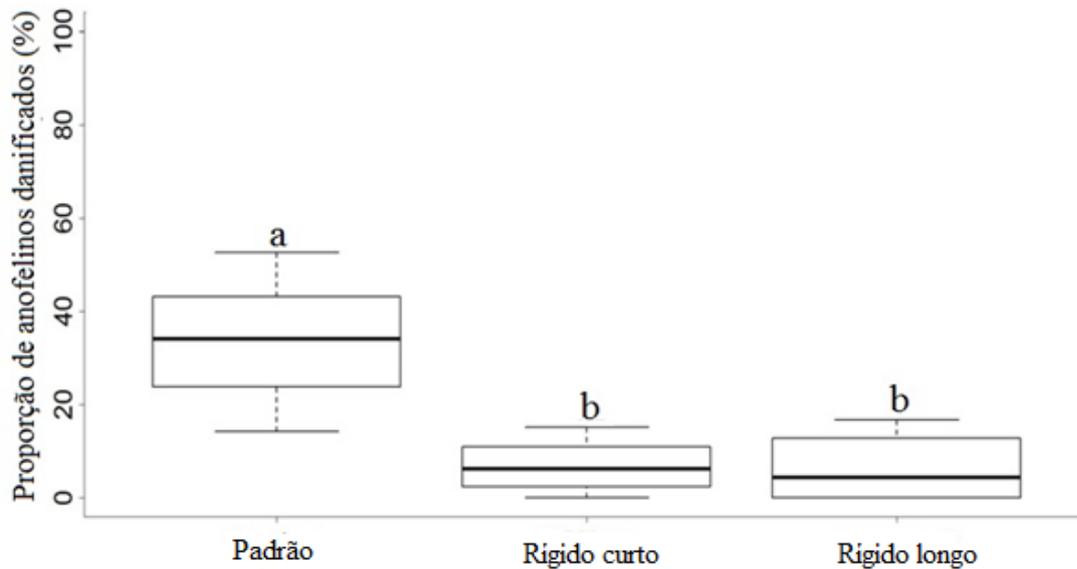


Figura 19. Proporção de anofelinos danificados nos diferentes protótipos de coletores da armadilha BG-Malária (Porto Velho, RO). Colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa  $p < 0.05$ .

Além disso, nos experimentos realizados em Porto Velho foi observado que a quantidade de insetos capturados influenciou significativamente a quantidade de insetos danificados em todos os modelos de tubos coletores avaliados (Regressão logística,  $df = 34$ ;  $\chi^2 = -251.40$ ;  $p < 0.01$ ), entretanto, esse efeito foi mais evidenciado no coletor Padrão (ANCOVA,  $df = 33$ ;  $\chi^2 = -379.57$ ;  $p < 0.01$ ; Figura 20).

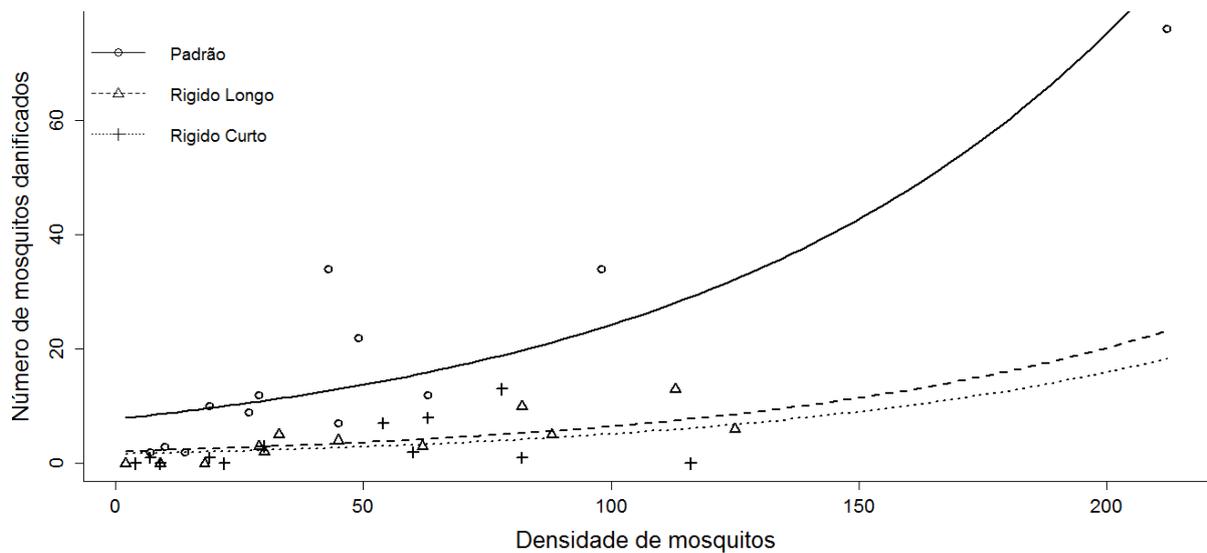


Figura 20. Número de anofelinos danificados em função da densidade de insetos capturados nos coletores na armadilha BG-Malária. P = Padrão, RC = Rígido curto, RL = Rígido Longo (Regressão D.F = 12;  $p < 0.05$ ).

### 5.2.2 Avaliação em laboratório dos protótipos coletores: influência do tempo de permanência do mosquito no tubo coletor na quantidade de danos sofrida pelo inseto

Os resultados obtidos nos experimentos de laboratório foram semelhantes aos observados em campo, demonstrando que os protótipos coletores rígidos (Rígido curto e Rígido longo) danificaram significativamente menos insetos que o coletor padrão. Além disso, foi observado um efeito positivo do tempo de permanência do mosquito no interior da armadilha e a quantidade de insetos danificados, sendo que, esse efeito foi mais pronunciado no coletor Padrão (ANCOVA; d.f = 56,  $p = 0.017$ ; Figura 21).

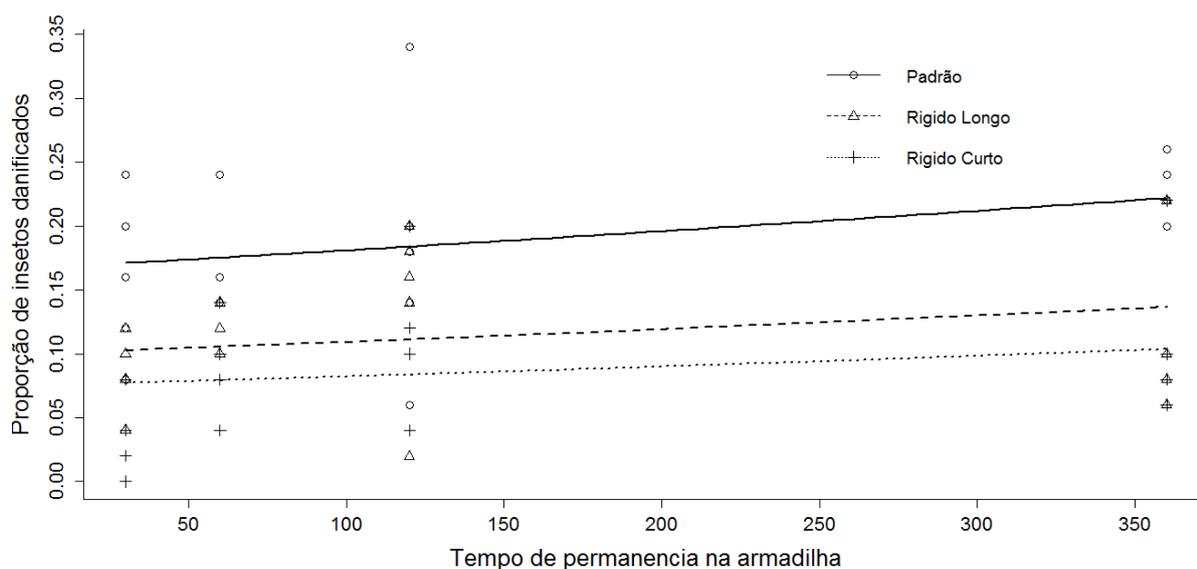


Figura 21. ANCOVA indicando a influência do tempo na proporção de anofelinos danificados nos diferentes protótipos de coletores. P = Padrão; RC= Rígido curto; RL = Rígido Longo.

### 5.3 Aprimoramento dos liberadores de CO<sub>2</sub>

#### 5.3.1 Desenvolvimento de novos protótipos liberadores de CO<sub>2</sub>

Nos experimentos realizados com os liberadores compostos apenas por garrafa de isopor e mangueiras plásticas não foi observada diferença significativa (ANOVA) na taxa média de liberação de CO<sub>2</sub> sendo as taxas obtidas de: 24.93 g/h em R1 (controle – 2mm), 23.62 g/h em R2 (3.6mm), 22.97 g/h em R3 (6.62mm) e 22.19 g/h em R4 (9.65mm) (Figura 22).

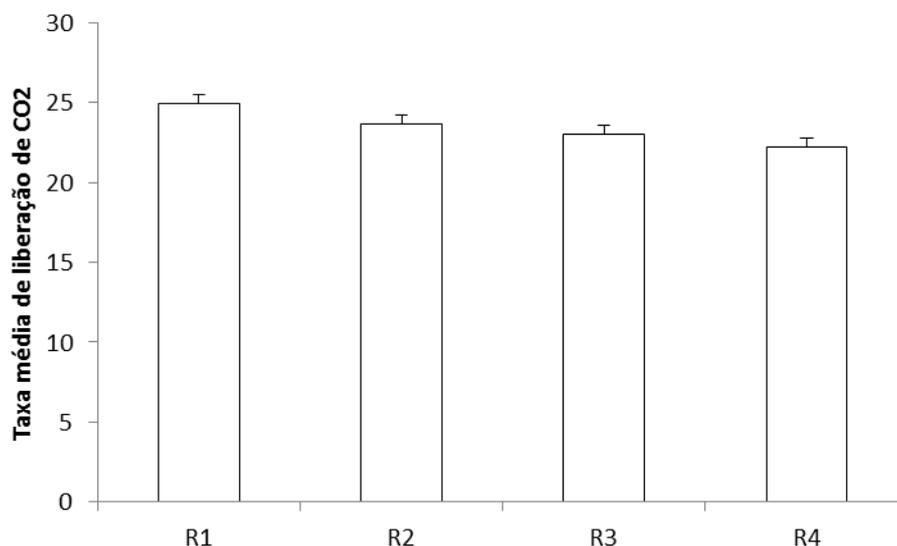


Figura 22. Taxa de liberação de CO<sub>2</sub> g/h em liberadores composto por isopor, e mangueira plástica. Diâmetro das mangueiras de liberação: R1 = 2.00mm; R2 = 3.6; R3= 6.62; R4 = de 9.65.

Ao considerar o comportamento de liberação ao longo das seis horas de experimento, foi possível observar que a taxa de liberação diminuiu significativamente com o tempo (ANOVA,  $F_{7,47} = 33.41$ ,  $p < 0.01$ ), sendo que na primeira hora do experimento essa redução foi de aproximadamente 35%. Posteriormente a cada 60 min a taxa de CO<sub>2</sub> reduzia em cerca de 10%, sendo que após quatro horas de experimento menos de 50% CO<sub>2</sub> era liberada. Outro dado importante é que não houve interação significativa entre o tempo e o diâmetro da mangueira utilizada na taxa de liberação de CO<sub>2</sub> (ANOVA  $F_{3,47} = 0.75$ ,  $p = 0.52$ ), ou seja, diferente do esperado, o tempo foi a única variável a influenciar a quantidade de CO<sub>2</sub> liberada (Figura 23).

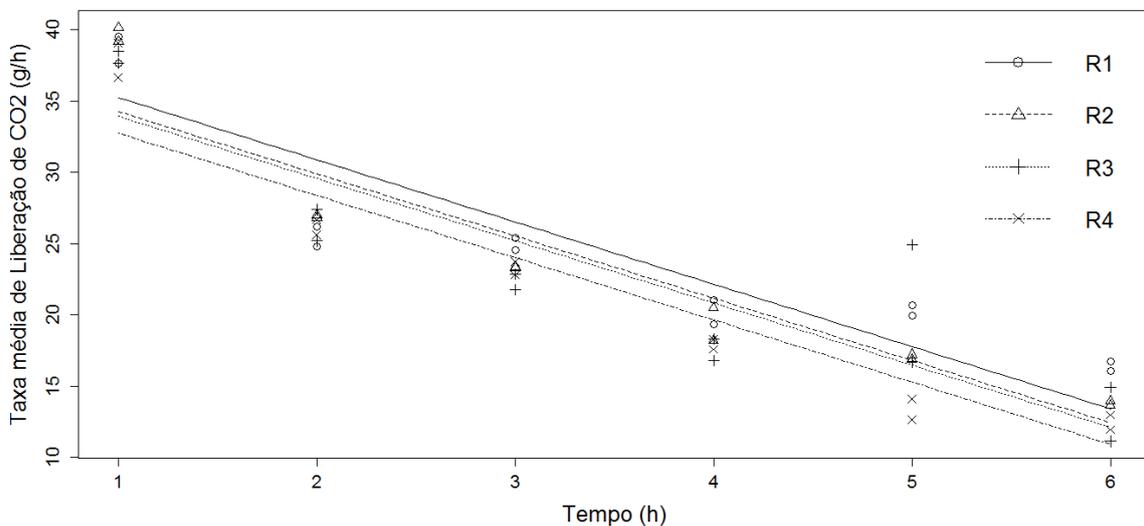


Figura 23. Taxa de liberação de CO<sub>2</sub> em liberadores composto por isopor, e mangueira plástica ao longo do tempo. R1 = mangueira 2.00mm; R2 = mangueira 3.6; R3= mangueira 6.62; R4 = mangueira de 9.65.

Quando adicionado ao modelo o efeito da temperatura e umidade foi observado que a taxa de liberação aumenta significativamente com a temperatura (ANOVA,  $F_{1,42} = 49.93$ ,  $p < 0.0001$ ; Figura 24A) e diminui significativamente com a umidade (ANOVA,  $F_{1,42} = 32.83$ ,  $p < 0.0001$ ; Figura 24B).

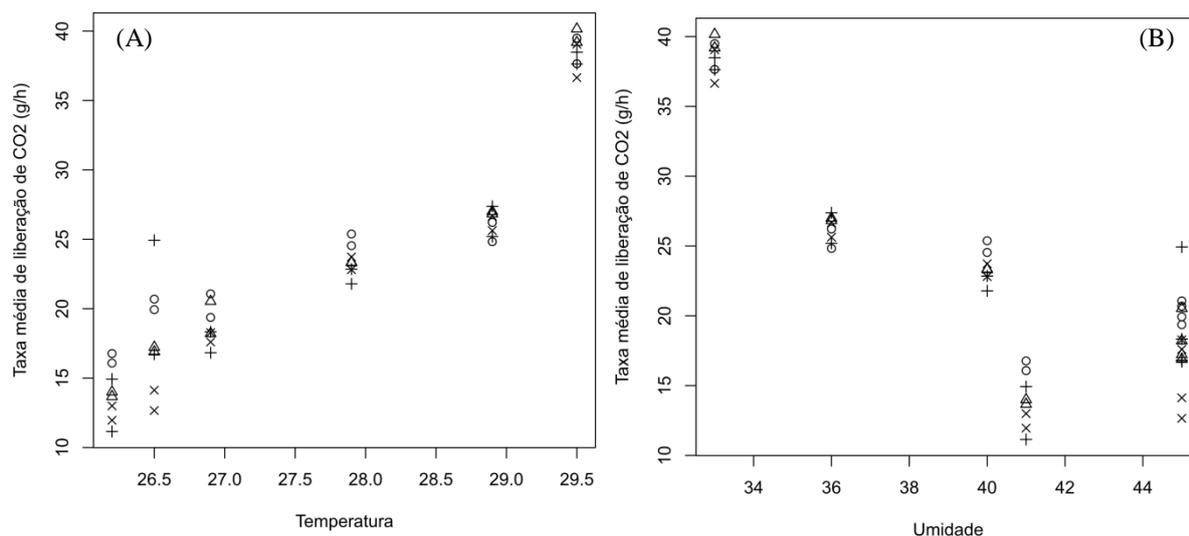


Figura 24. Efeito da temperatura (A) e da umidade (B) na taxa de liberação de CO<sub>2</sub> em liberadores de isopor e mangueira plástica.

Quando considerado os protótipos de liberadores que utilizavam garrafa de metal foi observada diferença significativa entre as taxas médias de liberação, ou seja, a quantidade de CO<sub>2</sub> liberada aumenta de acordo com diâmetro da mangueira utilizada ( $F_{3,54}=29.94$ ,  $p<0.01$ ). Nesse caso, o liberador L4 apresentou a maior taxa de liberação de CO<sub>2</sub> (65,72g/h), a qual foi cerca de duas vezes maior do que a obtida com o L1 (27.4g/h), liberador padrão utilizado na armadilha (Figura 25).

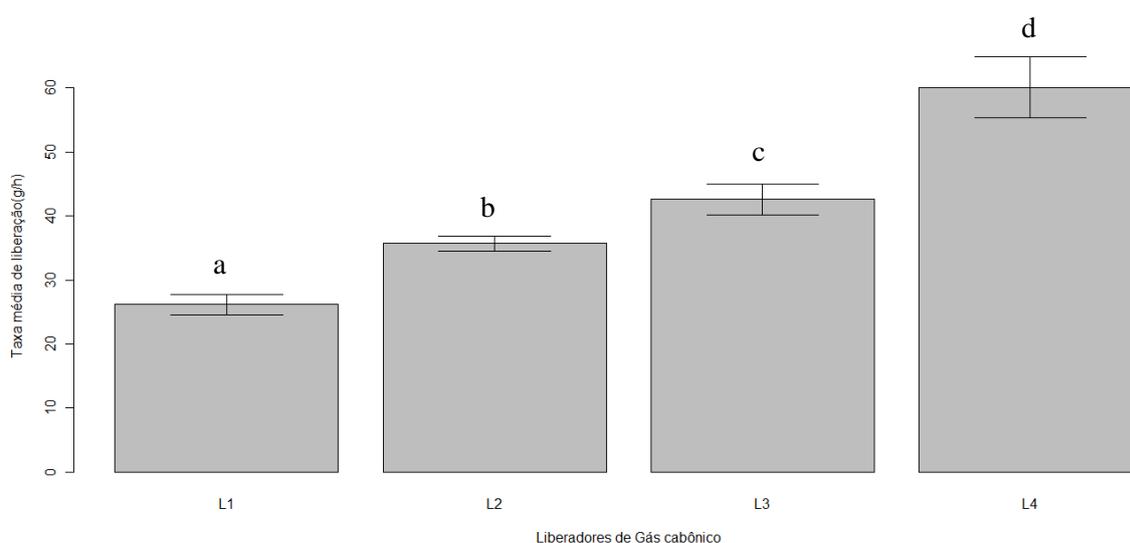


Figura 25. Taxa de liberação de CO<sub>2</sub> em liberadores composto por isopor, garrafa de alumínio e mangueira plástica. Barras seguidas por letras diferentes indicam diferença estatística ( $F_{51,3}= 29,984$ ;  $p < 0.05$ ) L1 = mangueira 2,00mm sem garrafa metálica; L2 = mangueira 2,00mm; L3= mangueira 6.62mm; L4 = mangueira de 9.65mm.

De maneira similar ao observado para os liberadores de isopor, nos liberadores que apresentavam garrafa de metal o tempo influenciou negativamente na taxa de liberação, ou seja, à medida que o tempo passou diminuiu a quantidade de CO<sub>2</sub> liberada (Figura 26).

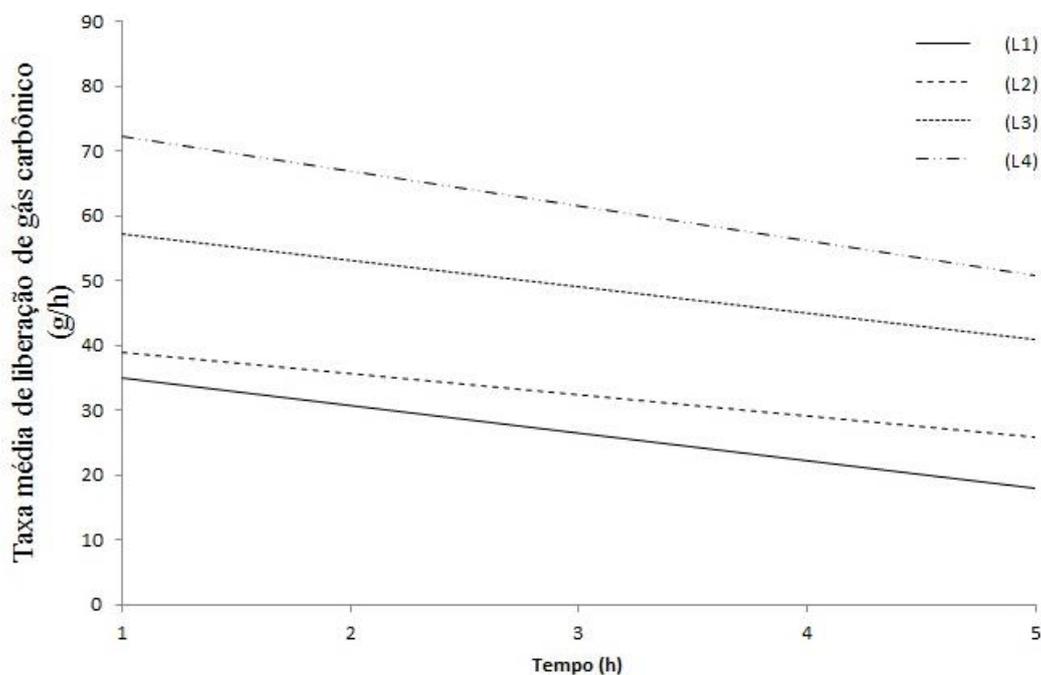


Figura 26. Taxa de liberação de CO<sub>2</sub> em liberadores composto por isopor, garrafa de alumínio e mangueira plástica.

### 5.3.2 Avaliação em campo do uso de diferentes taxas de CO<sub>2</sub> como atraente de anofelinos na BG-Malária

Em campo utilizando os protótipos R (mangueira plástica e recipiente de isopor) foram capturadas 1336 fêmeas de *Anopheles* das quais 1293 foram identificadas como *An. darlingi*. O maior número de mosquitos foi coletado em armadilhas BG-Malária iscada com o liberador R4 ( $37.50 \pm 8.43$ ) e o menor número nas armadilhas que utilizavam R2 ( $20.08 \pm 5.99$ ), sendo essa diferença estatisticamente significativa (ANOVA d.f =47,  $\chi^2 = -84.46$ ,  $p < 0.0001$ , Figura 27). Vale ressaltar que devido a inconsistências observadas (i.e taxas de liberação similar) os protótipos R não foram testados em Belém PA.

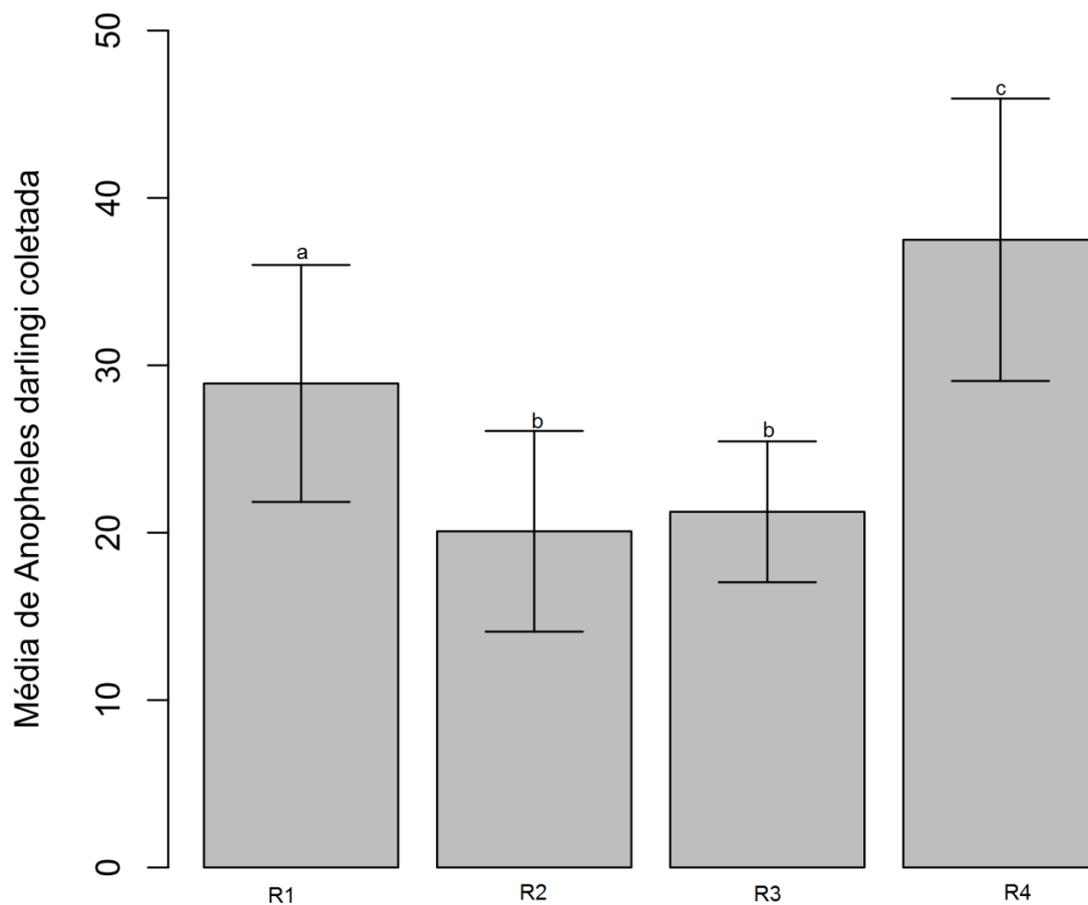


Figura 27. Média de fêmeas de *Anopheles darlingi* coletada por noite utilizando armadilhas BG-Malária com diferentes liberadores. R1 = mangueira 2.00mm; R2 = mangueira 3.6; R3= mangueira 6.62; R4 = mangueira de 9.65. Barras seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa.

Quando os protótipos L (garrafa de metal + recipiente de isopor + mangueira plástica) foram testados em Belém-PA foram capturados 289 anofelinos. A espécie coletada em maior abundância foi *An. trianulatus* (183) seguido por *An. aquasalis* (43), *Anopheles intermedius* (14), *An. nuneztovari* (12) e *An. darlingi* (4). Além disso, foram coletadas 32 (11,8%) fêmeas que não puderam ser identificadas (Tabela 5).

Tabela 5. Espécies de anofelinos coletadas utilizando os diferentes liberadores Belém-PA

	Liberadores				TOTAL
	L1	L2	L3	L4	
<i>Anopheles triannulatus</i>	33	39	43	68	183
<i>Anopheles aquasalis</i>	4	14	12	13	43
<i>Anopheles intermedius</i>	3	0	1	10	14
<i>Anopheles nuneztovari</i>	4	1	0	7	12
<i>Anopheles darlingi</i>	2	1	0	1	4

L1 = mangueira 2,00mm sem garrafa metálica; L2 = mangueira 2,00; L3= mangueira 6.62mm; L4 = mangueira de 9.65mm.

A média de anofelinos capturados por noite em armadilhas que utilizavam o liberador L4 foi significativamente superior a encontra nas demais armadilhas (ANOVA  $\chi^2 = -32.61$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 28).

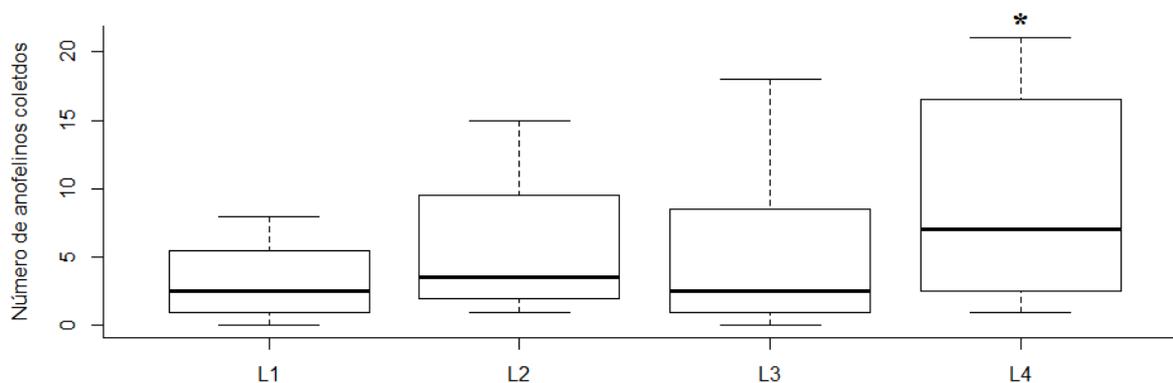


Figura 28. Boxplot de anofelinos capturados por noite com armadilhas BG-Malária utilizando diferentes liberadores. L1 = mangueira 2,00mm sem garrafa metálica; L2 = mangueira 2,00mm; L3= mangueira 6.62mm; L4 = mangueira de 9.65mm. \* indica diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

Já, nos experimentos de avaliação dos liberadores de metal realizado em Candeias do Jamari (RO) foram capturados 1686 anofelinos pertencentes a quatro diferentes espécies *An. darlingi* (1632), *An. nuneztovari* (28), *An. konderi* (2) e *An. minor* (2). A espécie coleta em maior abundância foi *An. darlingi* representando mais de 95% do total de mosquitos coletados e apenas 22 mosquitos não foram identificados até nível de espécie (Tabela 6).

Tabela 6. Espécies de anofelinos coletadas utilizando os diferentes liberadores em Candeias do Jamari – RO

	Liberadores				TOTAL
	L1	L2	L3	L4	
<i>Anopheles darlingi</i>	218	529	443	442	1632
<i>Anopheles konderi</i>	0	2	0	0	2
<i>Anopheles minor</i>	0	0	1	1	2
<i>Anopheles nuneztovari</i>	0	14	9	5	28
<i>Anopheles sp</i>	6	4	8	4	22

L1 = mangueira 2,00mm sem garrafa metálica; L2 = mangueira 2,00mm; L3= mangueira 6.62mm; L4 = mangueira de 9.65mm.

Foi observado que o número de mosquitos coletados nos diferentes tratamentos foi significativamente diferente (ANOVA d.f=64,  $\chi^2 = -143.35$ ,  $p < 0.0001$ ). Nesse caso, a análise de contraste indicou que a maior quantidade de *An. darlingi* foi coletada no liberador L2 (32.43  $\pm$  9.33) e não diferiu entre os liberadores L3 e L4 (Figura 29).

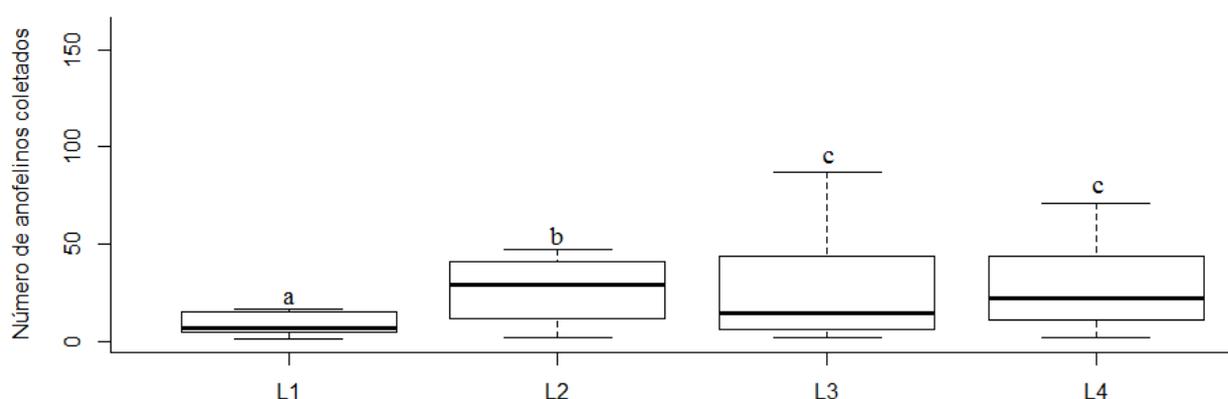


Figura 29. Boxplot de anofelinos capturados por noite em Candeias do Jamari – RO utilizando armadilhas BG-Malária com os diferentes liberadores. L1 = mangueira 2,00mm sem garrafa metálica; L2 = mangueira 2,00; L3= mangueira 6.62mm; L4 = mangueira de 9.65mm. Colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

## 5.4 Utilização de leveduras como atraente em armadilhas BG-Malária

### 5.4.1 Desenvolvimento de liberadores de CO<sub>2</sub> utilizando o processo de fermentação do açúcar por leveduras

A taxa de liberação de CO<sub>2</sub> no processo de fermentação não ultrapassou 100 mL/min, sendo a maior taxa observada no liberador Y2a (68.98mL/min) e a menor em Y1 (22.46) (Tabela 7). Foi observado que liberadores que utilizaram 500g de açúcar para o processo de fermentação liberaram significativamente mais CO<sub>2</sub> do que liberadores que utilizaram 200g (ANOVA  $F_{1,93}=13.52$ ,  $p<0.01$ ). Ainda foi verificado que quando utilizada 200g de açúcar a quantidade de CO<sub>2</sub> produzida aumentou significativamente com a quantidade de levedura utilizada (ANOVA  $F_{1,93}=31.08$ ,  $p<0.01$ ), fato que não ocorreu nos liberadores com 500g de açúcar (Figura 30).

Tabela 7. Taxa de liberação de CO<sub>2</sub> utilizando o processo de fermentação por *S. cerevisiae*

Código	Levedura(g)	Açúcar(g)	Água(L)	Liberação (mL/min)
Y1	10	250	2	22.46
Y1a	10	500	2	28.43
Y2	20	250	2	36.86
Y2a	20	500	2	68.98
Y3	30	250	2	54.11
Y3a	30	500	2	53.21

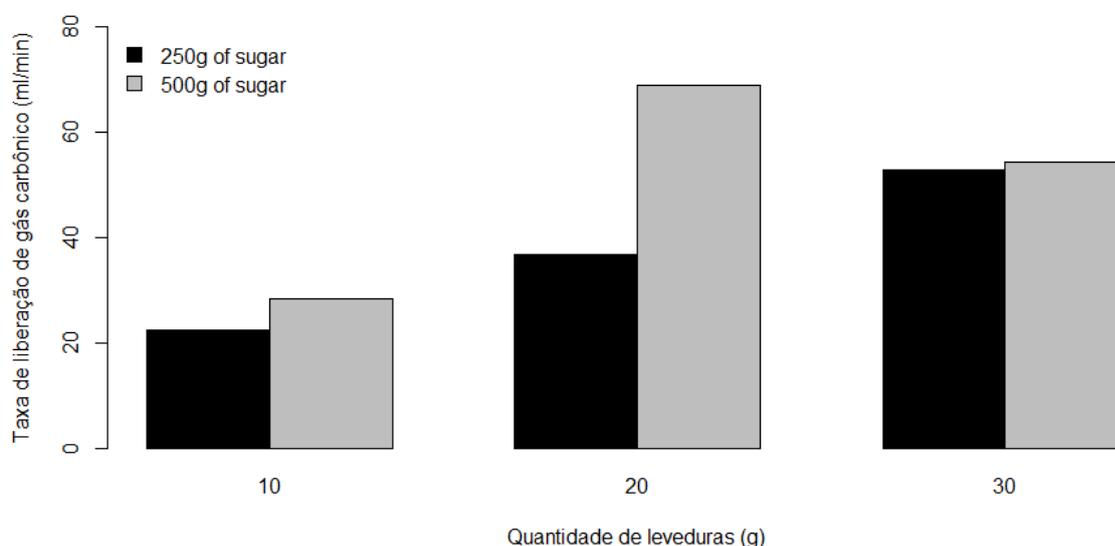


Figura 30. Taxa de liberação de gás carbônico nas diferentes concentrações de açúcar e levedura.

Quando acrescentada ao modelo a variável temperatura foi observado que nos liberadores Y2, Y2a e Y3 quanto maior a temperatura maior a quantidade de CO<sub>2</sub> produzida (ANOVA  $F_{5,88}=5.06$ ,  $p<0.01$ ). Já para os liberadores Y1, Y1a e Y3 a temperatura apresentou efeito negativo. Foi observado que não houve diferença significativa na taxa de liberação de CO<sub>2</sub> entre os liberadores Y1 e Y1a (ANOVA,  $F_{2,85}=1.31$ ,  $p=0.27$ ) (Figura 31).

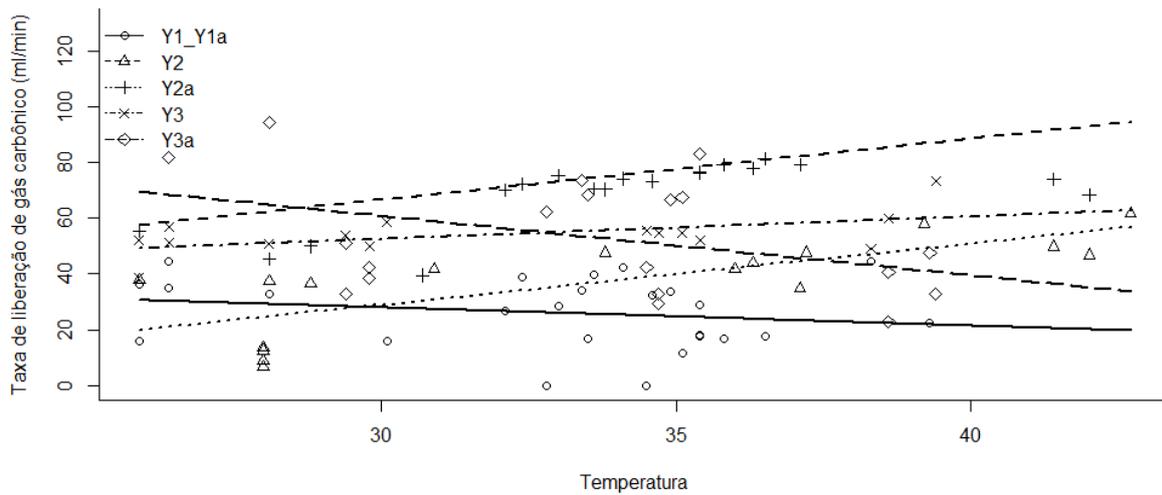


Figura 31. Influência da temperatura na taxa de liberação de gás carbônico nos diferentes liberadores. Y1 = 10g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y1a = 10g *S. cerevisiae* + 500g açúcar; Y2 = 20g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y2a = 20g *S. cerevisiae* + 500g açúcar; Y3 = 30g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y3a = 30g *S. cerevisiae* + 500g açúcar

Nos liberadores Y1, Y1a e Y2 a quantidade de CO<sub>2</sub> produzida aumentou de acordo com o tempo de exposição da solução em campo, enquanto que para os demais liberadores (Y2a, Y3 e Y3a) a produção de CO<sub>2</sub> diminuiu com o tempo (ANOVA,  $F_{11,94}=12.53$ ,  $p<0.01$ ) (Figura 32).

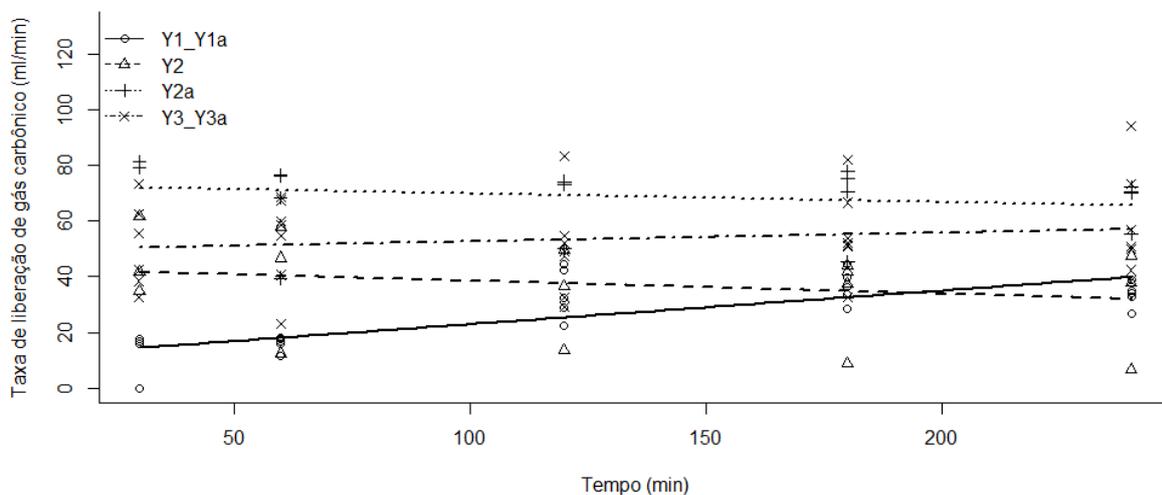


Figura 32. Influência do tempo na taxa de liberação de gás carbônico nos diferentes liberadores. Y1 = 10g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y1a = 10g *S. cerevisiae* + 500g açúcar; Y2 = 20g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y2a = 20g *S. cerevisiae* + 500g açúcar; Y3 = 30g *S. cerevisiae* + 250g açúcar; Y3a = 30g *S. cerevisiae* + 500g açúcar

#### 5.4.2 Comparação da taxa de captura de anofelinos entre armadilhas BG-Malária utilizando liberadores de CO<sub>2</sub> a partir de gelo seco e leveduras

Apenas o liberador Y2a foi testado em campo, uma vez que foi o que apresentou a maior taxa de liberação de gás carbônico. Nesses experimentos foram coletadas cinco diferentes espécies de anofelinos, das quais *An. darlingi* foi a espécie capturada em maior abundância (1757 indivíduos), seguido por *An.triannulatus* (110 indivíduos) e *Anopheles* sp (28 indivíduos)(Tabela 8).

Tabela 8. Espécies de mosquitos coletados em Porto Velho (RO) e Candeias do Jamari (RO)

	Controle	L2	L4	Levedura
<i>Anopheles darlingi</i>	14	857	792	94
<i>Anopheles triannulatus</i>	0	52	56	2
<i>Anopheles konderi</i>	0	0	2	0
<i>Anopheles nuneztovari</i>	0	3	6	0
<i>Anopheles</i> sp	0	11	17	0
<b>Total</b>	17	1181	1145	193

Tratamentos utilizados: Controle = armadilha BG-Malária sem CO<sub>2</sub>; L2 = Armadilha BG-Malária utilizando L2 iscadas com CO<sub>2</sub> a 220mL/min; L4 = Armadilhas BG-MALÁRIA iscadas com CO<sub>2</sub> a 450mL/min e Y2a = Armadilhas BG-MALÁRIA iscadas com CO<sub>2</sub> = 70mL/min.

Foi observado que, embora o processo de fermentação capture mais mosquitos que a armadilha controle (sem adição de CO<sub>2</sub>) quando comparado à adição de gelo seco, o mesmo captura cerca de 10 vezes menos mosquitos que as demais armadilhas (Figura 33).

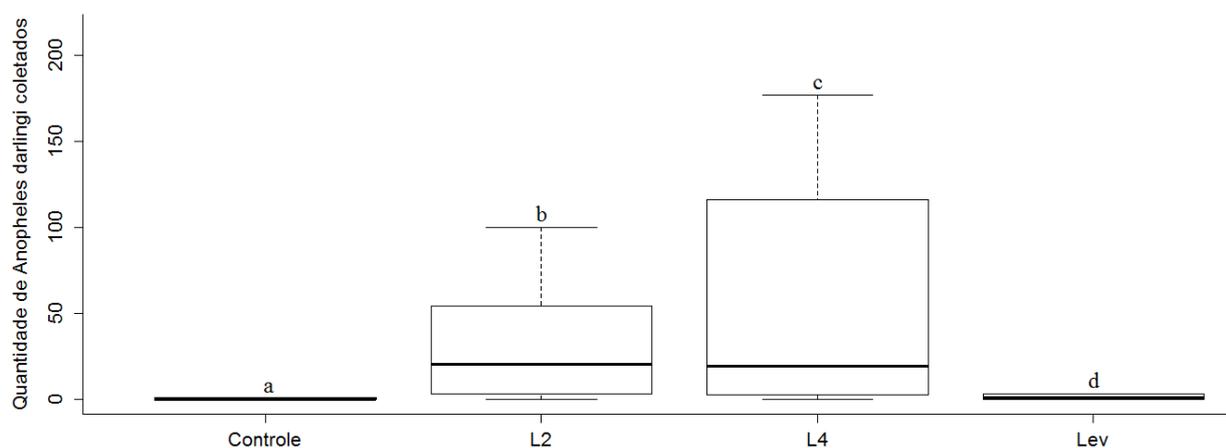


Figura 33. Boxplot de *Anopheles darlingi* coletado em Candeias do Jamari e Porto Velho – RO. Colunas seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0.05$ ). Controle = sem adição de CO<sub>2</sub>; L2 = 70 220mL/min; L4= 450 mL/min; Lev = 70 mL/min

## 5.5 Comparação do novo protótipo da armadilha BG-Malária com a coleta por atração em humanos

5.5.1 Comparação da taxa de captura de *An. darlingi* em armadilhas BG-Malária com a coleta por atração em humanos.

Após os testes para definir o novo coletor, a taxa de liberação de CO<sub>2</sub> e a fonte de liberação (i.e levedura ou gelo seco), a armadilha BG-Malária foi comparada a coleta por atração em humanos. Foram coletados o total de 5213 Anofelinos, dos quais 5118 (98%) foram identificados como *An. darlingi* (Tabela 9).

Tabela 9. Quantidade de anofelinos coletados em Candeias do Jamari (RO)

	Espécies coletadas			Total
	<i>Anopheles darlingi</i>	<i>Anopheles konderi</i>	<i>Anopheles</i> sp	
BG-Malária	1671	1	28	1700
Coleta por atração em Humanos	3447	4	62	3513
Total	5118	5	90	5213

Ao comparar o número de mosquitos coletados em armadilhas BG-Malária e na Atração humana, incorporando a variável horária a análise, foi verificada diferença significativa entre as metodologias (ANOVA; d.f=61,  $\chi^2=16.88$ ,  $p<0.01$ ). O número de mosquitos coletados na Atração humana foi duas vezes maior do que o coletado com armadilhas BG-Malária. Posteriormente, a análise de contraste indicou que o número de mosquitos capturados difere significativamente entre os horários (ANOVA d.f=61,  $\chi^2=6.41$ ,  $p=0.01$ ) sendo que o maior número de mosquitos é coletado no horário de 21:00 a 22:00 h e o menor número no horário de 18:00 a 19:00 h (Figura 34). Não foi verificada diferença na quantidade de mosquitos coletados entre as metodologias apenas no horário de 20:00 a 21:00 (ANOVA d.f=9,  $\chi^2=0.04$ ,  $p=0.83$ ).

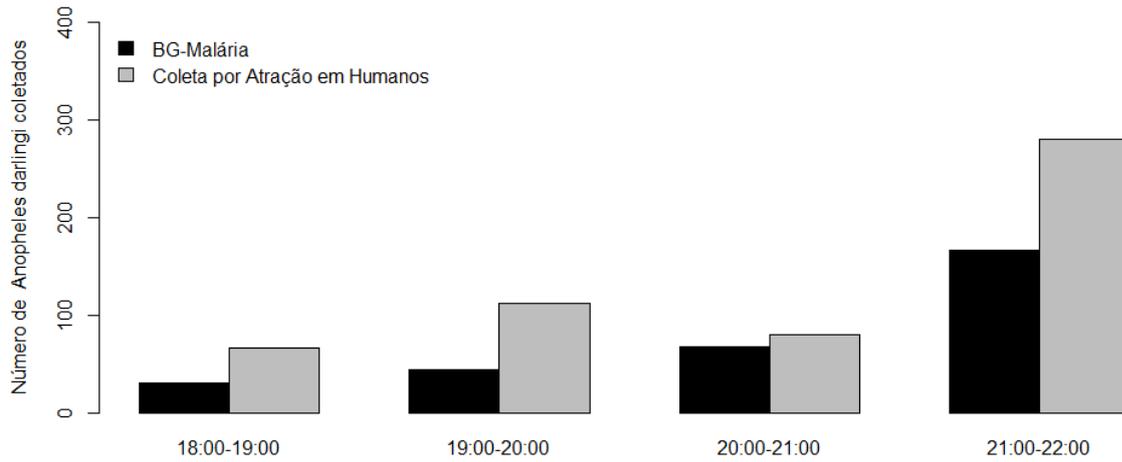


Figura 34. *Anopheles darlingi* coletados nos diferentes horários em Candeias do Jamari RO em Julho de 2012 e Março de 2013 utilizando armadilhas BG-Malária e coleta por atração em humanos.

A quantidade de mosquitos coletados em cada metodologia está correlacionada positivamente com a densidade de mosquitos ( $r=0.86$ ,  $d.f=64$   $p<0.01$ ; Figura 34), ou seja tanto as armadilhas BG-Malária quanto a coleta por atração em humanos são mais eficientes quando há maior número de mosquitos em campo.

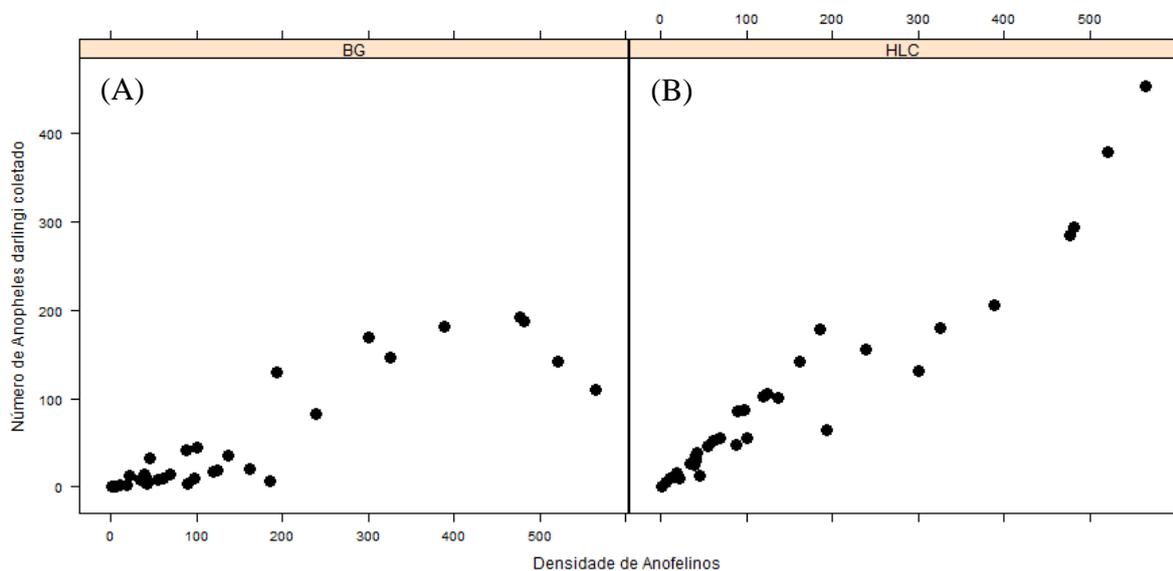


Figura 35. Correlação entre a densidade de anofelinos na área e a quantidade de *Anopheles darlingi* coletada utilizando armadilhas BG-Malária (A) e Atração humana (B) em Candeias do Jamari-RO em Julho de 2012 e Março de 2013. Nota. A quantidade de anofelinos na área foi considerada a soma de mosquitos coletadas nas duas diferentes metodologias.

## 6 DISCUSSÃO

O trabalho foi realizado em três diferentes localidades que apresentam fauna anofélica diversificada. A fauna de Belém (PA) é composta basicamente por espécies zoofílicas (e.g *An. evansae*, *An. argyritarsis*, *An. triannulatus* e *An. intermedius*) das quais *An. triannulatus* foi a espécie coletada em maior abundância, enquanto que nas localidades de Porto Velho (RO) foi composta predominantemente por *An. darlingi*, espécie que apresenta elevado grau de antropofilia, cuja a predominância dessa espécie na região já havia sido relatada (Herman et al. 2007, Cruz et al. 2009 e Katsuragawa et al. 2010).

Das espécies coletadas *An. darlingi* e *An. aquasalis* são considerados os principais vetores da doença na região Amazônica e áreas costeiras, respectivamente (Tadei & Dutary Thatcher 2000, Póvoa et al. 2003, Hiwat & Bretas 2011). Espécies como *An. triannulatus* e *An. nuneztovari* já foram encontradas infectadas naturalmente com *P. vivax*, *P. falciparum* ou infecção mista, entretanto, no Brasil são considerados vetores secundários da doença (Tadei & Dutary Thatcher 2000, Martins-Campos et al. 2012, Duarte et al. 2013).

Nos últimos anos, pouco sucesso foi obtido no desenvolvimento de armadilhas eficientes para a coleta de vetores da malária (Govella et al. 2009, Okumu, Killeen, et al. 2010, Okumu, MadumLa, et al. 2010, Raghavendra et al. 2011). No Brasil, a modificação da armadilha BG-Sentinel (Kröckel et al. 2006) para a coleta de anofelinos, em especial de *An. darlingi*, demonstrou grande potencial produzindo coletas semelhantes às obtidas com a isca humana (Gama et al. 2013). Entretanto, novas adaptações, principalmente quanto ao coletor utilizado e a taxa de liberação de gás carbônico se tornaram necessárias, para que a mesma possa ser potencialmente incorporada em programas de monitoramento de adultos de *An. darlingi*. No presente trabalho, as avaliações preliminares dos quatro diferentes protótipos de tubos coletores (Padrão, Sem funil, Rígido longo e Rígido curto) foram realizadas em Belém e os resultados indicaram que a escolha de um determinado protótipo não altera a taxa de

anofelinos capturados, embora o menor número de insetos tenha sido coletado utilizando o protótipo Sem funil. Esse último coletor apresentou problemas quanto à retenção dos insetos capturados em seu manuseio para a retirada da armadilha. Embora não tenha sido observada diferença na quantidade de insetos coletados, foi observada diferença na integridade dos anofelinos coletados nos diferentes coletores (i.e., mosquitos sem as pernas posteriores).

Nos experimentos realizados em Belém, o protótipo Padrão apresentou a maior proporção de anofelinos danificados (aproximadamente 40%), sugerindo que este não é o coletor mais adequado para armadilhas BG-Malária, possivelmente devido a sua composição muito flexível e a sua constituição de nylon. Nos protótipos Rígido longo e Rígido curto o número de anofelinos danificados foi de aproximadamente 10%, indicando haver diminuição significativa na proporção de mosquitos danificados. Embora os protótipos tenham sido desenvolvidos em acrílico, o mesmo pode ser substituído por qualquer outro material que não apresente custo elevado. No presente trabalho, o acrílico foi utilizado por permitir uma visualização dos mosquitos coletados devido a sua transparência, embora essa variável não afete a quantidade de mosquitos coletados e ou danificados, mas apenas para facilitar a visualização no interior do coletor.

Em Porto Velho, o protótipo Sem Funil não foi avaliado, devido às dificuldades encontradas no uso de coletor nos experimentos realizados em Belém. O resultado obtido utilizando os demais protótipos foi similar ao experimento anterior, onde a maior proporção de anofelinos coletados foi observada no coletor Padrão (aproximadamente 40%), enquanto que a menor proporção de insetos danificados foi observada nos coletores Rígido curto e Rígido longo (aproximadamente 10%). Entretanto o protótipo Rígido longo foi o mais indicado para utilização na armadilha, uma vez que foi observado que, independente do protótipo utilizado, o número de mosquitos coletados influencia significativamente o número de mosquitos danificados. Assim, as dimensões do protótipo Rígido longo podem auxiliar na redução do

dano, uma vez que, esse protótipo apresenta um maior espaço para a retenção dos anofelinos coletados.

Diversos trabalhos objetivando a substituição da coleta por atração em humanos na captura de anofelinos no continente Africano, utilizando armadilhas como CDC (Mathenge et al. 2004, 2005), Ifakara (Okumu, MadumLa, et al. 2010), MMX (Schmied et al. 2008), “*Window exit trap*” (Govella et al. 2011) ou mesmo a BG-Sentinel (Schmied et al. 2008, Hiwat et al. 2011a) foram desenvolvidos, porém nenhum deles avaliou a quantidade de insetos danificados. Embora a informação sobre a proporção de mosquitos danificados nos diferentes modelos de armadilhas seja incomum, este parâmetro é essencial, pois esses insetos são extremamente delicados, e a perda de caracteres morfológicos pode tornar impossível a sua identificação. Para anofelinos este é um problema crítico, uma vez que, a identificação deste grupo é feita com base nas características morfológicas das pernas posteriores, as quais são facilmente perdidas.

Os resultados das observações de comportamento em laboratório sobre as partes dos anofelinos danificados no interior da armadilha BG-Malária corroboraram os dados de campo, em que os protótipos Rígido curto e Rígido longo apresentaram a menor proporção de insetos danificados. Além disso, nas observações de laboratório foi possível observar que o dano nos mosquitos capturados está relacionado com o tempo que permanecem nos tubos coletores. Uma vez que a coleta de *An. darlingi* ocorre principalmente nas quatro primeiras horas da escotofase (Tadei & Dutary Thatcher 2000), demonstramos nos experimentos de laboratório que no final de seis horas a quantidade de insetos danificados no coletor Rígido longo não havia atingido 10%, quantidade três vezes menor a observada no coletor padrão.

Os parâmetros acima mencionados ainda não haviam sido observados para outras armadilhas. Assim, pode-se inferir que os tubos coletores rígidos e com maior espaço,

permitam que a armadilha BG-Malária possa ser utilizada como uma importante ferramenta para o monitoramento de insetos sem que haja um grande número de insetos danificados.

A maioria das ferramentas de amostragem de insetos hematófagos utiliza o CO<sub>2</sub> como estímulo atrativo. Em geral, a adição desse caimônio em armadilhas na taxa de aproximadamente 500 mL/min, aumenta significativamente a captura de espécies de mosquitos antropofílicas (Kline et al. 1991, Mboera LEG et al. 2000, Dekker et al. 2005, Hiwat et al. 2011a). O CO<sub>2</sub> também reduz o limiar de resposta na percepção de outros odores emanados pela pele (e.g ácido láctico e amônia) que são comumente utilizados avaliados em armadilhas (Russell 2004, Xue et al. 2008, Okumu et al. 2010a, Matowo et al. 2013).

Originalmente as armadilhas BG-Malária utiliza liberador (R1) à base de gelo seco liberando cerca de 25g/h de CO<sub>2</sub> como atrativo (Gama et al. 2013). Essa taxa é inferior à liberada por hora na respiração humana, a qual é de aproximadamente 41 g/h (Biogents, 2013). Os primeiros experimentos visando à substituição dessa taxa apresentaram resultados contraditórios, uma vez que, em campo foi observado uma maior média de captura de *An. darlingi* no protótipo R4. Entretanto, em condições de laboratório, a taxa de CO<sub>2</sub> liberada pelo liberador R4 não ultrapassou 23 g/h, quantidade inferior à encontrada tanto na respiração humana quanto a obtida com o liberador R1. Além disso, a diferença de CO<sub>2</sub> liberada entre R1 e R4 não chega a 10% o que em teoria não seria o suficiente para explicar uma diferença de captura acima 95%, utilizada como base de testes estatísticos para indicar diferença significativa. Dessa forma, o desenvolvimento de novos liberadores foi necessário.

Os novos protótipos produzidos em garrafa de metal (i.e L2, L3 e L4) apresentaram taxa de liberação de gás carbônico estáveis. Por exemplo, mesmo após seis horas em campo, a taxa de CO<sub>2</sub> liberada por L4 ainda era cerca de duas vezes maior do que a observada no liberador padrão da BG-Malária. Para esses liberadores foi possível verificar que a quantidade de CO<sub>2</sub>

liberada pode ser controlada de acordo com o diâmetro de abertura da mangueira utilizada, fato que não foi observado nos liberadores R.

Em campo, observou-se que espécies zoófilas (ex: *An. triannulatus*) foram coletadas em maior frequência em liberadores L4, enquanto que espécies antropófilas (ex: *An. darlingi*) tiveram preferência por liberadores do tipo L2. Assim, a taxa de captura de *An. darlingi* não aumentou significativamente com o aumento da quantidade de CO<sub>2</sub> liberada, sendo que a maior quantidade desse mosquito foi capturada em uma taxa de aproximadamente 40 g/h (L2), a qual equivale a 200 – 220 mL/min, ou seja similar a encontrada na respiração humana (Dekker & Takken 1998, Takken & Knols 1999). Fato semelhante já havia sido descrito na literatura, por exemplo, a captura de *An. quadriannulatus*, espécie considerada zoofílica, é maior em armadilhas iscadas com taxa de liberação de CO<sub>2</sub> elevadas (i.e 600 mL/min ou 120g/h) (Dekker et al. 1998). Já espécies do complexo *An. gambiae*, apesar do elevado grau de antropofilia não necessitam de grandes quantidades de CO<sub>2</sub> para a localização do hospedeiro (i.e 135 mL/min ou 30g/h) (Mboera LEG et al. 2000, Okumu et al. 2010a).

Outro fator que poderia justificar a maior quantidade de *An. darlingi* em armadilhas com a menor quantidade de CO<sub>2</sub> seria a seletividade a sítios de picadas. A literatura relata que os diferentes odores emanados pelos hospedeiros podem guiar os mosquitos a diferentes locais do corpo para que possam realizar o repasto sanguíneo (Dekker et al. 1998). Por exemplo, *Anopheles atroporvus*, preferem picar a região próxima ao nariz, já *An. gambiae* s.s. exibe preferência por regiões próximas aos pés (De Jong & Knols 1995). Indicando que em *An. atroporvus* o CO<sub>2</sub> é o principal odor percebido para o repasto sanguíneo enquanto que em *An. gambiae* s.s. outros odores (e.g ácidos graxos) seriam mais importantes do que o CO<sub>2</sub>. Dessa forma, como *An. darlingi* apresenta preferência por picar a região dos pés é possível que outros odores sejam mais importantes do que o CO<sub>2</sub> para a localização do hospedeiro.

Armadilhas como a MM-X, a MLB utilizam o CO<sub>2</sub> proveniente de cilindros acoplados a mangueira de silicone de 7 mm de espessura e fluxômetro para manter a taxa de liberação em 500 mL/min (Kline et al. 1991, Mboera LEG et al. 2000, Hiwat & Bretas 2011, Verhulst et al. 2011a). O uso do cilindro encarece a adoção de armadilhas em sistemas de monitoramento e dificulta a logística de campo devido à dificuldade de transporte. Portanto, a utilização de liberadores confeccionados de garrafa de isopor/metal dispensa o uso de fluxômetro e o fluxo de gás carbônico liberado pode ser controlado pela espessura da mangueira utilizada, sendo possível manter a armadilha funcionando por até seis horas utilizando apenas 300 gramas de gelo seco. Embora a utilização de gelo seco diminua os custos da utilização da armadilha, essa metodologia apresenta grandes problemas logísticos, principalmente no que diz respeito à dificuldade de aquisição do material em áreas remotas onde a malária é endêmica, mesmo que não tenha o custo elevado.

Uma possível alternativa ao uso de gelo seco seria a utilização de *S. cerevisiae* para a produção de CO<sub>2</sub> a partir do processo de fermentação do açúcar (Guerenstein et al. 1995, Lorenzo et al. 1998, 1999, Pires et al. 2000, Saitoh et al. 2004, Smallegange et al. 2010). Verhulst et al. (2010) utilizando bactérias fermentadoras para a produção de CO<sub>2</sub> obtiveram taxa de liberação de aproximadamente 135mL/min e relataram não haver diferença significativa na de captura de *An. gambiae* s.s quando compararam essa taxa a de 500mL/min. Resultado similar foi obtido para outras espécies de culicídeos, como por exemplo, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* e *Ochlerotatus japonicus* (Saitoh et al. 2004). Essa metodologia já havia sido testada com outros insetos hematófagos, como por exemplo, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrogylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (Guerenstein et al. 1995, Lorenzo et al. 1998, 1999, Pires et al. 2000, Pimenta et al. 2007), apresentando ser uma eficiente alternativa as metodologias convencionas de obtenção de CO<sub>2</sub>. O que motivou o seu teste no uso para a coleta de *An. darlingi*.

No presente trabalho, a maior taxa de liberação de CO<sub>2</sub> encontrada foi de 68.98mL/min e ocorreu utilizando 500g de açúcar e 20 g de levedura. Essa taxa é cerca de cinco vezes menor do que a obtida por Smallegange et al. (2010), onde os autores relatam ser possível obter taxas de até 300mL/min utilizando 35 g de *S. cerevisiae* (Marca Dr. Oeteker) e 500g de açúcar. Entretanto, Saitoh et al. (2004) utilizando 18 g de *S. cerevisiae* e 250g de açúcar obtiveram taxa de liberação de CO<sub>2</sub> de 40 mL/min. Essas diferenças ocorrem provavelmente devido de se tratar de um processo biológico (i.e fermentação) realizada em locais diferentes, com cepas diferentes de leveduras, sob diferentes temperaturas. Por exemplo, a variação de temperatura no trabalho de Saitoh et al. (2004) foi de 25 a 27°C e no de Smallegange et al. (2010) de 22 a 25°C, enquanto que no presente trabalho essa variação foi de 25 – 41°C.

O número de *An. darlingi* coletado em armadilhas utilizando CO<sub>2</sub> a aproximadamente 200 mL/min (L2 – gelo seco) foi cerca de oito vezes maior do que o obtido em armadilhas que utilizavam aproximadamente 70mL/min (Y2a – levedura). Esses resultados diferem dos encontrados por Smallegange et al. (2010) no qual a quantidade de *An. arabiensis* coletada não diferiu entre armadilhas iscadas com CO<sub>2</sub> industrial e com *S. cerevisiae*. Entretanto, os resultados aqui presentes, são similares aos obtidos por Oli et al. (2005) e Jawara et al. (2009) onde os autores relatam que armadilhas iscadas com gelo seco capturam significativamente mais mosquitos, embora nesses trabalhos não tenham sido coletados anofelinos.

Devido à sensibilidade dos receptores neuro-olfativos os mosquitos são capazes de perceber pequenas variações de CO<sub>2</sub> no ambiente. Assim a taxa de liberação obtida com leveduras poderia ser suficiente para ativar o comportamento de busca do hospedeiro sendo necessária a adição de outros compostos para tornar a armadilha mais eficiente (Dekker et al. 1998, 2001, Smallegange et al. 2010). Outro importante fator é que *S. cerevisiae*, bactéria utilizada no processo de fermentação, pode produzir etanol caso haja quantidade suficiente de açúcar disponível (van Dijken et al. 1993). Rajkumar and Jebanesan (2007) demonstraram que

o etanol é capaz de exercer atividade repelente em *An. stephensi*. Nesse caso, é possível que a produção de etanol tenha influenciado negativamente a captura de *An. darlingi*. Entretanto novos estudos são necessários para essa averiguação, bem como para o teste de novas formulações de atraentes a base de levedura para a BG-Malária.

O novo protótipo da armadilha BG-Malária que obteve melhores respostas na coleta de *An. darlingi* (coletor rígido RL e o liberador de CO<sub>2</sub> L2 = garrafa de metal + garrafa de isopor + mangueira de 2mm de diâmetro) foi comparado a Atração humana. Os resultados demonstraram que o número de anofelinos coletados na Atração humana foi significativamente superior ao encontrado em armadilhas BG-Malária.

Gama et al. (2013) realizando o trabalho que deu origem a primeira versão da armadilha BG-Malária relataram não haver diferença significativa com Atração humana, entretanto, os autores realizaram apenas duas coletas e, portanto os resultados obtidos devem ser utilizados apenas como indicador. Além disso, uma série de fatores pode ser atribuída a essa diferença: (i) diferença na habilidade dos capturadores – no trabalho de Gama et al. (2013) a média de anofelinos coletado por hora através da Atração humana foi de 42.7 enquanto que em nosso trabalho essa média foi de 134.75, ou seja, três vezes maior; (ii) sazonalidade dos mosquitos – as coletas de anofelinos foram realizadas nos meses de abril a junho, meses de elevada densidade populacional de mosquito em campo (Gil et al. 2007, Katsuragawa et al. 2010) o que aumenta a sensibilidade da Atração humana, já Gama et al. (2013) realizaram as coletas em junho e julho meses em que há uma queda de anofelinos em campo; (iii) área de realização do trabalho – embora ambos os trabalhos tenham sido realizados em Rondônia, um dos trabalhos foi realizado em área rural (Gama et al. 2013), enquanto que o outro foi realizado em área urbana. Há ainda uma série de outras variáveis que não são controladas em trabalhos de campo, como por exemplo, temperatura, umidade, velocidade e direção do vento. O que faz com que resultados contraditórios utilizando metodologias similares sejam comuns na

literatura. Por exemplo, Mathenge et al. (2004) relataram que armadilhas luminosas do tipo CDC coletaram duas vezes mais *An. gambiae* do que a Atração humana, enquanto que Mathenge et al. (2005) relataram que armadilhas do tipo CDC apresentaram apenas 56% da eficiência encontrada para Atração humana na coleta de *An. arabiensis*. Ainda, é possível que uma mesma armadilha seja mais eficiente do que a Atração humana em altas densidades populacionais dos vetores e menos eficiente quando estes apresentam população baixa no campo (Hii et al. 2000). Isso pode ocorrer, pois, em elevadas densidades populacionais os indivíduos tendem a ser menos seletivo, facilitando a sua captura em armadilhas. Nesse caso, dois importantes conceitos ecológicos podem estar influenciando esse comportamento, o modelo ecológico, e/ou a seleção de habitats alimentares.

O modelo densidade dependente para a seleção de fonte alimentar foi mostrado para outros grupos de insetos (e.g Siphonaptera). Krasnov et al. (2007) trabalhando com *Xenopsylla conformis* e *Xenopsylla ramesis* testaram a hipótese de que o sucesso de alimentação das pulgas diminui com o aumento populacional. Nesse caso, os autores relataram que a quantidade de fêmeas ingurgitadas e a quantidade de sangue ingerida por cada fêmea dependem do número de pulgas presente no hospedeiro. Assim em hospedeiros com maior número de pulgas o sucesso alimentar de *X. conformis* é menor.

O comportamento de um ser vivo é direcionado para a maximização de seu tempo de vida e sucesso reprodutivo. Um dos mecanismos que aperfeiçoa o sucesso reprodutivo é a seleção de habitats que garantem um maior fitness. Assim a teoria da seleção de habitats se baseia em mecanismo de distribuição ideal que prediz uma interação negativa entre fitness e densidade populacional, conseqüentemente essa relação refletirá a abundância dos indivíduos nos habitats (Kelly & Thompson 2000, Krasnov et al. 2003, 2007). Fato que, no caso dos insetos hematófagos, pode ser extrapolado para a seleção de hospedeiros, uma vez que nichos estão relacionados à disponibilidade de recursos (e.g alimentos) para os indivíduos.

Embora a armadilhas BG-Malária e a Atração humana tenham apresentado diferença na quantidade de indivíduos coletados, ambas apresentaram resultados similar quanto ao pico de captura, sendo que ambos ocorrem no quarto horário da escotofase (21:00 – 22:00). Gama et al. (2013), observaram picos de captura de anofelinos nos dois primeiros horários da escotofase (18:00 – 20:00), sendo que após esse horário os autores relataram haver uma diminuição no número de indivíduos coletados. A literatura relata que a maior atividade hematofágica de *An. darlingi* ocorre nas quatro primeiras horas da escotofase (18:00 – 22:00) sendo dentro desse período comum observar variação no horário em que ocorre o pico de captura (Tadei & Dutary Thatcher 2000, Moutinho et al. 2011).

Finalmente, os resultados apresentados ao longo dos experimentos para o desenvolvimento do segundo protótipo da armadilha BG-Malária podem ser de subsídios para estudos futuros, uma vez que, (i) quando comparada ao primeiro protótipo houve uma redução significativa na quantidade de insetos danificados; (ii) o novo liberador de CO<sub>2</sub> é capaz de liberar quantidade similar de gás carbônico do que a respiração humana. Entretanto, quando comparada a Atração humana a armadilha BG-Malária coletou significativamente menos insetos, indicando a necessidade de trabalhos futuros para o seu completo desenvolvimento e avaliação. Nesse caso, seria interessante a realização de trabalhos com outras populações de *An. darlingi*, como por exemplo, coletas em Manaus. Ainda, seria interessante a comparação da BG-Malária versão 1, BG-Malária versão 2 e Atração humana para verificar se o padrão de reposta encontrado por Gama et al. (2013) e no presente trabalho será o mesmo.

## 7 CONCLUSÕES

Com a metodologia utilizada e nas áreas onde o trabalho foi realizado foi possível concluir que:

- A substituição do coletor da armadilha BG-Malária por coletores rígidos e cilíndricos não afetam a quantidade de mosquitos coletados. Entretanto o uso dos coletores rígidos diminui significativamente o número de anofelinos com as pernas posteriores danificadas. Ainda, a quantidade de anofelinos danificados está relacionada a: (i) densidade de anofelinos coletados e (ii) ao tempo de permanência dos mosquitos no interior da armadilha em funcionamento.
- A captura de *An. darlingi* não aumenta com a quantidade de CO<sub>2</sub>, ou seja essa espécie não resposta dose-dependente ao gás carbônico. Dessa forma, é possível que existe um limiar de CO<sub>2</sub> que ativa o comportamento de busca do repasto sanguíneo e qualquer quantidade acima desse limiar não afetará a quantidade de mosquitos coletados.
- Armadilhas BG-Malária iscadas com gelo seco são mais eficientes do que armadilhas iscadas com *S. cerevisiae* para a captura de *An. darlingi*, sendo que a quantidade de mosquitos coletadas em armadilhas iscadas com gelo seco é de aproximadamente oito vezes maior do que com leveduras.
- Quando comparado com a coleta por atração em humanos à armadilha BG-Malária não se mostrou uma ferramenta eficiente, o número de anofelinos capturados com a armadilha foi duas vezes menor do que o observado com a isca humana, evidenciando a necessidade de estudos futuros para seu completo desenvolvimento.

## REFERÊNCIAS

- Adeogun AO, Olojede JB, Oduola AO, Awolola TS 2012. Village-Scale Evaluation of PermaNet 3.0: an Enhanced Efficacy Combination Long-Lasting Insecticidal Net Against Resistant Populations of *Anopheles gambiae* s.s. *Malar. Chemother. Control Elimin.* 1: 1–9.
- Al-Taiar A, Assabri A, Al-Habori M, Azazy A, Algabri A, Alganadi M, Whitty CJM, Jaffar S 2009. Socioeconomic and environmental factors important for acquiring non-severe malaria in children in Yemen: a case-control study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 72–78.
- Angêlla A, Gil L 2007. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Rondônia, Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA. *Memórias do Inst. ...* 102: 953–958.
- Barrozo RB, Lazzari CR 2004. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chem. Senses* 29: 319–329.
- Berner R a 1990. Atmospheric carbon dioxide levels over phanerozoic time. *Science* 249: 1382–1386.
- Bernier UR, Kline DL, Barnard DR, Schreck CE, Yost RA 2000. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Anal. Chem.* 72: 747–756.
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MHH, White J-SS 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* 24: 127–135.
- Bowen MF 1991. The sensory physiology of host-seeking behavior in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 139–158.
- Braks MAH, Takken W 1999. Incubated human sweat but not fresh sweat attracts the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto. *J. Chem. Ecol.* 25: 663–672.
- Briscoe AD, Chittka L 2001. The evolution of color vision in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 46: 471–510.
- Brown HE, Paladini M, Cook RA, Kline D, Barnard D, Fish D 2008. Effectiveness of mosquito traps in measuring species abundance and composition. *J. Med. Entomol.* 45: 517–521.
- Carlton JM, Sina BJ, Adams JH 2011. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: e1160.
- Carter R, Mendis KN 2002. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 564–594.

- Chaves LF, Harrington LC, Keogh CL, Nguyen AM, Kitron UD 2010. Blood feeding patterns of mosquitoes: random or structured? *Front. Zool.* 7: 3.
- Coetzee M, Craig M, Sueur D le 2000. Distribution of African Malaria Mosquitoes Belonging to the *Anopheles gambiae* Complex. *Parasitol. Today* 16: 74–77.
- Coetzee M, Fontenille D 2004. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 599–605.
- Cork a, Park KC 1996. Identification of electrophysiologically-active compounds for the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, in human sweat extracts. *Med. Vet. Entomol.* 10: 269–276.
- Crawley M 2007. *The R Book*. Willey.
- Cruz RMB, Gil LHS, Almeida e Silva A de, Silva Araújo M da, Katsuragawa TH 2009. Mosquito abundance and behavior in the influence area of the hydroelectric complex on the Madeira River, Western Amazon, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 1174–1176.
- Curran AM, Rabin SI, Prada PA, Furton KG 2005. Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS. *J. Chem. Ecol.* 31: 1607–1619.
- Dekker T, Geier M, Cardé RT 2005. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *J. Exp. Biol.* 208: 2963–2972.
- Dekker T, Takken W 1998. Differential responses of mosquito sibling species *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* to carbon dioxide, a man or a calf. *Med. Vet. Entomol.* 12: 136–140.
- Dekker T, Takken W, Cardé R 2001. Structure of host-odour plumes influences catch of *Anopheles gambiae* ss and *Aedes aegypti* in a dual-choice olfactometer. *Physiol. Entomol.*: 124–134.
- Dekker T, Takken W, Knols BGJ, Bouman E, Laak S, Bever A, Huisman PWT 1998. Selection of biting sites on a human host by *Anopheles gambiae* s.s., *An. arabiensis* and *An. quadriannulatus*. *Entomol. Exp. Appl.* 87: 295–300.
- Dery DB, Brown C, Asante KP, Adams M, Dosoo D, Amenga-Etego S, Wilson M, Chandramohan D, Greenwood B, Owusu-Agyei S 2010. Patterns and seasonality of malaria transmission in the forest-savannah transitional zones of Ghana. *Malar. J.* 9: 314.
- Dijken JP van, Weusthuis R a, Pronk JT 1993. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63: 343–352.
- Dores EFG de C, Carbo L, Abreu ABG de 2003. Serum DDT in malaria vector control sprayers in Mato Grosso State, Brazil. *Cad. Saude Publica* 19: 429–437.
- Duarte AMRC, Pereira DM, Paula MB de, Fernandes A, Urbinatti PR, Ribeiro AF, Mello MSHS, Matos MO, Mucci LF, Fernandes LN, Natal D, Malafrente RS 2013. Natural

- infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil. *Parasit. Vectors* 6: 58.
- Ebenezer A, Okiwelu SN, Agi PI, Noutcha MAE, Awolola TS, Oduola AO 2012. Species composition of the *Anopheles gambiae* complex across eco-vegetational zones in Bayelsa State, Niger Delta region, Nigeria. *J. Vector Borne Dis.* 49: 164–167.
- Eiras GA 2001. Cairomônios e Aprendizagem em Paratísóides. In: Vilela, E.F; Della Lucia T (Ed.), *Feromônio Insetos Biol. química e emprego no manejo pragas*, Holos, p. 2006.
- Eiras AE, Jepson PC 1991. Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. *Bull. Entomol. Res.* 81: 151.
- Faucher C, Forstreuter M, Hilker M, Bruyne M de 2006. Behavioral responses of *Drosophila* to biogenic levels of carbon dioxide depend on life-stage, sex and olfactory context. *J. Exp. Biol.* 209: 2739–2748.
- Fegan GW, Noor AM, Akhwale WS, Cousens S, Snow RW 2007. Effect of expanded insecticide-treated bednet coverage on child survival in rural Kenya: a longitudinal study. *Lancet* 370: 1035–1039.
- Forattini OP 2002. *Culicidologia Médica vol2* (EDUSP, Ed.). São Paulo.
- Forattini OP, Kakitani I, Santos RL, Ueno HM, Kobayashi KM 1999. Role of *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator* as malaria vector in southeastern Brazil (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 715–718.
- Gadelha P 1994. From “forest malaria” to “bromeliad malaria”: a case-study of scientific controversy and malaria control. *Parassitologia* 36: 175–195.
- Gama RA, Silva IM da, Geier M, Eiras AE 2013. Development of the BG-Malaria trap as an alternative to human-landing catches for the capture of *Anopheles darlingi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108: 763–771.
- Geier M, Bosch OJ, Boeckh J 1999. Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Chem. Senses* 24: 647–653.
- Gil LHS, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PEM, Silva LHP da 2007. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II: perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 271–276.
- Gillies MT 2009. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): a review. *Bull. Entomol. Res.* 70: 525.
- Gomes A de C, Forattini O 1987. Composição e atividade de mosquitos Culicidae. Emprego de armadilha CDC no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. saúde ...*

- Gomes A de C, Natal D, Paula MB de, Urbinatti PR, Mucci LF, Bitencourt MD 2007. Riqueza e abundância de Culicidae (Diptera) em área impactada, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saude Publica* 41: 661–664.
- Govella NJ, Chaki PP, Geissbuhler Y, Kannady K, Okumu F, Charlwood JD, Anderson R a, Killeen GF 2009. A new tent trap for sampling exophagic and endophagic members of the *Anopheles gambiae* complex. *Malar. J.* 8: 157.
- Govella NJ, Chaki PP, Mpangile JM, Killeen GF 2011. Monitoring mosquitoes in urban Dar es Salaam: evaluation of resting boxes, window exit traps, CDC light traps, Ifakara tent traps and human landing catches. *Parasit. Vectors* 4: 40.
- Guerenstein PG, Lorenzo MG, Núñez JA, Lazzari CR 1995. Baker's yeast, an attractant for baiting traps for Chagas' disease vectors. *Experientia* 51: 834–837.
- Guimarães AÉ, Gentile C, Alencar J, Lopes CM, Mello RP de 2004. Ecology of Anopheline (Diptera, Culicidae), malaria vectors around the Serra da Mesa Reservoir, State of Goiás, Brazil: 1 - Frequency and climatic factors. *Cad. Saude Publica* 20: 291–302.
- Guimarães A, Mello R 1997. Prevalência de anofelinos (Diptera: Culicidae) no crepúsculo vespertino em áreas da Usina Hidrelétrica de Itaipu, no Município de Guairá, Estado do Paraná. *Memórias do Inst. ...* 92: 745–754.
- Harbach RE 2007. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull. Entomol. Res.* 94: 537–553.
- Healy TP, Copland MJ 1995. Activation of *Anopheles gambiae* mosquitoes by carbon dioxide and human breath. *Med. Vet. Entomol.* 9: 331–336.
- Hii JL, Smith T, Mai A, Ibam E, Alpers MP 2000. Comparison between anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) caught using different methods in a malaria endemic area of Papua New Guinea. *Bull. Entomol. Res.* 90: 211–219.
- Hiwat H, Andriessen R, Rijk M De, Koenraadt CJM, Takken W 2011a. Carbon dioxide baited trap catches do not correlate with human landing collections of *Anopheles aquasalis* in Suriname. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106: 360–364.
- Hiwat H, Bretas G 2011. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasit. Vectors* 4: 177.
- Hiwat H, Rijk M De, Andriessen R, Koenraadt CJM, Takken W 2011b. Evaluation of Methods for Sampling the Malaria Vector *Anopheles darlingi* (Diptera, Culicidae) in Suriname and the Relation With Its Biting Behavior. *J. Med. Entomol.* 48: 1039–1046.
- Jawara M, Smallegange RC, Jeffries D, Nwakanma DC, Awolola TS, Knols BGJ, Takken W, Conway DJ 2009. Optimizing odor-baited trap methods for collecting mosquitoes during the malaria season in The Gambia. *PLoS One* 4: e8167.
- Johnson SN, Gregory PJ 2006. Chemically-mediated host-plant location and selection by root-feeding insects. *Physiol. Entomol.* 31: 1–13.

- Jones WD, Cayirlioglu P, Kadow IG, Vosshall LB 2007. Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature* 445: 86–90.
- Jones JW, Turell MJ, Sardelis MR, Watts DM, Coleman RE, Fernandez R, Carbajal F, Pecor JE, Calampa C, Klein T a 2004. Seasonal distribution, biology, and human attraction patterns of culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a forest near Puerto Almendras, Iquitos, Peru. *J. Med. Entomol.* 41: 349–360.
- Jong R De, Knols BG 1995. Selection of biting sites on man by two malaria mosquito species. *Experientia* 51: 80–84.
- Kappe SHI, Kaiser K, Matuschewski K 2003. The Plasmodium sporozoite journey: a rite of passage. *Trends Parasitol.* 19: 135–143.
- Katsuragawa TH, Gil LHS, Tada MS, Almeida e Silva A de, Costa JDN, Araújo MDS, Escobar AL, Silva LHP da 2010. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. *PLoS One* 5: e9245.
- Kayentao K, Kodio M, Newman RD, Maiga H, Doumtabe D, Ongoiba A, Coulibaly D, Keita AS, Maiga B, Mungai M, Parise ME, Doumbo O 2005. Comparison of intermittent preventive treatment with chemoprophylaxis for the prevention of malaria during pregnancy in Mali. *J. Infect. Dis.* 191: 109–116.
- Kelly DW, Thompson CE 2000. Epidemiology and optimal foraging: modelling the ideal free distribution of insect vectors. *Parasitology* 120 ( Pt 3: 319–327.
- Kiszewski A, Mellinger A, Spielman A, Malaney P, Sachs SE, Sachs J 2004. A global index representing the stability of malaria transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70: 486–498.
- Klein TA, Lima JB, Tada MS, Miller R 1991a. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 463–470.
- Klein TA, Lima JB, Tada MS, Miller R 1991b. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 463–470.
- Kleinschmidt I, Schwabe C, Shiva M, Segura JL, Sima V, Mabunda SJA, Coleman M 2009. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 519–524.
- Kline DL, Takken W, Wood JR, Carlson DA 1990. Field studies on the potential of butanone, carbon dioxide, honey extract, 1-octen-3-ol, L-lactic acid and phenols as attractants for mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.* 4: 383–391.
- Kline DL, Wood JR, Cornell JA 1991. Interactive effects of 1-octen-3-ol and carbon dioxide on mosquito (Diptera: Culicidae) surveillance and control. *J. Med. Entomol.* 28: 254–258.

- Klinkenberg E, Hoek W van der, Amerasinghe FP 2004. A malaria risk analysis in an irrigated area in Sri Lanka. *Acta Trop.* 89: 215–225.
- Krasnov BR, Hovhanyan a, Khokhlova IS, Degen a a 2007. Density dependence of feeding success in haematophagous ectoparasites. *Parasitology* 134: 1379–1386.
- Krasnov BR, Khokhlova IS, Shenbrot GI 2003. Density-dependent host selection in ectoparasites: an application of isodar theory to fleas parasitizing rodents. *Oecologia* 134: 365–372.
- Krockel U, Rose A, Eiras AE, Geier M 2006. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22: 229–238.
- Kweka EJ, Mwang'onde BJ, Kimaro E, Msangi S, Massenga CP, Mahande AM 2009. A resting box for outdoor sampling of adult *Anopheles arabiensis* in rice irrigation schemes of lower Moshi, northern Tanzania. *Malar. J.* 8: 82.
- Kweka EJ, Owino EA, Lee M, Dixit A, Himeidan YE, Mahande AM 2013. Efficacy of resting boxes baited with Carbon dioxide versus CDC light trap for sampling mosquito vectors: A comparative study. *Glob. Heal. Perspect.* 01: 11–18.
- Lacroix R, Mukabana WR, Gouagna LC, Koella JC 2005. Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. *PLoS Biol.* 3: e298.
- Laporta GZ, Ramos DG, Ribeiro MC, Sallum MAM 2011. Habitat suitability of *Anopheles* vector species and association with human malaria in the Atlantic Forest in south-eastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106 Suppl : 239–245.
- Lee K-S, Divis PCS, Zakaria SK, Matusop A, Julin R a, Conway DJ, Cox-Singh J, Singh B 2011. *Plasmodium knowlesi*: reservoir hosts and tracking the emergence in humans and macaques. *PLoS Pathog.* 7: e1002015.
- Li C, Wilkerson RC 2005. Identification of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100: 495–500.
- Lindén A, Mäntyniemi S 2011. Using the negative binomial distribution to model overdispersion in ecological count data. *Ecology* 92: 1414–1421.
- Lorenzo MG, Manrique G, Pires HH, Brito Sánchez MG de, Diotaiuti L, Lazzari CR 1999. Yeast culture volatiles as attractants for *Rhodnius prolixus*: electroantennogram responses and captures in yeast-baited traps. *Acta Trop.* 72: 119–124.
- Lorenzo MG, Reisenman CE, Lazzari CR 1998. *Triatoma infestans* can be captured under natural climatic conditions using yeast-baited traps. *Acta Trop.* 70: 277–284.
- Lüthi D, Floch M Le, Bereiter B, Blunier T, Barnola J-M, Siegenthaler U, Raynaud D, Jouzel J, Fischer H, Kawamura K, Stocker TF 2008. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature* 453: 379–382.

- malERA 2011. A research agenda for malaria eradication: vector control. *PLoS Med.* 8: e1000401.
- Malik GM, Seidi O, El-Taher A, Mohammed AS 2000. Clinical aspects of malaria in the Asir Region, Saudi Arabia. *Ann. Saudi Med.* 18: 15–17.
- Marques GRAM, Condino MLF, Serpa LLN, Cursino TVM 2008. [Epidemiological aspects of autochthonous malaria in the Atlantic forest area of the northern coast of the State of São Paulo, 1985-2006]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41: 386–389.
- Martins-Campos KM, Pinheiro WD, Vitor-Silva S, Siqueira AM, Melo GC, Rodrigues IC, Fé NF, Graças V Barbosa M Das, Tadei WP, Guinovart C, Bassat Q, Alonso PL, Lacerda MV, Monteiro WM 2012. Integrated vector management targeting *Anopheles darlingi* populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon. *Malar. J.* 11: 351.
- Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47: 261–273.
- Mathenge EM, Misiani GO, Oulo DO, Irungu LW, Ndegwa PN, Smith T a, Killeen GF, Knols BGJ 2005. Comparative performance of the Mbita trap, CDC light trap and the human landing catch in the sampling of *Anopheles arabiensis*, *An. funestus* and culicine species in a rice irrigation in western Kenya. *Malar. J.* 4: 7.
- Mathenge EM, Omweri GO, Irungu LW, Ndegwa PN, Walczak E, Smith T a, Killeen GF, Knols BGJ 2004. Comparative field evaluation of the Mbita trap, the Centers for Disease Control light trap, and the human landing catch for sampling of malaria vectors in western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70: 33–37.
- Matowo NS, Moore J, Mapua S, Madumla EP, Moshi IR, Kaindoa EW, Mwangungulu SP, Kavishe DR, Sumaye RD, Lwetoijera DW, Okumu FO 2013. Using a new odour-baited device to explore options for luring and killing outdoor-biting malaria vectors: a report on design and field evaluation of the Mosquito Landing Box. *Parasit. Vectors* 6: 137.
- Mboera LEG, Knols BGJ, Braks MAH, Takken W 2000. Comparison of carbon dioxide-baited trapping systems for sampling outdoor mosquito populations in Tanzania. *Med. Vet. Entomol.* 14: 257–263.
- Mohamed-Ahmed MM, Mihok S 2007. Responses of *Glossina fuscipes fuscipes* (Diptera: Glossinidae) and other Diptera to carbon dioxide in linear and dense forests. *Bull. Entomol. Res.* 89: 177–184.
- Moutinho PR, Gil LHS, Cruz RB, Ribolla PEM 2011. Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. *Malar. J.* 10: 174.
- Mueller I, Zimmerman P a, Reeder JC 2007. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*--the “bashful” malaria parasites. *Trends Parasitol.* 23: 278–283.

- Mukabana WR, Takken W, Coe R, Knols BGJ 2002. Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 1: 17.
- Murlis J, Elkinton JS, Cardé RT 1992. Odor Plumes and How Insects Use Them. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 505–532.
- Nicolas G, Sillans D 1989. Immediate and Latent Effects of Carbon Dioxide on Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 97–116.
- Njiru BN, Mukabana WR, Takken W, Knols BGJ 2006. Trapping of the malaria vector *Anopheles gambiae* with odour-baited MM-X traps in semi-field conditions in western Kenya. *Malar. J.* 5: 39.
- O’Hara RB, Kotze DJ 2010. Do not log-transform count data. *Methods Ecol. Evol.* 1: 118–122.
- Okumu FO, Killeen GF, Ogoma S, Biswaro L, Smallegange RC, Mbeyela E, Titus E, Munk C, Ngonyani H, Takken W, Mshinda H, Mukabana WR, Moore SJ 2010a. Development and field evaluation of a synthetic mosquito lure that is more attractive than humans. *PLoS One* 5: e8951.
- Okumu FO, Madumla EP, John AN, Lwetoijera DW, Sumaye RD 2010b. Attracting, trapping and killing disease-transmitting mosquitoes using odor-baited stations - The Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasit. Vectors* 3: 12.
- Oli K, Jeffery J, Vythilingam I 2005. A comparative study of adult mosquito trapping using dry ice and yeast generated carbon dioxide. *Trop. Biomed.* 22: 249–251.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar. J.* 9: 115.
- Overgaard HJ, Saebo S, Reddy MR, Reddy VP, Abaga S, Matias A, Slotman M a 2012. Light traps fail to estimate reliable malaria mosquito biting rates on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar. J.* 11: 56.
- Padonou GG, Sezonlin M, Ossé R, Aizoun N, Oké-Agbo F, Oussou O, Gbédjissi G, Akogbéto M 2012. Impact of three years of large scale Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs) interventions on insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in Benin. *Parasit. Vectors* 5: 72.
- Pates H, Curtis C 2005. Mosquito behavior and vector control. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 53–70.
- Pearson PN, Palmer MR 2000. Atmospheric carbon dioxide concentrations over the past 60 million years. *Nature* 406: 695–699.
- Pimenta FE, Diotaiuti L, Lima ACL, Lorenzo MG 2007. Evaluation of cultures of *Saccharomyces cerevisiae* as baits for *Triatoma dimidiata* and *Triatoma pallidipennis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 229–231.

- Pires HH, Lazzari CR, Diotaiuti L, Lorenzo MG 2000. Performance of yeast-baited traps with *Triatoma sordida*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, and *Panstrongylus megistus* in laboratory assays. *Rev. Panam. Salud Publica* 7: 384–388.
- Póvoa MM, Conn JE, Schlichting CD, Amaral JCOF, Segura MNO, Silva ANM Da, Santos CCB Dos, Lacerda RNL, Souza RTL De, Galiza D, Santa Rosa EP, Wirtz RA 2003. Malaria vectors, epidemiology, and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. *J. Med. Entomol.* 40: 379–386.
- Póvoa MM, Souza RTL de, Lacerda RNDL, Rosa ES, Galiza D, Souza JR de, Wirtz R a, Schlichting CD, Conn JE 2006. The importance of *Anopheles albitarsis* E and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101: 163–168.
- Qiu YT, Smallegange RC, Loon JJ a VAN, Takken W 2011. Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto to components of human breath, sweat and urine depend on mixture composition and concentration. *Med. Vet. Entomol.* 25: 247–255.
- Qiu YT, Smallegange RC, Ter BCJF, Spitzen J, Loon JJA Van, Jawara M, Milligan P, Galimard AM, Beek TA Van, Knols BGJ, Takken W 2007. Attractiveness of MM-X traps baited with human or synthetic odor to mosquitoes (Diptera: Culicidae) in The Gambia. *J. Med. Entomol.* 44: 970–983.
- Raghavendra K, Barik TK, Reddy BPN, Sharma P, Dash AP 2011. Malaria vector control: from past to future. *Parasitol. Res.* 108: 757–779.
- Rajkumar S, Jebanesan A 2007. Repellent activity of selected plant essential oils against the malarial fever mosquito *Anopheles stephensi*. *Trop. Biomed.* 24: 71–75.
- Ramirez JL, Garver LS, Dimopoulos G 2009. Challenges and approaches for mosquito targeted malaria control. *Curr. Mol. Med.* 9: 116–130.
- Ritchie S a, Cortis G, Paton C, Townsend M, Shroyer D, Zborowski P, Hall-Mendelin S, Hurk AF Van Den 2013. A simple non-powered passive trap for the collection of mosquitoes for arbovirus surveillance. *J. Med. Entomol.* 50: 185–194.
- Rubio-Palis Y, Moreno JE, Sánchez V, Estrada Y, Anaya W, Bevilacqua M, Cárdenas L, Martínez A, Medina D 2012. Can Mosquito Magnet® substitute for human-landing catches to sample anopheline populations? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107: 546–549.
- Russell RC 2004. The relative attractiveness of carbon dioxide and octenol in CDC- and EVS-type light traps for sampling the mosquitoes *Aedes aegypti* (L.), *Aedes polynesiensis* Marks, and *Culex quinquefasciatus* say in Moorea, French Polynesia. *J. Vector Ecol.* 29: 309–314.
- Saitoh Y, Hattori J, Chinone S, Nihei N, Tsuda Y, Kurahashi H, Kobayashi M 2004. Yeast-generated CO<sub>2</sub> as a convenient source of carbon dioxide for adult mosquito sampling. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20: 261–264.

- Schmied WH, Takken W, Killeen GF, Knols BGJ, Smallegange RC 2008. Evaluation of two counterflow traps for testing behaviour-mediating compounds for the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. under semi-field conditions in Tanzania. *Malar. J.* 7: 230.
- Sharma SK, Tyagi PK, Padhan K, Upadhyay AK, Haque MA, Nanda N, Joshi H, Biswas S, Adak T, Das BS, Chauhan VS, Chitnis CE, Subbarao SK 2006. Epidemiology of malaria transmission in forest and plain ecotype villages in Sundargarh District, Orissa, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100: 917–925.
- Sikaala CH, Killeen GF, Chanda J, Chinula D, Miller JM, Russell TL, Seyoum A 2013. Evaluation of alternative mosquito sampling methods for malaria vectors in Lowland South - East Zambia. *Parasit. Vectors* 6: 91.
- Silva KS da, Pinto I de S, Leite GR, Virgens TM das, Santos CB dos, Falqueto A 2013. Ecology of Anopheline Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Central Atlantic Forest Biodiversity Corridor, Southeastern Brazil. *J. Med. Entomol.* 50: 24–30.
- Sinclair D, Zani B, Donegan S, Olliaro P, Garner P 2009. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. *Cochrane database Syst. Rev.*: CD007483.
- Singh B, Sung L, Matusop A 2004. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet* 363: 1017–1024.
- Sithiprasasna R, Jaichapor B, Chanaimongkol S, Khongtak P, Lealsirivattanakul T, Tiang-Trong S, Burkett DA, Perich MJ, Wirtz RA, Coleman RE 2004. Evaluation of candidate traps as tools for conducting surveillance for *Anopheles* mosquitoes in a malaria-endemic area in western Thailand. *J. Med. Entomol.* 41: 151–157.
- Smallegange RC, Gemert G-J van, Vegte-Bolmer M van de, Gezan S, Takken W, Sauerwein RW, Logan JG 2013. Malaria Infected Mosquitoes Express Enhanced Attraction to Human Odor (G Dimopoulos, Ed.). *PLoS One* 8: e63602.
- Smallegange RC, Qiu YT, Bukovinszkiné-Kiss G, Loon JJA Van, Takken W 2009. The effect of aliphatic carboxylic acids on olfaction-based host-seeking of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto. *J. Chem. Ecol.* 35: 933–943.
- Smallegange RC, Qiu YT, Loon JJA van, Takken W 2005. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). *Chem. Senses* 30: 145–152.
- Smallegange RC, Schmied WH, Roey KJ van, Verhulst NO, Spitzen J, Mukabana WR, Takken W 2010. Sugar-fermenting yeast as an organic source of carbon dioxide to attract the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 9: 292.
- Sum KS, Vulule JM, Ouma C, Mulaya N, Jura WGZO 2012. Dose-Effects of Bednets Impregnated with a Natural Pyrethrins Formulation: Persistence, Feeding Inhibition, and Wash Resistance against *Anopheles gambiae* s.s. *Malar. Chemother. Control Elimin.* 1: 1–9.

- Sutcliffe JF 1986. Black fly host location: a review. *Can. J. Zool.* 64: 1041–1053.
- Tadei WP, Dutary Thatcher B 2000. Malaria vectors in the Brazilian amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 42: 87–94.
- Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 325–335.
- Takken W, Knols BG 1999. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 131–157.
- Talman AM, Duval L, Legrand E, Hubert V, Yen S, Bell D, Bras J Le, Arie F, Houze S 2007. Evaluation of the intra- and inter-specific genetic variability of Plasmodium lactate dehydrogenase. *Malar. J.* 6: 140.
- Thom C, Guerenstein PG, Mechaber WL, Hildebrand JG 2004. Floral CO<sub>2</sub> reveals flower profitability to moths. *J. Chem. Ecol.* 30: 1285–1288.
- Tuteja R 2007. Malaria - an overview. *FEBS J.* 274: 4670–4679.
- Vale GA 2009. Field studies of the responses of tsetse flies (Glossinidae) and other Diptera to carbon dioxide, acetone and other chemicals. *Bull. Entomol. Res.* 70: 563.
- Verhulst NO, Andriessen R, Groenhagen U, Bukovinszkiné Kiss G, Schulz S, Takken W, Loon JJ a van, Schraa G, Smallegange RC 2010. Differential attraction of malaria mosquitoes to volatile blends produced by human skin bacteria. *PLoS One* 5: e15829.
- Verhulst NO, Mbadi P a, Kiss GB, Mukabana WR, Loon JJ a van, Takken W, Smallegange RC 2011a. Improvement of a synthetic lure for Anopheles gambiae using compounds produced by human skin microbiota. *Malar. J.* 10: 28.
- Verhulst NO, Qiu YT, Beijleveld H, Maliepaard C, Knights D, Schulz S, Berg-Lyons D, Lauber CL, Verduijn W, Haasnoot GW, Mumm R, Bouwmeester HJ, Claas FHJ, Dicke M, Loon JJ a van, Takken W, Knight R, Smallegange RC 2011b. Composition of human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. *PLoS One* 6: e28991.
- Warnes ML, Finlayson LH 2009. Responses of the stable fly, Stomoxys calcitrans (L.) (Diptera: Muscidae), to carbon dioxide and host odours. II. Orientation. *Bull. Entomol. Res.* 75: 717.
- Warton DI, Hui FKC 2011. The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology* 92: 3–10.
- WHO 2010. *Second edition*. Geneva.
- WHO 2012. *World Malaria Report 2012*. Wo.
- Wilkerson RC, Parsons TJ, Klein TA, Gaffigan T V, Bergo E, Consolim J 1995. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species

related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. *J. Med. Entomol.* 32: 697–704.

William T, Rahman H a, Jelip J, Ibrahim MY, Menon J, Grigg MJ, Yeo TW, Anstey NM, Barber BE 2013. Increasing Incidence of *Plasmodium knowlesi* Malaria following Control of *P. falciparum* and *P. vivax* Malaria in Sabah, Malaysia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2026.

Xue R-D, Doyle MA, Kline DL 2008. Field evaluation of CDC and Mosquito Magnet X traps baited with dry ice, CO<sub>2</sub> sachet, and octenol against mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24: 249–252.