

**ECOLOGIA QUÍMICA DE FLEBOTOMÍNEOS
(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE):
DESENVOLVIMENTO DE UMA ARMADILHA E ANÁLISE DOS
HIDROCARBONETOS CUTICULARES DAS ESPÉCIES**



ANDREY JOSÉ DE ANDRADE

BELO HORIZONTE

2010

Andrey José de Andrade

**ECOLOGIA QUÍMICA DE FLEBOTOMÍNEOS
(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE):
DESENVOLVIMENTO DE UMA ARMADILHA E ANÁLISE DOS
HIDROCARBONETOS CUTICULARES DAS ESPÉCIES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Álvaro E. Eiras (ICB/UFMG)

Co-orientadora: Elizabeth F. Rangel (IOC/Fiocruz)

**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**

2010

043

Andrade, Andrey J. de

Ecologia química de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): desenvolvimento de uma armadilha e análise dos hidrocarbonetos cuticulares das espécies [manuscrito] / Andrey J. de Andrade. – 2010.

167 f.: il.; 29,5 cm.

Orientador: Álvaro Eduardo Eiras. Co-orientadora: Elizabeth Ferreira Rangel.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Flebotomíneos - Teses. 2. *Lutzomyia* - Teses. 3. Ecologia química - Teses. 4. Hidrocarbonetos - Teses. 5. Armadilhas. I. Eiras, Álvaro Eduardo. II. Rangel, Elizabeth Ferreira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89

*Às mulheres da minha vida Dona Conceição (mãe), Andréa e Adriana (irmãs),
aos homens de nossas vidas, Rafael e Miguel (sobrinhos)
e àquele que foi o responsável por tudo isso: meu pai (in memoriam)!*

Saudades...

AGRADECIMENTOS

*“Na longa história da espécie humana
(e do gênero animal, também), prevaleceram os indivíduos que
aprenderam a colaborar e a improvisar com mais eficácia.”
(Charles Darwin)*

Ao meu orientador **Prof. Álvaro Eduardo Eiras (Instituto de Ciências Biológicas/UFMG)**, por mais esses quatro anos de aprendizado e por confiar em meu trabalho. A chance de continuar investigando os flebotomíneos me permitiu ver que havia escolhido o caminho certo para minha vida científica. Assim continuo seguindo-o... sendo grato, sempre, pelas oportunidades.

À minha coorientadora **Prof^ª. Elizabeth Ferreira Rangel (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)** por estar ao meu lado e mesmo sabendo que poderia falhar diversas vezes, nunca usou a palavra “desista”. Continuarei com os flebotomíneos... “sem jamais perder aquela poesia”. Obrigado por acreditar!

Ao mestre e amigo **Prof. Edelberto Santos Dias (Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz)** por nunca ter deixado de me apoiar com idéias, por ter sempre a porta do seu laboratório aberta para as dúvidas mais simples e por me ensinar que ciência deve ser bem feita, independente da escolhas. A técnica **Simone Araújo** por me socorrer com os *L. longipalpis s.l.* da Lapinha, mesmo que ligando um dia antes e a todos do **Laboratório de Leishmanioses (LaLei/CPqRR)**, por me fazer sentir em casa todas as vezes que passava corrido por lá.

À técnica do LaBEQ **Msc. Célia José de Sá Sciavicco (LaBEQ/UFMG)** por todo auxílio com as análises cromatográficas. O que aprendi devo a você e minha gratidão não pode ser expressa em poucas linhas. Desculpa minhas bagunças, minhas desorganizações e minhas inquietações... sentirei falta de nossos papos... espero que tenha sido um “filho bom” para você, o quanto foi uma “boa mãe” para mim!

À **Dra. Luciane Gomes Batista-Pereira (LaBEQ/UFMG)** que entrou no laboratório e “salvou” muita gente com seu conhecimento sobre insetos e ecologia química. Uma mãe zelosa, uma pesquisadora exemplar e uma grande amiga que orgulho de ter feito. Obrigado pelas discussões frente aos muitos cromatogramas e por ter com quem falar, quando possível, sobre os flebotomíneos.

Ao **Prof. Nelder de Figueiredo Gontijo (ICB/UFMG)**, que assim como no mestrado me emprestou várias vezes sua criatividade. Obrigado pelos conselhos, por esclarecer tantas dúvidas e por ter sempre uma palavra amiga, durante um desabafo. A minha amiga **Dra. Vânia Cristina dos Santos** e ao estudante **Cássio Alencar Nunes** por triarem e separarem os *L. longipalpis s.l.* de Teresina, sempre íntegros, utilizados no Capítulo II.

À **Prof^ª. Vanny Perpétua Ferraz (Departamento de Química/UFMG)** pela elucidação das análises de Cromatografia Gasosa. Uma pessoa generosa e muito acessível. Obrigado pela ajuda na interpretação dos dados e ficarei lhe devendo, apenas, a Espectrometria de Massas.

Ao **Prof. Adão Aparecido Sabino (Departamento de Química/ UFMG)** pelo apoio na confecção dos liberadores de feromônios utilizados no Capítulo IV e que, juntamente com a mestrand **Maria Elisa Romanelli Diniz** me estimularam no estudo da técnica de Electrospray de Massas para detecção dos Hidrocarbonetos Cuticulares.

A todos os **amigos do LaBEQ**, que estiveram comigo nesses 4 anos de doutorado. A convivência, os ensinamentos, o trabalho em equipe, tudo isso aprendi como vocês e levarei comigo sempre. Agradeço em especial as secretárias **Débora Polanski (2006-2008)** e **Ana Paula Carrusca (2008-2010)** que usando de disciplina e organização foram fundamentais para que todo esse trabalho acontecesse.

À bióloga **Carolin Marlen Degener (ICB/ UFMG)** pela revisão do inglês no Abstract.

À **Sumara Aparecida Ferreira**, secretária da **Pós-graduação em Parasitologia (ICB/UFMG)** que sem dúvida é o pilar do programa. Continua sendo exemplo de funcionalismo público e uma profissional de primeira categoria. Grato a você, sempre!

Aos **Profs. Pedro Marcos Linardi e Marcos Horácio Pereira**, coordenadores do programa de Pós-graduação em Parasitologia (ICB/UFMG) que estiveram à frente do programa durante esses 4 anos.

A toda **Equipe de Laboratório de Flebotomíneos do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS) – Maria das Graças S. Silva (Dona Graça), Suely Pinheiro, Fábio Márcio M. da Silva e José Aprígio N. Lima**. Nunca fui tão bem acolhido em um lugar como quando estive em Belém. Dentro da cidade encontrei grandes amigos e exemplos de pesquisadores. Obrigado por todo apoio no trabalho... lâminas, lupas, auxílio em campo, pelos papos, pelos açais e, até pelas comidas com coentro. Um dia volto para trabalhar ao lado de vocês e sei que serei bem recebido como sempre fui.

Ao **Dr. Adelson Alcimar Almeida de Souza (in memorian) (IEC/SVS)** por todo apoio logístico ao trabalho de campo de Barcarena e pelas coletas de *L. whitmani* em Paragominas. A ciência sente sua falta, os flebotomíneos ficaram um pouco “órfãos” com sua ausência. Seus ensinamentos ficam e pode ter certeza que levarei um pouco deles comigo.

Ao grande amigo **Iorlando da Rocha Barata**, técnico do IEC. Foi quem em ensinou sobre os flebotomíneos do Pará. Obrigado pela amizade, pela confiança, pelas boas palavras. Para mim fica o exemplo de que para se fazer um bom campo e uma boa pesquisa o conhecimento adquirido vale mais que um diploma.

À **Dr^a. Ivoneide Maria da Silva (Universidade Federal do Pará)** por me receber em Belém, pela paciência no delineamento dos experimentos em Barcarena, pelo exemplo de pesquisadora e, é claro, pela amizade verdadeira. Se eu pudesse teria em minha vida científica 10 pessoas como você: cinco para dizer o que não fazer; 4 para dizer o que fazer e 1 para me acompanhar pelo resto da vida. Obrigado, de coração!

A todos da **Secretaria Municipal de Saúde** e da **FUNASA (Barcarena/PA)** por apoiarem, incondicionalmente, o trabalho no município e por disponibilizarem infraestrutura e recursos humanos adequados para a execução do campo. Ao amigo **Jorge Antonio Gonçalves de Sousa (Secretaria de Saúde do Pará)** pelo auxílio no campo, durante o início dos experimentos que ilustram o Capítulo III.

Ao **Núcleo de Entomologia da 6ª Diretoria Regional de Saúde (6ª DORES)** do município de Ilhéus (Bahia) pelo exemplo que me deram de trabalho em equipe, assistência na instalação e recolhimento das armadilhas, e triagem dos insetos. Foi um mês com vocês, mas o suficiente para executar um trabalho que deveria ser rápido e preciso. À **Dra. Sílvia Maria Santos Carvalho (Universidade Estadual de Santa Cruz/BA)** pelo apoio durante minha estadia nessa bela cidade do nordeste brasileiro.

Ao **Sr. Denilson Rodrigues dos Santos (Laboratório de Entomologia de Maringá, PR)** pela captura e envio de *L. whitmani* de Maringá e Mandaguari.

À **Prefeitura de Chapada Gaúcha**, pelo auxílio nos testes realizados no Capítulo IV e em particular à “**família dos paçocas**” que sempre nos receberam de portas abertas, mesmo quando não estavam em casa.

À **Equipe do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses (IOC/Fiocruz)** por sempre me receberem tão bem enquanto estive no Rio de Janeiro, sempre de forma rápida, chegando 6:00 da manhã e saindo 18:00 da tarde, do mesmo dia.

À **Msc. Simone Miranda da Costa (IOC/Fiocruz)** pelas capturas dos exemplares de *L. whitmani* de Ilhéus (Bahia) e ao **Msc. Cristian Ferreira de Souza (Departamento de Medicina Veterinária/ UFV)** pelas capturas de *L. whitmani* de Timóteo (Minas Gerais).

À **Drª. Carolina Nascimento Spiegel (Universidade Federal Fluminense/RJ)** pelos conselhos na execução do trabalho e pelo envio do feromônio sexual sintético de *L. longipalpis*, 9-metilgermacreno-B.

Ao **Dr. Wagner Fernandes Knupp (CETEC/BH)** por ceder o padrão de hidrocarbonetos utilizados no Capítulo II.

Ao biólogo **Rodrigo Monteiro da Mota (Ecovec Ltda.)** pela confecção da armadilha Leishtrap.

Aos amigos **Herón Huerta (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Laboratorio de Entomología, México)**, **Cristian Ferreira de Souza (UFV)**, **Maurício Vilela (Setor de Flebotomíneos, Laboratório de Díptera do Instituto Oswaldo Cruz, RJ)**, **Lucas Neves Perillo (Departamento de Ecologia, UFMG)** e **Renata Antonaci Gama (UFRN)** pela gentileza em cederem as fotos das armadilhas que ilustram a Introdução deste trabalho.

À amiga **Ana Paula Martins Oliveira (Biblioteca do ICB/UFMG)** pelos rápidos serviços prestados na comutação de artigos com outras instituições, do Brasil e fora do país. Obrigado pela generosa amizade, pelos agradáveis papos e por ter acreditado, desde o início, em mim.

Ao **Dr. Michel Paiva Valim (ICB/UFMG)** amigo e irmão. Foi, durante esses 4 anos, um grande exemplo de amizade verdadeira, companheirismo e de pesquisador. Deveria ter lhe ouvido mais, mesmo quando eram “só idéias”. Esse trabalho é fruto de constantes tropeços, só está aqui agora, porque sempre foi quem me estendeu a mão. Agradeço por tudo e continua sendo pra mim a prova de que confiança e respeito de conquistam mutuamente.

Ao amigo **Dr. Filipe Dantas-Torres (Università degli Studi di Bari /Itália)** por todo ensinamento e aprendizado que compartilhamos juntos. Um grande exemplo! Obrigado por me socorrer sempre com a confecção dos mapas que ilustram a tese e na revisão do Resumo e do Abstract.

Aos, agora, mestrandos Felipe **Fonseca do Carmo (Departamento de Ecologia/ UFMG)** e **Mateus Ramos de Andrade (Departamento de Entomologia/ UFV)** que estiveram comigo durante todo o trabalho em Chapada Gáucha e hoje seguem seus próprios caminhos. Foi com eles quem mais aprendi, pois estiveram perto. Sempre com responsabilidade e dedicação, sabiam interferir no momento certo, com presteza e entusiasmo. Saibam que sempre fiz o possível para que o trabalho fosse prazeroso para vocês, embora eu saiba que tenha cometido falhas. Ao estudante **Iancor Diego Castro de Andrade Pereira (ICB/ UFMG)** que no último momento me auxiliou com a triagem e montagem dos insetos. Se escolher mesmo esse caminho saiba que terá sempre com quem contar.

Aos três grandes amigos que fiz nessa jornada (em ordem alfabética): **Alexandre Alves do Nascimento, Antonio Ferreira Mendes Sousa e Rodrigo de Almeida e Lourdes** que embora não tenham interferido direto no trabalho, foram os “sorrisos, abraços e conversas” que amenizaram meus piores momentos.

À minha **família** materna e paterna por entenderem minha ausência por mais esses 4 anos.

Ao **CNPQ, FINEP e SEBRAE** pelo financiamento do projeto que ilustra os Capítulos III e IV. Ainda ao **CNPQ** pela concessão da bolsa de doutorado durante a execução do trabalho.

O inventor da lâmpada, não acertou logo de cara. Ele precisou de várias tentativas. Quando ele foi questionado sobre esses "fracassos", ele respondeu:

“Eu não falhei. Encontrei 10 mil soluções que não davam certo.”

(Thomas Edison)

RESUMO

Os flebotomíneos apresentam um importante papel na transmissão de espécies de *Leishmania*, agentes das leishmanioses. Algumas espécies como, *Lutzomyia longipalpis sensu lato* (s.l.) estão incluídas em um complexo de espécies crípticas, porém para outras como *Lutzomyia whitmani* pouco se conhece sobre seu “status” taxonômico. A primeira está envolvida na transmissão de *Leishmania infantum chagasi* e a segunda de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania shawi*, responsáveis pelas formas de leishmaniose visceral e cutânea, respectivamente. A biologia e ecologia dessas espécies vetoras, e consequentemente a epidemiologia das leishmanioses, variam de acordo com a região e com a interação destes flebotomíneos com o ambiente e os hospedeiros vertebrados em uma determinada área. Estudos de ecologia química procuram entender o comportamento de flebotomíneos para identificar feromônios sexuais através de análises químicas de hidrocarbonetos, os quais podem ser usados como iscas em armadilhas, sendo utilizadas para o monitoramento das espécies que apresentam importância médico-veterinária. O presente estudo está dividido em duas partes. A primeira objetivou oferecer uma revisão sobre *L. whitmani*, desde sua descrição original, a fim de elucidar a existência de um possível complexo de espécies crípticas. A Cromatografia Gasosa (CG) foi utilizada para analisar os perfis cromatográficos de populações de flebotomíneos de diferentes regiões do Brasil. A técnica foi padronizada usando *L. longipalpis* s.l. como modelo. Na segunda parte, a armadilha BG-Sentinela[®] (BGS) e o cairomônio BG-Lure[®] (BGL), utilizados no monitoramento de culicídeos, foram avaliados em diferentes condições (altura de instalação, posição do funil de sucção, fonte luminosa) para captura de *L. longipalpis* s.l. Baseado nesses dados, uma armadilha de baixo custo e de eficiência semelhante a da armadilha luminosa CDC (denominada Leishtrap) foi desenvolvida para captura de *L. longipalpis* s.l. e *L. whitmani*. A detecção dos picos cromatográficos e a extração dos Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) foi padronizada usando um tempo de 50 minutos de corrida no cromatógrafo a gás, sendo utilizados 100 flebotomíneos no tempo de extração de 20 minutos em 1 ml de hexano. Uma menor diferença entre os possíveis HCCs foi identificada entre machos de *L. whitmani*. O hidrocarboneto C₂₁ não foi encontrado na população do Pará e o C₃₃ foi encontrado somente nas populações de Minas Gerais e do Paraná. Nenhuma grande diferença foi observada entre os HCCs de machos e fêmeas das mesmas populações de *L. whitmani* exceto para Minas Gerais, onde todos os compostos diferiram entre os sexos. A armadilha BGS não foi eficiente na captura de flebotomíneos quando testada sem fonte luminosa e a luz incandescente tornou a armadilha mais atrativa quando comparada a luz UV, sendo que a armadilha CDC captura mais que a BGS, com os dois recursos luminosos. O BGL não aumentou a captura de flebotomíneos na presença ou na ausência de luz. Maior captura de flebotomíneos, incluindo *L. longipalpis* s.l., foi observada quando a BGS estava invertida com sua abertura de sucção a 1,5 m acima do solo. O feromônio sexual sintético (9-metil-germacreno-B) foi adicionado ao protótipo 1 (P1) da Leishtrap e os resultados mostraram que as concentrações de 1,5 e 2 mg aumentaram a captura de fêmeas de *L. longipalpis* s.l. (ANOVA, p > 0.05). Em relação ao P2, a captura de machos (teste t, p > 0.05) e de fêmeas de *L. longipalpis* s.l. (Mann-Whitney, p > 0.05) não foi diferente quando comparadas aos resultados obtidos pela CDC e o mesmo resultado foi observado pelo P3. Similarmente, não foi observada diferença estatística na captura de *L. whitmani* quando comparados o P2 e a CDC. A técnica de CG padronizada permitiu detectar os possíveis HCCs que parecem variar entre essas populações e entre os machos e fêmeas da mesma população. A BGS como ferramenta para a captura de flebotomíneos, necessitaria de adaptações. Os protótipos P2 e P3 da Leishtrap foram eficientes para captura de *L. longipalpis* s.l. e *L. whitmani* os quais poderiam vir a substituir armadilhas luminosas, como a CDC, após contrapor os custos e benefícios das mesmas.

ABSTRACT

Phlebotomine sand flies play an important role in the transmission of *Leishmania* species, the etiological agents of the leishmaniases. Some sand fly species such as *Lutzomyia longipalpis sensu lato* (*s.l.*) are included in a complex of cryptic species, but for others such as *Lutzomyia whitmani*, the taxonomic status has yet to be clarified. The former species is involved in the transmission of *Leishmania infantum chagasi* and the later of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania shawi*, which are responsible for visceral and cutaneous forms of leishmaniasis, respectively. The biology and ecology of these vector species and, therefore, the epidemiology of the leishmaniases vary according to region and to the interactions of vectors with the environment and with the vertebrate hosts present in a given area. Chemical ecology studies seek to understand the behavior of sand flies in order to identify sex pheromones through chemical analysis of hydrocarbons. Cuticular Hydrocarbons (CHs) are used for the development of semiochemical-baited traps that are useful for monitoring species of medical and veterinary importance. The present study is divided in two parts. The first part intends to provide a review on *L. whitmani*, since its original description, in order to clarify the existence of a possible cryptic species complex. Gas chromatography (GC) was used to analyze the chromatographic profiles of sand fly populations from different regions of Brazil. The technique was standardized using *L. longipalpis s.l.* as a model. In the second part, the BG-Sentinel™ trap (BGS) and the kairomone BG-Lure™ (BGL), which are often used for monitoring mosquitoes, were evaluated under different conditions (positioning height, position of the suction funnel and light source) for capturing *L. longipalpis s.l.* Based on this data, a low cost trap with efficiency similar to the CDC light trap (called Leishtrap) was developed to collect both *L. longipalpis s.l.* and *L. whitmani*. The chromatographic peaks detection and the CHs extraction were standardized using a 50-minutes-column. One hundred sand flies were used in the extraction time of 20 min in 1 ml of hexane. A low difference between the possible CHs was identified among *L. whitmani* males. The hydrocarbon C₂₁ was not found in the population from Pará and the C₃₃ was exclusively detected in population from Minas Gerais and Paraná. No major differences were detected between the CHs of conspecific males and females, except for Minas Gerais, where all compounds differed according to sex. The BGS trap was not effective for capturing sand flies, when it was used without light. When this trap was used with light, incandescent light was more attractive than UV light. The BGL did not increase the captures of sand flies in the presence or absence of light. The CDC trap caught more sand flies than the BGS trap with light resources. Greater captures of sand flies, including *L. longipalpis s.l.*, were observed when the BGS trap was set upside-down with the suction opening 1.5 m above the ground. The synthetic sex pheromone (9-methyl-germacrene-B) was added to the Leishtrap prototype 1 (P1) and the results showed that compound concentrations (1.5 and 2 mg) increased the captures of *L. longipalpis s.l.* females (ANOVA, $p > 0.05$). For the P2, the captures of males (Student's t test, $p > 0.05$) and females of *L. longipalpis s.l.* (Mann-Whitney test, $p > 0.05$) did not differ when compared to results obtained with the CDC trap. The same result was obtained when the P3 was compared to the CDC trap. Similarly, no differences in the capture rates of *L. whitmani* were observed when the P2 was compared to the CDC trap. The GC standard technique detects CHs that vary between these populations and between males and females of the same population. For using the BGS trap as a new tool for capturing sand flies, this trap needs some adaptations. The prototypes P2 and P3 of the Leishtrap proved to be effective for capturing *L. longipalpis s.l.* and *L. whitmani*. Therefore, the Leishtrap can replace light traps, such as the CDC trap, after a cost-benefit analysis is performed.

LISTA DE FIGURAS

Introdução	Páginas
Figura 1- Métodos de captura de flebotomíneos: A) capturador de Castro; B) busca ativa; C) cartão adesivo; D) armadilha luminosa CDC (modelo HP); E) armadilha de New Jersey; F) armadilha de Shannon; G) armadilha de Damasceno; H) armadilha Malaise; I) armadilha de Disney (detalhe de um roedor usado como isca).	31
Capítulo I	
Figura 1- Linhagens de <i>Lutzomyia whitmani</i> que ocorrem no Brasil. Locais de captura- Amapá: Serra do Navio (NAV); Bahia: Corte de Pedra (CP), Ilhéus (IL); Espírito Santo: Viana (VI); Pará: Água Parada (próximo a Paragominas) (AP), Serra dos Carajás (CA), Dom Elizeu (DE), Monte Dourado(JA); Paraná: Maringá (MA); Pernambuco: Refrigério (RE); Piauí: Teresina (TS); Rondônia: Buriti (BRO), Cacaulândia (CAC), Montenegro (MON). (Fonte: ISHIKAWA <i>et. al.</i> ,1999).	51
Capítulo II	
Figura 1- Procedências das populações de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> : MG- Lagoa Santa (19°37'44''S, 43°53'23''W); PI- Teresina (05°05'21''S, 42°48'07''W); PA- Barcarena (01°30'21''S, 48°37'33''W); Cametá (02°14'40''S, 49°29'45''W); Santarém (02°26'35''S, 54°42'30''W). (Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas – IBGE, 2009).	61
Figura 2- Procedências das populações de <i>Lutzomyia whitmani</i> : BA- Ilhéus (14°47'20''S, 39°02'58''W); PA- Paragominas (02°59'45''S, 47°21'10''W); PR- Maringá (23°25'31''S, 51°56'19''W) e Mandaguari (23°32'51''S, 51°40'15''W); MG- Timóteo (19°34'57''S, 43°38'40''W). (Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas – IBGE, 2009).	61
Figura 3- Perfis cromatográficos (tempo de corrida= 50 minutos): (A) mistura de hidrocarbonetos (C ₁₃ -C ₄₀) utilizada como padrão para cálculo do Índice de Retenção; (B) heptano; (C) heneicozano.	66
Figura 4- Fórmula utilizada para o cálculo do Índice de Retenção (IR) onde o “eixo x” representa o IR (nC x 100) e o “eixo y” o tempo de retenção (minutos) das amostras após injeções da mistura de hidrocarbonetos (C ₁₃ -C ₃₃) (n=5).	67
Figura 5- Perfis cromatográficos de extratos hexânicos: A) 50 ♂ de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> no tempo de 30 minutos de corrida; B) 50 ♀ de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> no tempo de 50 minutos de corrida.	68
Figura 6- Perfis cromatográficos de extratos hexânicos: A) 50 ♂ de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> no tempo de 30 minutos de extração; B) 50 ♀ de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> no tempo de 20 minutos de extração.	70

- Figura 7-** Perfil cromatográfico de extrato hexânico (20 minutos) de 100 ♂ de *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Total de picos= 125) 71
- Figura 8-** Sobreposição dos perfis cromatográficos de machos de *Lutzomyia longipalpis* s.l. (n de insetos= 100, tempo de corrida= 50 minutos) de Minas Gerais (A), Piauí (B) e Pará (C) com o feromônio sintético do 9-metil-germacreno-B gerados por Cromatografia Gasosa (cromatogramas coloridos-verde, rosa, vermelho-representam 3 repetições dos extratos). 72
- Figura 9-** Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 100 machos (A) e 100 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* s.l. (100 insetos/1ml de hexano durante 20 minutos de extração) provenientes de Lagoa Santa, Minas Gerais (Programação cromatográfica= 50 minutos). 73
- Figura 10-** Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 100 machos (A) e 100 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* s.l. (100 insetos/1ml de hexano durante 20 minutos de extração) provenientes da Cametá, Pará (Programação cromatográfica= 50 minutos). 74
- Figura 11-** Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 100 machos (A) e 100 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* s.l. (100 insetos/1ml de hexano durante 20 minutos de extração) provenientes de Teresina, Piauí (Programação cromatográfica= 50 minutos). 75
- Figura 12-** Perfil cromatográfico da mistura de hidrocarbonetos (C₁₃-C₄₀) utilizada como padrão para cálculo do Índice de Retenção e relação ao pico cromatográfico do algodão utilizado para a filtragem das amostras. 76
- Figura 13-** Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 72 machos (A) e 67 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia whitmani* durante 20 minutos de extração provenientes de Ilhéus, Bahia (Programação cromatográfica= 50 minutos). 80
- Figura 14-** Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 100 machos (A) e 100 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia whitmani* durante 20 minutos de extração provenientes de Timóteo, Minas Gerais (Programação cromatográfica= 50 minutos). 81
- Figura 15-** Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 37 machos (A) e 28 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia whitmani* durante 20 minutos de extração provenientes de Paragominas, Pará (Programação cromatográfica= 50 minutos). 82
- Figura 16-** Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 100 machos (A) e 100 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia whitmani* durante 20 minutos de extração provenientes de Maringá e Mandaguari, Paraná (Programação cromatográfica= 50 minutos). 83

Capítulo III

Figura 1- Município de Barcarena (01°30'21"S, 48°37'33"W), localizado no Estado do Pará. (Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2009).	97
Figura 2- Representação esquemática das armadilhas BG-Sentinela (A) e T-Trap (B). AS: abertura de sucção contendo o saco coletor, T: tubo; V: ventilador; M: malha de cobertura; H: haste de fixação da luz incandescente (L).	99
Figura 3- BG-Sentinela e T-Trap dispostas a 1,5m de altura em torno de um galinheiro, na presença de luz incandescente (detalhe) (Barcarena, PA).	99
Figura 4- Representação esquemática da BG-Sentinela sem luz (A), com luz incandescente e (B) com luz ultravioleta (C).	101
Figura 5- Representação esquemática da BG-Sentinela instalada na posição normal (A), invertida (B) e lateralmente (C).	101
Figura 6- Disposição da abertura de sucção a armadilha BG-Sentinela com luz incandescente na posição normal a 1,5 m do solo (A), BGS de lado a 1,5m do solo (B), BGS invertida a 1,5 m do solo (C), BGS normal a 40cm do solo (D), BGS de lado a 40cm do solo (E), BGS a 40cm do solo (F).	102
Figura 7- Espécies de flebotomíneos (%) capturadas em Barcarena (PA) durante os experimentos para avaliação da BG-Sentinela. Dados do experimento 6 não foram incluídos.	104
Figura 8- Média de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: BG-Sentinela (BGS), T-Trap e CDC ($n= 2$). [Letras iguais entre os tratamentos indicam ausência de diferença significativa (Kruskall-Wallis, $p> 0,05$)].	106
Figura 9- Média de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: CDC (com Luz incandescente) e pela BG-Sentinela com luz incandescente (BGS+Luz), com BG-Lure e Luz incandescente (BGS+BGL+Luz) e com BGL e sem luz (BGS+BGL-Luz), no solo e a 1,5m ($n= 1$) (Kruskall-Wallis, $p> 0,05$).	106
Figura 10- Média de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: CDC e BGS sem luz (SL), com luz incandescente (LI) e luz ultravioleta (LUV) ($n = 3$). [Letras iguais indicam ausência de diferença significativa entre tratamentos (Kruskall-Wallis, $p> 0,05$); ‘*’ mostra diferença significativa (Kruskall-Wallis, $p< 0,05$)].	109
Figura 11- Ranking da média de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: CDC, BG-Sentinela invertida (BGS Inv), BGS de lado (BGS Lat), BGS normal (BGS Nor) (□= 1,5 m do solo; ■= 40 cm do solo) em Barcarena, PA ($n= 1$) (ANOVA, $p> 0,05$). (Todas as armadilhas instaladas com luz incandescente e as alturas referem-se a abertura de sucção das armadilhas em relação ao solo).	111
Figura 12- Média de fêmeas (A= ANOVA, $p> 0,05$) e de machos (a= Kruskall-Wallis, $p> 0,05$) de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> capturados pelas armadilhas: CDC, BG-Sentinela invertida a 1,5 m do solo (BGS Inv 1,5m), BGS de lado a 1,5 m do solo (BGS Lat 1,5m), BGS normal a 1,5 m do solo (BGS Lat 1,5m), BGS invertida a 40 cm do solo (BGS Inv 40cm), BGS de lado a 40 cm do solo (BGS Lat 40cm), BGS	111

normal no solo (BGS Nor 40cm) em Barcarena, PA ($n= 1$). (Todas as armadilhas foram instaladas com luz incandescente, as alturas referem-se a abertura de sucção das armadilhas em relação ao solo).

Capítulo IV

- Figura 1-** Município de Barcarena (01°30'21"S, 48°37'33"W), localizado no Estado do Pará. (**Fonte:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas – IBGE, 2009). **119**
- Figura 2-** Município de Chapada Gaúcha (15°18'21''S e 45°37'04''W), localizado no norte do Estado de Minas Gerais. (**Fonte:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas – IBGE, 2009). **119**
- Figura 3-** Município de Ilhéus (14°47'S e 39°2'W), localizado no Estado da Bahia. (**Fonte:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas – IBGE, 2009). **119**
- Figura 4:** Esquema ilustrando a disposição dos cartões adesivos com cola (azul, preto, prata e branco) em três galinheiros (gA, gB e gC): **A-** cartões com cola nas três alturas com adaptação de luz incandescente; **B-** disposição dos cartões no entorno dos galinheiros (Barcarena, PA). **121**
- Figura 5-** Pulseiras de Neon (= luzes químicas) do tipo Lightsticks (20 cm comprimento). **123**
- Figura 6-** Procedimentos para medida da intensidade luminosa das pulseiras de Neon: **A-** caixa perfurada na tampa; **B-** pulseira de neon (= luz química) no interior da caixa de papelão (10,5 x 7,0 x 3,5 cm); **C-** Luxômetro para medida de intensidade luminosa. **123**
- Figura 7-** Testes para confecção do protótipo P1 da Leishtrap. **A)** CDC com luz incandescente; **B)** CDC com luz química vermelha (3 unidades); **C)** CDC com luz incandescente e luz química verde (5 unidades); **D)** vista do P1 instalado no interior de galinheiro; **E)** cartão adesivo do P1 (a seta preta aponta o septo de borracha com o feromônio sexual 9-metil-germacreno); **F)** vista frontal do P1 (seta branca aponta o septo de borracha); **G)** vista lateral do P1. **124**
- Figura 8-** Esquema da Leishtrap: **(A1)** suporte bidimensional branco em forma de “U” que fixa **(A2)** um cartão adesivo branco dupla-face e **(A3)** luz química formado por tubos cor verde; **(A4)** é o anteparo superior para fechar e fixar o cartão e funciona como uma tampa para o “U” **(A1)** formando um quadro. Cinco ou mais encaixes de cada uma das duas extremidades laterais do “U” **(B e C)**. **126**
- Figura 9-** Testes realizados em Chapada Gaúcha (MG) usando um protótipo da armadilha Leishtrap (P2): **A e B)** CDC com luz incandescente e P2 (10 pulseiras); **C)** cartão adesivo do P2 com um flebotômico; **D)** vista frontal (de um dos lados) do P2; **E)** vista lateral do P2. **128**
- Figura 10-** Testes realizados em Chapada Gaúcha (MG) usando dois protótipos da armadilha Leishtrap (P3) no interior de galinheiros. **128**

Figura 11- Testes realizados em Ilhéus (BA) usando os protótipos P2 e P3 da armadilha Leishtrap em peridomicílio para captura de <i>Lutzomyia whitmani</i> .	129
Figura 12- Método de remoção dos flebotomíneos da armadilha Leishtrap utilizando uma gota de Xilol e um estilete.	130
Figura 13- Média de captura de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> por armadilha CDC com diferentes fontes luminosas (3 unidades): (LNV= luz neon verde. LI= luz incandescente; LNA= luz neon azul; LNVe= luz neon vermelha) (Letras iguais indicam ausência de diferença significativa., ANOVA, $p > 0,05$).	134
Figura 14- Comparação entre o efeito da luz incandescente produzida por pilha (1,5 volts) e a luz química verde (5 unidades) na captura de flebotomíneos (Mann-Whitney, $p > 0,05$) (Chapada Gaúcha, Minas Gerais – 28/02-01/03/2008).	135
Figura 15- Média de captura de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> nas armadilhas CDC e o P1 (cartões+luz verde, com ou sem feromônios). O símbolo [] representa a concentração de 2,0 mg/50 μ l e 1,5 mg/50 μ l do feromônio sintético 9-metil-germacreno B no P1. (ANOVA, $p > 0,05$).	136
Figura 16- Média de machos e fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> capturados por tratamento. O símbolo [] representa a concentração de 2,0 mg/50 μ l e 1,5 mg/50 μ l e do feromônio sintético 9-metil-germacreno B no P1. (Letras iguais indicam ausência de diferença estatística; Machos= Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Fêmeas= ANOVA, $p > 0,05$).	136
Figura 17- Média de flebotomíneos capturados nas armadilhas CDC e em uma Leishtrap (P2) (Chapada Gaúcha, MG) (Mann-Whitney, $p < 0,05$).	137
Figura 18- Média de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> capturados nas armadilhas CDC e em uma Leishtrap (P2) (Teste t, $p > 0,05$).	138
Figura 19- Média de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> (por sexo) capturados nas armadilhas CDC e em uma Leishtrap (P2) (a= Teste t, $p > 0,05$; b= Mann-Whitney, $p > 0,05$).	138
Figura 20- Média de flebotomíneos capturados nas armadilhas CDC e em duas unidades da Leishtrap (P3) (Chapada Gaúcha, MG) (Mann-Whitney, $p > 0,05$).	139
Figura 21- Média de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> capturados nas armadilhas CDC e em duas unidades da Leishtrap (P3) (Mann-Whitney, $p > 0,05$).	140
Figura 22- Média de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> (por sexo) capturados nas armadilhas CDC e em duas unidades da Leishtrap (P3) (a= Teste t, $p > 0,05$; b= Mann-Whitney, $p > 0,05$).	140
Figura 23- Média de <i>Lutzomyia whitmani</i> . (por sexo) capturados nas armadilhas CDC e em uma unidade da Leishtrap (P2) (a= Teste t, $p > 0,05$; A= Mann-Whitney, $p > 0,05$).	142

LISTA DE TABELAS

Introdução	Páginas
Tabela 1- Tipos de armadilhas utilizadas para captura de flebotomíneos.	30
Tabela 2- Espécies de flebotomíneos do Velho e do Novo Mundo com hidrocarbonetos cuticulares caracterizados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) ou por Cromatografia Gasosa (CG).	37
Capítulo I	
Tabela 1- Estudos realizados com a espécie <i>Lutzomyia whitmani</i> caracterizando-a como pertencente a um complexo de espécies.	54
Capítulo II	
Tabela 1- Possíveis Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) extraídos de 100 machos de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> ($n= 3$) provenientes dos Estados de Minas Gerais, Pará e Piauí identificados através do Índice de Retenção (IR) gerado pela mistura de alcanos (C_{13} - C_{40}) e sua porcentagem de área (%).	77
Tabela 2- Possíveis Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) extraídos de 100 fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> ($n= 3$) provenientes dos Estados de Minas Gerais, Pará e Piauí identificados através do Índice de Retenção gerado pela mistura de alcanos (C_{13} - C_{40}) e sua porcentagem de área (%).	78
Tabela 3- Possíveis Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) extraídos de machos de <i>Lutzomyia whitmani</i> ($n= 1$) provenientes dos Estados da Bahia, Pará, Minas Gerais e Paraná identificados através do Índice de Retenção (IR) gerado pela mistura de alcanos (C_{13} - C_{40}) e sua porcentagem de área (%).	84
Tabela 4- Possíveis Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) extraídos de fêmeas de <i>Lutzomyia whitmani</i> ($n= 1$) provenientes dos Estados da Bahia, Pará, Minas Gerais e Paraná identificados através do Índice de Retenção (IR) gerado pela mistura de alcanos (C_{13} - C_{40}) e sua porcentagem de área (%).	85
Capítulo III	
Tabela 1- Espécies de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: BG-Sentinela (BGS), T-Trap e CDC luminosa (controle) com luz incandescente a 1,5 m em Barcarena, PA (12-29/03/2007).	104
Tabela 2- Espécies de flebotomíneos capturadas pelas armadilhas: CDC, BG-Sentinela com luz incandescente a 1,5 m [BGS+Luz (1,5m)], BGS com luz incandescente no solo [BGS+Luz (solo)], BGS com BG-Lure e luz incandescente a 1,5 m [BGS+BGL+Luz (1,5m)], BGS com BGL e luz incandescente no solo [BGS+BGL+Luz (solo)], BGS com BGL sem luz incandescente 1,5m do solo	107

([BGS+BGL-Luz (1,5m)]), BGS com BGL sem luz incandescente no solo [BGS+BGL-Luz (solo)]em Barcarena, PA (Janeiro, 2008).

Tabela 3- Espécies de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: CDC e BG-Sentinela (BGS) sem luz (SL), com luz incandescente (LI) e luz ultravioleta (LUV) em Barcarena, PA (07-22/12 /2008). **109**

Tabela 4- *Lutzomyia longipalpis s.l.* capturados pelas armadilhas CDC, BG-Sentinela invertida a 1,5 m do solo (BGS Inv 1,5m), BGS de lado a 1,5 m do solo (BGS Lat 1,5m), BGS normal a 1,5 m do solo (BGS Nor 1,5m), BGS invertida a 40 cm do solo (BGS Inv 40 cm), BGS de lado a 40 cm do solo (BGS Lat 40 cm), BGS no solo (BGS Nor 40cm) em Barcarena, PA (Todas as armadilhas instaladas com luz incandescente e as alturas referem-se a abertura de sucção das armadilhas em relação ao solo) (15-21/01/2009). **110**

Capítulo IV

Tabela 1- Espécies de flebotomíneos capturados pelos cartões adesivos com diferentes cores (azul, branco, prata e preto) a 40 cm, 1 m e 1,5 m e pela CDC (controle) em Barcarena, PA (27/02 a 11/03/2007). **132**

Tabela 2- Número de flebotomíneos capturados por armadilha e por casa em Chapada Gaúcha, MG (4 repetições) (06/12-26/12/2007). **133**

Tabela 3- Número de indivíduos da espécie *Lutzomyia longipalpis s.l.* (machos e fêmeas) capturados pela armadilha CDC contendo diferentes cores de luzes neon (luz química) em Chapada Gaúcha, MG (06/12-26/12/2007). **133**

Tabela 4- Número de *Lutzomyia longipalpis s.l.* capturados pela armadilha CDC e os protótipos P1 [2,0] (cartão+luzes+septo 2,0 mg/50µl de feromônio sexual); P1 [1] (cartão+luzes+septo 1,5 mg/50µl de feromônio sexual); P1 controle (cartão+luzes+septo) em Chapada Gaúcha, MG (27/02-01/03/2008). (Feromônio sintético: 9-metil-germacreno-B). **135**

Tabela 5- Número de *Lutzomyia longipalpis s.l.* capturados na armadilha CDC e em uma Leishtrap (P2), de acordo com o sexo dos espécimes, em Chapada Gaúcha, MG (13/12-18/12/2008). **138**

Tabela 6- Número de *Lutzomyia longipalpis s.l.* capturados na CDC e em duas unidades da Leishtrap (P3) (P3), de acordo com o sexo dos espécimes em Chapada Gaúcha, MG (19/12-25/12/2008). **140**

Tabela 7- Número de *Lutzomyia whitmani* capturados na CDC em relação a uma unidade (P2) e a duas unidades da Leishtrap (P3), de acordo com o sexo dos espécimes em Ilhéus, BA (30/03-14/04/2010). **141**

LISTA DE ABREVIATURAS

- CDC**- Center Disease Control (armadilha luminosa).
HP- Hoover Pugedo (armadilha luminosa)
LV- Leishmaniose Visceral
LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana
BGS- BG-Sentinela[®] (armadilha)
BGL- BG-Lure[®] (caiomônio sintético)
SL- Sem Luz
LI- Luz Incandescente
LUV- Luz Ultra Violeta
LVe- Luz Química Verde
HCCs- Hidrocarbonetos Cuticulares
CG- Cromatografia Gasosa
CG-EM- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
IR- Índice de Retenção ou Índice de Kovats
C- Hidrocarboneto
FID- Detector de Ionização de Chama

ANEXOS

	Páginas
ANEXO A - Tabelas ilustrando que as maiores áreas geradas pelo pico cromatográfico não correspondem a possíveis hidrocarbonetos cuticulares de machos de <i>L. longipalpis s.l.</i> (uma repetição).	92
ANEXO B - Tabelas ilustrando que as maiores áreas geradas pelo pico cromatográfico não correspondem a possíveis hidrocarbonetos cuticulares de fêmeas de <i>L. longipalpis s.l.</i> (uma repetição).	93

SUMÁRIO

	Páginas
1- Introdução	23
2- Justificativa	39
3- Objetivo Geral	41
3.1- Objetivos específicos	41
CAPÍTULO I- <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), o mais importante vetor de Leishmaniose Cutânea no Brasil: um complexo de espécies crípticas?	
Resumo	43
1. Introdução	44
2. <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i> (Antunes & Coutinho, 1939)	45
3. <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i> : aspectos da biologia e da competência vetorial em diferentes regiões geográficas no Brasil	46
4. <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i> : um complexo de espécies crípticas ou uma espécie com elevada capacidade de adaptação às alterações ambientais e climáticas?	49
5. Considerações finais	53
CAPÍTULO II- Padronização de metodologia para identificação de hidrocarbonetos cuticulares por Cromatografia Gasosa em <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> e <i>Lutzomyia whitmani</i> (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)	
Resumo	56
1. Introdução	57
2. Objetivo	59
2.1. Objetivos específicos	59
3. Material e Métodos	60
3.1. Procedência dos flebotomíneos	60

3.2. Triagem dos insetos	62
3.3. Dados do Cromatógrafo Gasoso e extração dos compostos cuticulares	62
3.4. Cromatografia Gasosa (CG): padronização do programa de temperatura para análise cromatográfica	63
3.5. Observar o tempo de extração dos compostos cuticulares por GC	64
3.6. Avaliar o melhor número de flebotomíneos a serem utilizados para detecção dos compostos por CG	64
3.7. Comparar os extratos de <i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i> , provenientes das populações do Pará, Minas Gerais e Piauí	64
3.8. Avaliar a técnica de CG para machos e fêmeas de <i>Lutzomyia whitmani</i>	65
3.9. Análise dos Dados	67
4. Resultados	67
5. Discussão	86

CAPÍTULO III- A armadilha BG-Sentinela[®] como ferramenta para captura de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

Resumo	93
1. Introdução	94
2. Objetivo	96
2.1. Objetivos específicos	96
3. Material e Métodos	96
3.1. Área de estudo	96
3.2. Delineamento experimental	98
Experimento 1. Comparar a captura de flebotomíneos através das armadilhas BGS, T-trap e CDC	98
Experimento 2. Avaliar a altura da BGS com luz incandescente e com o atraente sintético BGL	98
Experimento 3. Avaliar a captura de flebotomíneos através das armadilhas CDC e BGS na ausência de luz, com luz incandescente e com luz UV	100
Experimento 4. Avaliar a altura e posição da armadilha BGS na captura de <i>L. longipalpis s.l.</i>	100

3.3. Triagem, montagem e identificação dos flebotomíneos	103
3.4. Análises estatísticas	103
4. Resultados	103
5. Discussão	112
CAPÍTULO IV- Leishtrap: uma nova armadilha para a captura de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)	
Resumo	115
1. Introdução	116
2. Material e Métodos	118
2.1. Áreas de estudo	118
2.2. Delineamento experimental	120
Experimento 1. Avaliar em campo, as respostas visuais de machos e fêmeas de flebotomíneos a cartões adesivos com diferentes cores	120
Experimento 2. Avaliar o tempo de duração e a intensidade das luzes químicas	122
Experimento 3. Avaliar a capacidade das luzes químicas em atrair flebotomíneos em campo	122
Experimento 4. Comparar a CDC com luz incandescente e CDC com luz química verde	122
Experimento 5. <i>Comparar a CDC (luz incandescente) com protótipos da nova armadilha (P1) da Leishtrap</i>	125
Experimento 6. <i>Comparar a eficiência de captura de Lutzomyia longipalpis s.l. entre a armadilha CDC e a Leishtrap</i>	125
Experimento 7. <i>Avaliar os protótipos da armadilha Leishtrap (P2 e P3) para a captura de Lutzomyia whitmani</i>	127
2.3. Remoção, triagem e identificação dos flebotomíneos	127
2.4. Análise dos dados	131
3. Resultados	131
4. Discussão	142

1. Introdução

1.1. A família Psychodidae, subfamília Phlebotominae

A família Psychodidae pertence à ordem Diptera e subordem Nematocera. Está dividida em seis subfamílias, Bruchomyiinae, Trichomyiinae, Horaiellinae, Psychodinae, Sycoracinae e Phlebotominae (FORATTINI, 1973).

Bruchomyiinae está composta por três gêneros: *Nemapalpus* Macquart, 1838 com ampla distribuição geográfica, incluindo diversas espécies Neotropicais (QUATE & ALEXANDER 2000); *Bruchomyia* Alexander, 1920 representado por nove espécies registradas somente para a região Neotropical e *Eutonnoiria* Alexander, 1940 por somente uma espécie africana. Trichomyiinae é representada pelo gênero *Trichomyia* Tonnoir, 1922 com subgêneros *Septemtrichomyia* Bravo, 1999 e *Opisthotrichomyia* Bravo, 2001 os quais compreendem 77 espécies, sendo três recentemente descritas na Colômbia (BEJARANO *et al.*, 2009a,b). A subfamília Horaiellinae está representada por um único gênero, *Horaiella* Tonnoir, 1933 com indivíduos encontrados em áreas montanhosas do Nordeste da Índia, na China e na Tailândia. Na região Neotropical, incluindo a América Latina e Ilhas Caribenhas, a subfamília Psychodinae está composta por 12 gêneros e 51 espécies (com uma fóssil), cujos insetos são vulgarmente conhecidos como “mosquinhos-de-banheiro”. Para a subfamília Sycoracinae, composta por 36 espécies, incluindo três fósseis, há relatos de indivíduos se alimentando de animais de sangue frio (YOUNG, 1979).

Os primeiros registros de dípteros da subfamília Phlebotominae datam do Cretáceo Inferior (LEWIS, 1982) e o nome foi dado a partir do gênero *Phlebotomus* Rondani, 1840 cujas fêmeas hematófagas sugam sangue de diversos animais e também do homem. São referidos na literatura como flebotomíneos ou flebótomos e esses nomes vulgares podem variar de região para região (MARTINS *et al.*, 1978). Embora em alguns locais os flebotomíneos sejam conhecidos como “mosquito-palha” ou “mosquito-do-rio”, eles não são mosquitos (= culicídeos), uma vez que apresentam características exclusivas, que os incluem na família Psychodidae e não na família Culicidae.

A subfamília Phlebotominae está composta por seis gêneros: *Phlebotomus* (94 espécies), *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 (258 espécies) e *Chinius* Leng, 1987 (três espécies), no Velho Mundo; *Lutzomyia* França, 1924 (mais de 400 espécies), *Brumptomyia* França & Parrot, 1921 (24 espécies), *Warileya* Hertig, 1984 (oito espécies) e *Hertigia* Fairchild, 1949 (uma espécie) no Novo Mundo (YOUNG & DUNCAN, 1994;

MUNSTERMANN, 2004) compreendendo mais de 800 espécies de flebotomíneos, com 60% delas registradas para a Região Neotropical (AGUIAR & MEDEIROS, 2003). Dos gêneros de flebotomíneos do Novo Mundo, *Lutzomyia*, além de ter importância epidemiológica, é o mais abundante e o de mais ampla distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o norte da Argentina (RANGEL & LAINSON, 2003). Entre as mais de 500 espécies de flebotomíneos conhecidas nas Américas, aproximadamente 400 pertencem a este gênero o qual é formado por 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e duas espécies com descrição deficiente (YOUNG & DUNCAN, 1994). Segundo GALATI (2003a) são relatadas, aproximadamente, 464 espécies de flebotomíneos sul-americanos, sendo que mais de 243 já foram registradas para o Brasil.

Flebotomíneos são insetos holometábolos (ovo, larvas, pupa, adulto), sendo que seus instares larvais desenvolvem-se e alimentam-se de matéria orgânica depositada no solo, enquanto os adultos, de ambos os sexos, se alimentam de açúcares de plantas. Somente as fêmeas adultas são hematófagas, sendo o sangue importante para a maturação dos ovos (FORATTINI, 1973), embora espécies, como *Lutzomyia (Lutzomyia) lichi* (Floch & Abonnenc, 1950), possam fazer a primeira oviposição sem fazerem o repasto sanguíneo (MONTROYA-LERMA, 1992). Já para as formas imaturas o conhecimento sobre o hábito alimentar se deve, principalmente, devido a estudos realizados com indivíduos de colônias de *L. (L.) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) mantidas em laboratório e pouco se sabe sobre os criadouros naturais das formas imaturas de flebotomíneos no Novo Mundo. Estas formas têm sido encontradas em ambientes domésticos (construções abandonadas, porões de casas, fendas de chão e paredes), peridomésticos (tocas de animais, latrinas, debaixo de pedras, aterros) e silvestres (formigueiros, cavernas, raízes tabulares) (FELICIANGELLI, 2004).

1.2. A taxonomia e classificação de Phlebotominae

O primeiro naturalista a descrever e desenhar um flebotomíneo foi o italiano Filippo Bonanni em sua obra “Micrographia Curiosa” de 1691, denominando-o de *Culex minimus* para diferenciá-lo de outro mosquito a que este autor nomeou de “*Culex*”. Todavia, a primeira descrição de um flebotomíneo, após a proposição do sistema de nomenclatura binomial de Linnaeus (1753) foi feita em 1786, sendo a espécie denominada de *Bibio papatasi*. Em 1840 criou-se o gênero *Flebotomus* com a espécie-tipo *F. papatasi* dentro da família Flebotominae e em 1846 corrigiu-se a grafia de *Flebotomus* para *Phlebotomus*. Em 1907, Coquillett descreveu os primeiros flebotomíneos americanos *Phlebotomus vexator* e *P. cruciatus*

(GALATI, 2003 a). Até 1940, haviam 33 espécies de flebotomíneos americanas descritas. A partir deste período, com a comprovação de sua importância vetorial na transmissão de leishmânias, passou-se a haver mais interesse pelo grupo. Como para a identificação correta das espécies se dependia de uma boa classificação do grupo, se intensificaram os estudos taxonômicos.

Como em qualquer grupo de seres vivos, o processo de classificação dos flebotomíneos tem sido bastante dinâmico. À medida que se descreviam as espécies, aquelas morfológicamente parecidas eram agrupadas em subgêneros, dentro do único gênero *Phlebotomus*. Em 1948, Theodor elevou alguns subgêneros à categoria de gênero e separou os flebotomíneos em quatro gêneros, dois para o Velho Mundo: *Phlebotomus* e *Sergentomyia* e dois para as Américas: *Brumptomyia* e *Lutzomyia*. Na América, logo após esta divisão, dois outros gêneros foram propostos: *Warileya* e *Hertigia*, além de diversos outros subgêneros. A maioria dos estudiosos de flebotomíneos tende a adotar essas categorias genéricas (YOUNG & DUNCAN, 1994). No entanto, FORATTINI (1973) agrupou as espécies consideradas em *Lutzomyia* em cinco gêneros: *Lutzomyia*, *Pintomyia* Costa Lima, 1932; *Psychodopygus* Mangabeira, 1941; *Pressatia* Mangabeira 1942 e *Viannamyia* Mangabeira 1941. YOUNG & DUNCAN (1994) publicaram uma chave para os flebotomíneos das Américas Central e do Sul e Ilhas Caribenhas, considerando todas as espécies novamente incluídas em um único gênero, *Lutzomyia*. Um ano após essa classificação, GALATI (1995) utilizando de análise cladística criou oito subtribos, bem como diversos gêneros e subgêneros. GALATI (2003a,b) reformulou e publicou no livro “Flebotomíneos do Brasil” (RANGEL & LAINSON, 2003) uma nova classificação dos flebotomíneos das Américas, incluindo a América do Norte, inseridos em duas tribos, quatro subtribos, 16 gêneros e, atualmente, 464 espécies válidas sendo que mais de 243 já foram registradas no país. Atualmente, no mundo são conhecidas, aproximadamente, 943 espécies de flebotomíneos (20 delas fósseis). Com exceção das áreas polares, ocorrem em todos os demais continentes. Na América, foram descritas 515 espécies, cerca de 401 no Velho Mundo e 27 na Região Australiana.

Durante algumas décadas, as pesquisas sobre a taxonomia do grupo foram focadas principalmente na morfologia dos espécimes, utilizando morfometria e morfologia, associadas a dados biológicos. Historicamente, os estudos taxonômicos podem ser divididos em duas fases distintas, de acordo com os caracteres usados para diferenciar e classificar as espécies. Em um primeiro estágio, somente detalhes da morfologia externa foram estudados, com particular ênfase em morfometria (PERFILI'EV, 1968 *apud* MARTINS *et al.*, 1978). Um segundo estágio da sistemática de flebotomíneos se deu quando dois parasitologistas ADLER

& THEODOR (1926), introduziram o uso de estruturas internas como características taxonômicas, particularmente de cibário, faringe e espermatecas, em fêmeas. Contudo, os avanços na classificação do grupo têm sido impulsionados, principalmente, pela importância destes insetos como transmissores de agentes etiológicos causadores de doenças, incluindo estudos de variações intraespecíficas (LANE, 1986). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1977), a taxonomia de flebotomíneos foi e é uma base indispensável para desenvolvimento de trabalhos sobre a biologia e sobre o papel vetorial desses insetos.

Atualmente, alguns dos avanços mais significativos para a taxonomia e classificação dos flebotomíneos têm sido feitos com o auxílio de estudos refinados, como as análises de cromossomos e de isoenzimas, microscopia eletrônica e estudo da biologia em laboratório para se investigar variações inter e intraespecíficas, dentre outros (LANE, 1986). Alguns destes métodos estão sendo aplicados somente com o propósito taxonômico, como, por exemplo, a análise dos hidrocarbonetos cuticulares, usada para discriminar espécies crípticas (RYAN *et al.*, 1986; KAMHAWI *et al.*, 1987; PHILLIPS *et al.*, 1990a, 1990b).

1.3. Os flebotomíneos e as leishmanioses

A importância dos flebotomíneos diz respeito, principalmente, por estarem envolvidos na epidemiologia das leishmanioses, que podem se manifestar nas formas clínicas, visceral e tegumentar. A transmissão das espécies de *Leishmania* Ross, 1903 envolve diferentes espécies de flebotomíneos, associadas a mamíferos reservatórios desses parasitos, levando a diferentes ciclos e perfis de transmissão da doença no Brasil e no Mundo. Alguns estudos experimentais com flebotomíneos em laboratório utilizando espécies de leishmânias dos subgêneros *Viannia* Lainson & Shaw, 1987 e *Leishmania* têm sugerido ou comprovado certas espécies como sendo responsáveis pela transmissão de diferentes espécies de *Leishmania* (RANGEL & LAINSON, 2009). Essa cadeia de transmissão (reservatório, parasito e vetor) difere de acordo com a distribuição geográfica das espécies de flebotomíneos e reservatórios, da sua capacidade de infecção e transmissão das leishmânias pelos flebotomíneos e na manifestação da doença em canídeos domésticos e no ser humano.

Na América, atualmente 54 espécies de flebotomíneos são suspeitas de transmitirem espécies de *Leishmania*, agentes de leishmaniose tegumentar americana, para cães. Dentre estas 12 espécies são comprovadas: *L. (Nyssomyia) trapidoi* (Fairchild & Hertig, 1952); *L. (N.) ylephiletor* (Fairchild & Hertig, 1952); *L. (Pintomyia) spinacrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno & Hoyos, 1969; *L. (P.) verrucarum* (Townsend, 1913); *L. (N.) olmeca olmeca*

(Vargas & Díaz-Nájera, 1959). Sete espécies são registradas para o Brasil: *L. (L.) gomezi* (Nitzulescu, 1931); *L. (N.) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939); *L. (Psychodopygus) wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971); *L. (P.) carrerai carrerai* (Barretto, 1946); *L. (P.) yucumensis* (Le Pont, Cailard, Tibayrenc & Desjeux, 1986); *L. (P.) panamensis* (Shannon, 1926); *L. (P.) llanosmartinsi* (Fraiha & Ward, 1980) (DANTAS-TORRES, 2009). Para o ser humano as principais espécies de flebotomíneos associadas com a transmissão de leishmânias dermatópicas são: *L. (N.) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912); *L. (N.) neivai* (Pinto, 1926); *L. (N.) whitmani*; *L. (N.) umbratilis* Ward & Fraiha, 1977; *L. (N.) flaviscutellata* (Mangabeira, 1942); *L. (N.) antunesi* (Coutinho, 1939); *L. migonei* (França, 1920); *L. (P.) fischeri* (Pinto, 1926); *L. (P.) pessoai* (Coutinho & Barretto, 1940); *L. (P.) wellcomei*; *L. (P.) complexa* (Mangabeira, 1941); *L. (P.) ayrozai* (Barretto & Coutinho, 1940); *L. (P.) paraensis* (Costa Lima, 1941); *L. (P.) amazonensis* (Root, 1934); *L. (P.) hirsuta hirsuta* (Mangabeira, 1942); *L. (Trichophoromyia) ubiquitous* (Mangabeira, 1942); *L. (L.) gomezi*; *L. (Viannamyia) tuberculata* (Mangabeira, 1941) (RANGEL & LAINSON, 2009).

Para a leishmaniose visceral, a espécie *L. (L.) longipalpis* é o vetor comprovado de *L. infantum chagasi* (LAINSON & SHAW, 2005) e *L. (L.) cruzi* (Mangabeira, 1938) tem sido incriminado como transmissor em alguns municípios da região Centro-Oeste (SANTOS *et al.*, 1998).

Além das leishmânias, algumas espécies de flebotomíneos podem estar envolvidas na transmissão de outros tripanossomatídeos [*Lutzomyia (Evandromyia) pinottii* (Damasceno & Arouck, 1956); *L. rorotaensis* (Floch & Abonnenc, 1944); *L. umbratilis*; *L. (N.) anduzei* (Rozeboom, 1842)], bactérias (*L. verrucarum*), vírus (*L. carrerai carrerai*) e outros protozoários como o *Plasmodium* [*L. vexator* (Coquillet, 1907)] (SHAW *et al.*, 2003).

1.4. Métodos utilizados para captura de flebotomíneos

As pesquisas com flebotomíneos, principalmente adultos, foram impulsionadas após a incriminação de algumas espécies como transmissoras de espécies de *Leishmania* (SHERLOCK, 2003). Alguns destes estudos visam o registro de espécies para uma determinada área, aliados a um conhecimento de fauna, bem como a busca por infecção natural por protozoários ou vírus. Independente do objetivo de um estudo proposto, o primeiro procedimento refere-se a busca de um método de captura a ser utilizado. Para isso existem armadilhas que são instaladas somente em área de mata ou peridomicílio, mas raramente em intradomicílio, ou mesmo que possam ser instaladas nos três ambientes

(MAROLI *et al.*, 1997), as quais devem ter como fonte de atração uma fonte luminosa, aliada ou não com uma isca animal. O tempo de instalação varia de acordo com o equipamento e escolha do local. A **Tabela 1** apresenta alguns dados encontrados na literatura referentes ao uso de armadilhas na captura de flebotomíneos adultos. A armadilha a ser utilizada dependerá da pergunta que se quer responder e muitas vezes se baseia no conhecimento prévio dos mecanismos de atração do aparelho, bem como da fauna flebotomínica a ser estudada.

- **Isca Humana**- É, provavelmente, a forma mais antiga de capturar insetos hematófagos, incluindo flebotomíneos. Atualmente o termo utilizado é atração humana e consiste em expor uma parte do corpo para o pouso do inseto e posterior captura. A captura é feita com o capturador de Oliveira Castro sugando o inseto com a boca enquanto esse pica (**Fig. 1A**). É considerado um método passivo e direcionado principalmente para fêmeas antropofílicas que desejam fazer hematofagia. Por problemas éticos, esse método de captura não é aceito pela Organização Mundial de Saúde e, conseqüentemente, vetado pelo Ministério da Saúde, uma vez que a pessoa exposta à picada do inseto está sujeita a adquirir as leishmanioses (SHERLOCK & PESSÔA, 1964; MAROLI *et al.*, 1997; VILELA *et al.*, 2003).

- **Busca ativa**- A busca ativa consiste na aspiração de flebotomíneos com o capturador de Castro, uma pessoa utilizar o aparato para aspirar flebotomíneos em troncos de árvores, buracos de rochas e ainda sobre parede de domicílios e abrigos de animais (**Fig. 1B**). É um método muito simples e que apresenta bons resultados, os quais fornecem valiosas informações sobre possíveis criadouros naturais de algumas espécies de flebotomíneos. Essa busca deve ser feita a qualquer hora do dia, mas principalmente, antes do sol nascer quando os insetos se encontram em repouso nesses locais. No peridomicílio devem-se fazer aspirações em anexos, como galinheiros e chiqueiros. No domicílio, em paredes externas e internas das casas. Apresenta algumas desvantagens como não permitir captura de grande quantidade de insetos e podendo haver a inalação de poeira ou microorganismos (SHERLOCK & PESSÔA, 1964; MAROLI *et al.*, 1997; VILELA *et al.*, 2003).

- **Cartão Adesivo**- consiste de papel impregnado com substância na qual o inseto fica aderido quando pousa. Pode ser confeccionado em um papel (folha tipo A4 branca) untado com óleo de rícimo e fixado por uma haste de madeira. Pode ser colocado em posição horizontal, vertical ou inclinado, onde se suspeita encontrar flebotomíneos (**Fig. 1C**). Essas folhas podem ser utilizadas, como em um varal, dentro de residências e em anexos domiciliares. A retirada dos insetos desses cartões deve ser feita com cuidado para não danificar os espécimes (SHERLOCK & PESSÔA, 1964; MAROLI *et al.*, 1997; VILELA *et al.*, 2003).

- **Armadilhas automáticas luminosas [CDC (ou HP), Falcão e New Jersey]**- utilizam a luz (incandescente ou ultravioleta) como fonte de atração para flebotomíneos. As três armadilhas são ditas ativas, pois utilizam uma ventoinha (ventilador) para sucção dos insetos que são direcionados para um saco ou pote coletor (**Figs. 1D e 1E**). A armadilha de New Jersey pode ser instalada ao nível do solo ou acima deste. Para as outras duas, preconiza-se instalá-las a 1,5 m do solo. Podem ser colocadas no interior de residências ou em anexos domiciliares e ainda em área de mata, incluindo copas de árvores, podendo ficar ligadas por, geralmente, 12 horas em uma única noite. São armadilhas que utilizam fontes de energia (pilhas ou baterias de moto no Brasil), selecionam espécies fototrópicas de flebotomíneos, mas podem danificar os espécimes que passam, na CDC e na New Jersey, obrigatoriamente, pelas hélices da ventoinha (SHERLOCK & PESSÔA, 1964; MAROLI *et al.*, 1997; VILELA *et al.*, 2003).

- **Shannon, Damasceno e Malaise**- são armadilhas que apresentam em comum o fato de serem confeccionadas por pano e serem instaladas em área de mata, porém com algumas particularidades. A armadilha ou barraca de Shannon, como o nome já diz, consiste em uma estrutura na qual um indivíduo, com uma lanterna, suga os insetos que pousam nas paredes com um capturador (**Fig. 1F**). Pode utilizar como fonte de atração tanto a luz como uma isca animal ou o ser humano, o que não é recomendado por questões éticas. A armadilha de Damasceno consiste em um pano aberto em uma das faces (**Fig. 1G**). Assim como na Shannon um indivíduo se posiciona embaixo dela com uma lanterna e um capturador, porém é direcionada para possíveis criadouros e/ou abrigos, como troncos de árvores. Com a armadilha posicionada, perturba-se o local de coleta com a mão e os flebotomíneos que pousam na parede interna da armadilha são capturados. A Malaise é uma armadilha de interceptação de vôo e os insetos são atraídos pelas cores preta e/ou branca do pano (**Fig. 1H**). É muito generalista, atraindo todo tipo de inseto e os resultados na literatura com essa armadilha não são conclusivos sobre sua eficiência (SHERLOCK & PESSÔA, 1964; MAROLI *et al.*, 1997; VILELA *et al.*, 2003). São direcionados para um pote, contendo álcool 70% que preserva os insetos, podendo ficar instalada por um longo período de tempo em campo, dependendo do objetivo do estudo.

- **Disney**- utiliza como fonte de atratividade uma isca animal que fica no centro da armadilha (**Fig. 1I**). As fêmeas ao fazerem a hematofagia, abandonam o vertebrado e pousam na superfície de alumínio da armadilha a qual é untada com um óleo vegetal. São retiradas com o uso de um pincel.

Tabela 1- Tipos de armadilhas utilizadas para captura de flebotomíneos.

Armadilha (Autor)	Funcionamento	Fonte de atração	Local de instalação	Objetivo	Especificidade	Autores
CDC (Sudia & Chamberlain, 1962) ou HP (Pugedo <i>et al.</i> , 2005)	Ativa	Luz/Coloração	I/P/M/C	LF/IN/ET	Generalista	REBÊLO <i>et al.</i> (1999), MISSAWA & DIAS (2007), NASCIMENTO <i>et al.</i> (2007)
New Jersey (Mulhern, 1942)	Ativa	Luz	I/P	LF/ET	Generalista	SOUZA <i>et al.</i> (2009a)
Shannon (Shannon, 1939)	Passiva	Luz/Coloração/Odor	P/M	LF/IN/ET	Generalista	PÉREZ <i>et al.</i> (1988); GALATI <i>et al.</i> (2001)
Disney (Disney, 1966)	Passiva	Odor	M	LF/IN	Específica	AGUIAR <i>et al.</i> (1996); DORVAL <i>et al.</i> (2007)
Damasceno (Damasceno, 1955)	Passiva	Luz/Coloração	M	LF/IN/ET	Específica	AGUIAR <i>et al.</i> (1996)
Busca Ativa	Ativa	NA	I/P/M	IN/ET	Generalista	SILVA <i>et al.</i> (2004); VIVERO <i>et al.</i> (2009)
Isca Humana ou Atração Humana	Passiva	Odor	P/M	LF/IN/ET	Específica	DAVIES <i>et al.</i> (1995); GALATI <i>et al.</i> (2006)
Malaise (Malaise, 1937)	Passiva	Coloração	M (aberta)	LF/ET	Generalista	ANDRADE FILHO <i>et al.</i> (2008)
Cartão Adesivo	Passiva	Coloração	I/P/M	LF	Generalista	THATCHER & HERTIG (1966)
Falcão (Falcão, 1981)	Ativa	Luz	I/P/M	LF/IN/ET	Generalista	AZEVEDO & RANGEL (1991); AZEVEDO <i>et al.</i> (1996); TEODORO <i>et al.</i> (2003)

NA– Não aplicável; **I**– intradomicílio/ **P**– peridomicílio/ **M**– área de mata/ **C**– cavernas.

LF– levantamento de fauna/ **IN**– infecção natural/ **ET**– estudos taxonômicos.

Passiva: não apresenta aparato de sucção (ex. ventilador).

Ativa: apresenta aparato de sucção.

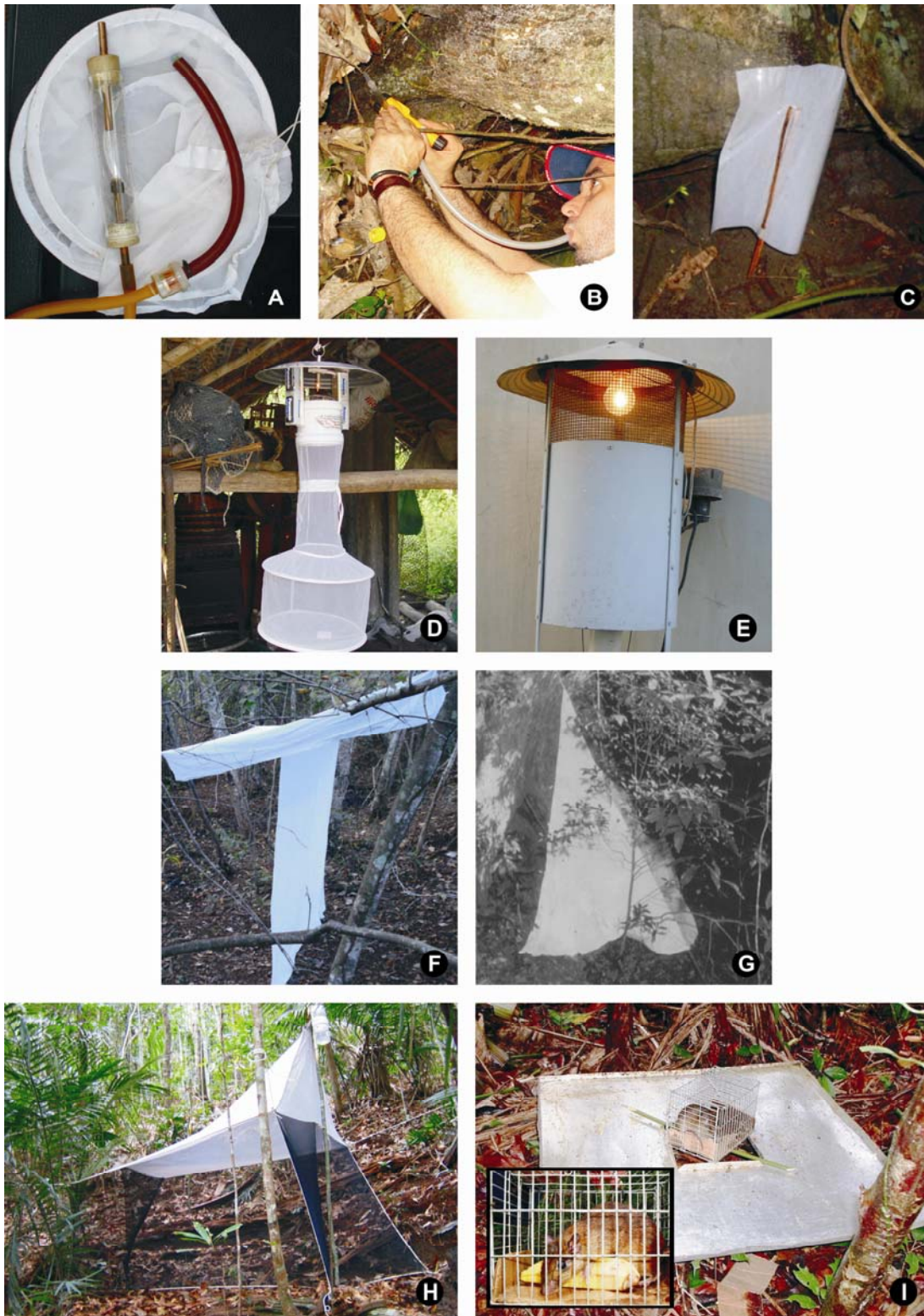


Figura 1- Métodos de captura de flebotomíneos: **A)** capturador de Castro; **B)** busca ativa; **C)** cartão adesivo; **D)** armadilha luminosa CDC (modelo HP); **E)** armadilha de New Jersey; **F)** armadilha de Shannon; **G)** armadilha de Damasceno; **H)** armadilha Malaise; **I)** armadilha de Disney (detalhe de um roedor usado como isca).

Algumas limitações se devem ao fato de ser seletiva para as espécies que são atraídas pela isca utilizada, a maioria dos espécimes capturados são fêmeas e também pode danificar os flebotomíneos na sua retirada (SHERLOCK & PESSÔA, 1964; MAROLI *et al.*, 1997; VILELA *et al.*, 2003).

1.5. Os hidrocarbonetos cuticulares dos insetos de importância médico-veterinária

A superfície do corpo dos artrópodes está coberta por uma cutícula, a qual é produzida em camadas (HADLEY, 1986). A camada mais externa desta cutícula, a epicutícula, é composta de uma mistura de lipídeos os quais são sintetizados por oocinetos e secretada imediatamente após o fluido da muda ter sido reabsorvido e a separação da velha e da nova cutícula ter ocorrido (LOCKEY, 1988). Os lipídeos, sobre a superfície da cutícula, funcionam como uma barreira primária contra a perda de água por evaporação (GIBBS, 1998) e podem estar representados por mais de 100 compostos em um único indivíduo (BLOMQUIST *et al.*, 1987; LOCKEY, 1988). Esses lipídeos e conseqüentemente a cutícula podem se constituir de hidrocarbonetos saturados (de cadeia normal ou ramificada) ou insaturados, ácidos graxos, alcoóis, ésteres, glicerídeos, esteróis e aldeídos (LOCKEY, 1988).

A principal função dos Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) em artrópodos é fornecer sinais de reconhecimento entre dois ou mais indivíduos (HOWARD & BLOMQUIST, 2005). Contudo, apresentam distintas funções e para os insetos, além de evitar a perda de água e proteger contra a penetração de produtos químicos e microorganismos (JACKSON & BLOMQUIST, 1969), desempenham um importante papel na comunicação química intra e interespecífica atuando na atração sexual, como feromônios de alarme, cairomônios e marcadores territoriais (HOWARD & BLOMQUIST, 1982).

A análise de HCCs é uma técnica bioquímica que envolve a determinação de diferenças espécie-específicas nos hidrocarbonetos contidos na camada de cera da cutícula (PHILLIPS *et al.*, 1988). Alguns trabalhos têm mostrado que as análises desses HCCs podem ser utilizadas também para separação de espécies crípticas inseridas em complexos (CARLSON & SERVICE, 1980; MILLIGAN *et al.*, 1986; RYAN *et al.*, 1986; ROSA-FREITAS *et al.*, 1992; MILLIGAN *et al.*, 1993), para observar variações geográficas entre espécies alopátricas (CARLSON & WALSH, 1981; CHEN *et al.*, 1990; PHILLIPS *et al.*, 1990b), separar espécies simpátricas (KAMHAWI *et al.*, 1987) ou mesmo para simples avaliação dos perfis desses compostos na caracterização de espécies (MAHAMAT & HASSANALI, 1998; JUÁREZ *et al.*, 2002).

Segundo LOCKEY (1991), esses compostos podem variar entre espécies distintas, entre machos e fêmeas de uma mesma espécie e entre populações de uma espécie, caracterizando, quimio-taxonomicamente, diversos grupos de insetos.

De acordo com PHILLIPS & MILLIGAN (1986), uma importante vantagem destas análises quando comparada a técnicas moleculares (DNA e isoenzimas) é o fato dos insetos vindos do campo poderem ser acondicionados, individualmente, em tubos de vidro ou envelope de papel e armazenados durante longo período de tempo na ausência de nitrogênio ou álcool. Pode se utilizar, o método de extração, mesmo para espécimes depositados em museus. A quantificação e qualificação dos HCCs podem ser detectadas, sem que haja dano do inseto (PHILLIPS *et al.*, 1986). Com isso após a extração, o exemplar ainda pode ser utilizado para análises morfológicas e morfométricas, comparando-se assim, diferentes ferramentas taxonômicas.

Na década de 70, foram realizados os primeiros estudos para se conhecer a composição química da cutícula de insetos. A fácil extração da camada de cera, bem como análises, outrora pouco mais complicadas (ex. cromatografia) proporcionaram então a caracterização de HCCs (PHILLIPS *et al.*, 1988). As revisões feitas por BLOMQUIST & JACKSON (1979), LOCKEY (1980) e HOWARD & BLOMQUIST (1982) fornecem informações desses primeiros trabalhos. Em 1978, LOCKEY direcionou esforços para esclarecer o “status” taxonômico de espécimes de insetos, observando relações evolutivas entre algumas espécies. No entanto, foi notado que espécies distintas poderiam apresentar perfis muito próximos de hidrocarbonetos. Tal fato dificultaria o uso de HCCs para análises cladísticas, porém poderiam oferecer diferenças quantitativas nos hidrocarbonetos de espécies muito próximas.

CARLSON & SERVICE (1979) foram os primeiros a utilizar os HCCs para identificar espécies crípticas de dípteros, no caso, pertencentes ao gênero *Anopheles* Meigen, 1818 (*A. gambiae s.s.* Giles, 1902 de *A. arabiensis* Patton, 1905). Posteriormente, a técnica veio a ser utilizada como uma nova ferramenta quimiotaxonômica para distinguir espécies crípticas de diversos insetos hematófagos (SERVICE, 1988) e a importância da mesma para identificação de dípteros de importância médica foi apresentada por PHILLIPS *et al.* (1988). Os estudos demonstraram que esses compostos parecem variar de acordo com a espécie (GEBRE-MICHAEL *et al.*, 1994), entre mesmas espécies provenientes de distintos locais (PHILLIPS *et al.*, 1990b), entre espécies crípticas (CARLSON & SERVICE, 1980) e entre mesmas espécies com diferentes idades (HORNE & PRIESTMAN, 2002). O contrário tem

sido observado entre os sexos ou quando comparados indivíduos de colônia e de campo (CAPUTO *et al.*, 2005).

Hidrocarbonetos Cuticulares, geralmente, representam os lipídeos epicuticulares mais abundantes e têm sido caracterizados para vários táxons de insetos, incluindo algumas espécies do gênero *Aedes* Meigen, 1818 (KRUGER *et al.*, 1991; KRUGER & PAPPAS, 1993; PAPPAS *et al.*, 1994; HORNE & PRIESTMAN, 2002), *Anopheles* (PHILLIPS *et al.*, 1990c; MILLIGAN *et al.*, 1993; CARLSON *et al.*, 1997), *Culex* Linnaeus, 1758 (CHEN *et al.*, 1990), *Simulium* Letreile (1802) (PHILLIPS *et al.*, 1985; MILLEST, 1992); *Glossina* Phillips, 1848 (NELSON & CARLSON, 1986); *Dermatobia* Brauer, 1860 (GULIAS-GOMES *et al.*, 2008); *Tabanus* Linnaeus, 1758 (HOPPE *et al.*, 1990); *Triatoma* Laporte, 1832 (JUÁREZ *et al.*, 2002) e para os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (GEBRE-MICHAEL *et al.*, 1994; MAHAMAT & HASSANALI, 1998). Para a identificação desses compostos, utiliza-se a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) distinguindo e identificando espécies crípticas inseridas em complexos (CARLSON & SERVICE, 1980; PHILLIPS *et al.*, 1985; MILLIGAN *et al.*, 1986; RYAN *et al.*, 1986), utilizando esses HCCs como “caracteres taxonômicos” (CARLSON & SERVICE, 1980; MILLIGAN *et al.*, 1993).

Embora exista um grande número de publicações com esses lipídeos cuticulares para insetos sociais, poucas destas são encontradas referentes a insetos solitários, como culicídeos (HORNE & PRIESTMAN, 2002). As análises HCs, para esse grupo de insetos, têm sido aplicadas como uma ferramenta para separar espécies crípticas comparando-se os perfis dos picos cromatográficos, como pode ser observado para *Anopheles culicifacies* Giles, 1910 e para o complexo *A. maculipennis* Meigen, 1818, o qual está compreendido por 15 espécies (MILLIGAN *et al.*, 1986; PHILLIPS *et al.*, 1990c). Quando essa técnica está acoplada a um espectrômetro de massas, esses compostos podem ser identificados e caracterizados, como observado para as seis espécies que compõe o complexo *A. maculatus* Theobald, 1901 (KITAYAPONG *et al.*, 1993).

Perfis de HCCs de anofelinos têm sido caracterizados também para os complexos *A. quadrimaculatus* Say, 1824, vetor de malária na América do Norte (CARLSON *et al.*, 1997) e, particularmente, para *A. gambiae*, vetor da malária na África, para o qual alguns estudos foram conduzidos e demonstraram a possibilidade do uso desses compostos como caracteres taxonômicos para diferenciar adultos de espécies inseridas no complexo (CARLSON & SERVICE, 1980) ou oferecendo direcionamentos para uma possível identificação de feromônios sexuais (MILLIGAN *et al.*, 1993; POLERSTOCK *et al.*, 2002).

CAPUTO *et al.* (2005) não observaram diferenças qualitativas de HCCs em *A. gambiae* de amostras de machos e fêmeas provenientes de laboratório, ou mesmo entre diferentes grupos de idades (0-16 dias), e entre indivíduos provenientes de campo. No entanto, os mesmo autores, demonstraram que a quantidade de compostos variava para as amostras e destacaram que a correta determinação da idade do vetor *A. gambiae s.s.*, forneceria valiosas informações para a epidemiologia da malária e na ação de efetivas estratégias de controle do mosquito. Ainda nesse contexto, não foram observadas diferenças significativas na produção de HCCs de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, de indivíduos provenientes de uma colônia antiga, nem entre machos e fêmeas da espécie (HORNE & PRIESTMAN, 2002). Para *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 foi observado que machos e fêmeas diferem qualitativamente seus HCCs e estes possuem diferentes perfis quando analisados para indivíduos da espécie proveniente de diferentes regiões. No entanto, mudanças quantitativas na abundância relativa desses HCCs podem ter sido influenciadas pela idade dos culicídeos (CHEN *et al.*, 1990). Essa variação também já foi observada entre os sexos de *A. gambiae s.l.*, a qual obteve mais sucesso para separação de machos que de fêmeas (CARLSON & SERVICE, 1980). Análises de CG-EM mostraram diferenças quantitativas nos perfis de HCCs de três espécies de mosquitos, com a mesma idade, na Austrália. Os compostos foram característicos para cada espécie, com grande de similaridade entre *A. aegypti* e *Ochlerotatus vigilax* (Skuse, 1889) (Culicinae) quando comparadas essas espécies com *A. farauti* Laveran, 1902 (Anophelinae) (HUGO *et al.*, 2006).

A composição dos HCCs pode variar entre diferentes espécies, entre os sexos e entre diferentes instares larvais de uma mesma espécie (LOCKEY, 1991). Todas as espécies de flebotomíneos estudadas até o momento mostraram distintos perfis de hidrocarbonetos, o que tem permitido o reconhecimento dessas espécies (**Tab. 2**). RYAN *et al.* (1986) estabeleceram perfis cromatográficos característicos para fêmeas de *L. wellcomei* e *L. complexa* e demonstraram que estes poderiam identificar 97% das fêmeas, com confiança. Essa distinção de fêmeas isomórficas, baseada na análise de HCCs, já foi demonstrada para outras espécies de flebotomíneos (GEBRE-MICHAEL *et al.*, 1994). Um estudo de HCCs com exemplares de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, proveniente da região de Cévennes (Sudeste da França) revelou a presença de duas populações, uma silvestre e uma peridoméstica (KAMHAWI *et al.*, 1987), assim como variações intraespecíficas entre populações de *Phlebotomus perfeliewi* Parrot, 1930 de distintas regiões (PHILLIPS *et al.*, 1990b). As espécies *L. carrerai carrerai* e *L. yucumensis* podem ser separadas pelos perfis de HCCs, sendo essa separação também sustentada por caracteres morfológicos e isoenzimáticos (PHILLIPS *et al.*, 1990a). A

separação de espécies de *Phlebotomus* no Kênia, usando caracteres morfométricos, corroborara os perfis cromatográficos de cada indivíduo, embora observado que estes variavam entre as espécies estudadas (MAHAMAT & HASSANALI, 1998).

A procura de mais caracteres taxonômicos (GALATI, 1995) e de métodos para a identificação (READY & RANGEL, 2003) e classificação (GALATI, 2003a) dos flebotomíneos têm sido uma constante, notadamente por causa de possíveis espécies crípticas. O conhecimento sobre a biologia dos flebotomíneos ainda é limitado quando comparado ao de outros insetos hematófagos (culicídeos, simulídeos, glossínídeos) e isto tem um considerável impacto taxonômico. Sem uma ampla base de conhecimento sobre o ciclo de vida e pressões evolutivas decorridas deste, o acesso a variações a serem observadas (morfológicas, comportamentais ou químicas) se torna muito difícil, porém representam um amplo campo para pesquisas futuras sobre a taxonomia e epidemiologia do grupo (LANE, 1986).

1.6. Novas perspectivas para a captura de flebotomíneos

O Ministério da Saúde preconiza que ações para o controle e monitoramento de flebotomíneos transmissores de leishmânias causadoras de LTA ou LVA sejam direcionadas para os locais onde ocorrem casos de leishmanioses. Particularmente para LVA faz-se ainda o levantamento entomológico mesmo em municípios sem casos humanos ou onde esses sejam silenciosos. Essas ações vão desde a limpeza de peridomicílios e construção de galinheiros ou pocilgas distantes de residências, ao uso de inseticidas químicos no ambiente ou de coleiras para cães (MS, 2007; AMÓRA *et al.*, 2009). Armadilhas são utilizadas para o monitoramento de espécies vetoras, antes e após ações de educação implementadas por Secretarias de Saúde locais, ou para reconhecimento de fauna.

Tabela 2- Espécies de flebotomíneos do Velho e do Novo Mundo com hidrocarbonetos cuticulares caracterizados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) ou por Cromatografia Gasosa (CG).

Espécies	Procedência	Importância	Métodos	Resultados	Autores
<i>Lutzomyia wellcomei</i> e <i>L. complexa</i> (série <i>squamiventris</i>)	Serra dos Carajás, Pará, Brasil	<i>L. wellcomei</i> é o principal transmissor de <i>L. braziliensis</i> na região	(CG/EM)	Separação das fêmeas das espécies morfologicamente semelhantes	RYAN <i>et al.</i> (1986)
<i>Phlebotomus ariasi</i>	Cévennes, França	Principal transmissor de <i>L. infantum</i> no Mediterrâneo	(CG/EM)	Separação de duas populações da espécie: uma silvestre e outra doméstica	KAMHAWI <i>et al.</i> (1987)
<i>L. carrerai carrerai</i> e <i>L. yucumensis</i> (série <i>panamensis</i>)	Alto Beni, Bolívia	Espécies consideradas vetores de <i>L. braziliensis</i> no país	(CG)	Separação das fêmeas das espécies e implicação na epidemiologia da doença	PHILLIPS <i>et al.</i> (1990a)
<i>P. perfiliewi</i>	Costas Adriática, Tyrreniana e Trans-Apennine, Itália	Considerado principal transmissor de espécies de <i>Leishmania</i> no país	(CG/EM)	Varição intraespecífica entre a espécie coletada nas três regiões	PHILLIPS <i>et al.</i> (1990b)
<i>P. aculeatus</i> , <i>P. elgonensis</i> , <i>P. duboscqi</i> , <i>P. martini</i> , <i>P. pedifer</i> , <i>Sergentomyia africana</i> , <i>S. antennatus</i> , <i>S. gamihami</i> , <i>S. ingrami</i> e <i>S. schweyzi</i>	Distritos de Mt. Elgon, Kimilik, Marigat e Tseikuru, Kênia	Algumas são consideradas transmissoras de <i>Leishmania</i> (<i>P. pedifer</i>) e outras espécies sem importância epidemiológica (<i>P. aculeatus</i>)	CG	Os picos cromatográficos mostraram diferenças quantitativas e qualitativas para as espécies; diferença intra e interespecífica entre os compostos produzidos por machos e fêmeas; correspondência entre a morfologia e a caracterização dos HCCs das espécies (exceção: <i>P. duboscqi</i>)	MAHAMAT & HASSANALI (1998)
<i>P. (Synphlebotomus) martini</i> e <i>P. (S.) celiae</i>	Insetos de ambas as espécies provenientes de laboratório e de campo (Aba Roda, Sul da Etiópia)	As espécies acontecem em simpatria e estão envolvidas na transmissão de <i>L. donovani</i> , agente da LV	CG	Separação foi observada entre os indivíduos, de campo e de laboratório. Foi possível distinguir entre as fêmeas isomórficas, das duas espécies	GEBRE-MICHAEL <i>et al.</i> (1994)

A confecção de uma armadilha para flebotomíneos deve ser baseada no comportamento destes insetos, como fototropismo positivo, hematofagia e geotropismo negativo, e pode envolver captura manual ou aparatos com e sem atraentes (MAROLI *et al.*, 1997).

Armadilhas luminosas podem ser usadas em campo como forma de substituir o problema ético da exposição de seres humanos, como iscas. Embora o uso destas elimine o problema da atração humana, algumas espécies de flebotomíneos são altamente antropofílicas e não fototrópicas (ALEXANDER *et al.*, 1995; TRAVI *et al.*, 1998), enquanto outras parecem ser mais fototrópicas que antropofílicas (DAVIES *et al.*, 1995). Os trabalhos de campo avaliando a resposta visual de flebotomíneos de comportamento crepuscular ou noturno, como no caso de *L. longipalpis s.l.*, são pouco conhecidos, embora se saiba que ambos os sexos são atraídos por luz artificial emitida por armadilhas, como a CDC. A sensibilidade óptica espectral de *L. longipalpis s.l.* é similar a de *Aedes aegypti* com máxima amplitude na região de 360 a 490 nm, entre luz UV e azul-verde-amarela. Estudos demonstraram que *L. longipalpis s.l.* pode distinguir cores e discriminar comprimentos de onda de diferentes intensidades, o que teria importantes implicações no desenho de armadilhas luminosas (MELLOR & HAMILTON, 2003).

As armadilhas luminosas são frequentemente utilizadas em programas nacionais ou regionais de monitoramento e controle de flebotomíneos nas áreas endêmicas de leishmanioses no Brasil e estudos com essas armadilhas demonstram a eficiência na captura desses insetos (MS, 2007). Porém, elas apresentam uma baixa operacionabilidade em rotinas de campo das equipes de zoonoses (utilizam pilhas tipo “D” para manter a iluminação e o mecanismo de sucção, com durabilidade menor do que 1 dia), custo elevado de uso ou manutenção. Ao mesmo tempo, vale mencionar que o uso de pilhas e baterias ocasiona problemas de suporte, perdas, roubo, descarte na natureza, além de tornar o custo oneroso.

Atualmente, no Brasil, testes realizados em laboratório e em campo têm buscado o aperfeiçoamento de armadilhas luminosas na captura de espécies de flebotomíneos. Alguns desses trabalhos não visam a substituição da fonte luminosa das armadilhas, mas buscam torná-las mais específicas e eficientes (ANDRADE *et al.*, 2008; BRAY *et al.*, 2009). Estudos abordando a atração visual por fontes luminosas e através de feromônios trazem também novas perspectivas de armadilhas para a captura

do vetor, sugerindo até mesmo o uso de feromônios sintéticos como uma possível ferramenta para o controle de *L. longipalpis s.l.* (BRAY *et al.*, 2009, 2010).

A busca de novos métodos para monitoramento de flebotomíneos deve ser baseada na resposta olfativa e, principalmente, visual desses insetos. Desenvolver e testar protótipos de armadilhas a serem utilizadas na busca de espécies antropofílicas e fototrópicas, como *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani*, forneceria subsídios para o monitoramento dessas espécies vetoras as quais são encontradas no intra e peridomicílio e em áreas silvestres (LAINSON & RANGEL, 2005; COSTA *et al.*, 2007).

2. Justificativa

Atualmente no Brasil, duas espécies de flebotomíneos têm sido estudadas sobre o ponto de vista de pertencer a um complexo de espécies: *L. (N.) whitmani* e *L. (L.) longipalpis s.l.* A primeira atua como vetor de *Leishmania braziliensis* Vianna, 1911 e *Leishmania shawi* Lainson, Braga, Póvoa, Ishikawa & Silveira, 1989 e a segunda como vetor de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Chagas, 1937, responsáveis por causar formas de leishmaniose tegumentar e visceral, respectivamente (LAINSON & SHAW, 2005; RANGEL & LAINSON, 2003, 2009). Estudos morfológicos, morfométricos, moleculares, químicos e comportamentais com *L. longipalpis s.l.* são vastos na literatura (ver BAUZER *et al.*, 2002, 2007; LAINSON & RANGEL, 2005). Para *L. whitmani* os trabalhos são focados na ecologia e epidemiologia da espécie, no entanto poucos são os estudos que buscam entender e discutir o “status” taxonômico da espécie. Através de dados biológicos, epidemiológicos, moleculares e taxonômicos o **Capítulo I** fornece uma revisão de literatura, desde a descrição da espécie, compilando trabalhos com distintos objetivos e controversas posições a respeito da espécie pertencer ou não a um complexo. Citando LAINSON (1988): “*Lutzomyia whitmani é um complexo de espécies ou uma espécie de flebotomíneos com ampla capacidade de adaptação ao ambiente?*”.

Estudos de ecologia química para flebotomíneos têm sido voltados principalmente para a espécie *L. longipalpis s.l.* e toda a discussão foi gerada quando MANGABEIRA (1969) observou diferenças morfológicas (manchas claras) nos tergitos abdominais III e IV de machos provenientes do Pará e do Ceará. Além dessas variações o autor mencionou que a espécie poderia ser encontrada em condições ecológicas distintas, levantando a suspeita de que seriam diferentes espécies. Posteriormente, estas

manchas foram confirmadas como dois fenótipos (uma mancha ou duas manchas) e variações nos seus tamanhos podiam ser observadas no tergito III (WARD *et al.*, 1983). Essas estruturas são responsáveis pela liberação de feromônios, embora não representem isolamento reprodutivo entre indivíduos de diferentes localidades (ARAKI *et al.*, 2009). A simpatria entre essas formas é comum em todo o território brasileiro e até a década de 80 conheciam-se somente essas variações. A caracterização de *L. longipalpis s.l.* como um complexo de espécies, tem sido realizada por meio da identificação dos feromônios sexuais liberados por glândulas subcuticulares presentes nessas manchas terciais, utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) (PHILLIPS *et al.*, 1988; HOWARD & BLOMQUIST, 2005). Porém, pouco se conhece sobre a composição de HCCs em flebotomíneos, embora se saiba que feromônios de algumas espécies são da classe dos terpenos, os quais por sua vez são HCCs (ALLINGER *et al.*, 1978). A literatura específica, muitas vezes não oferece uma metodologia padronizada de extração desses compostos e quando usada somente a CG, as diferenças químicas entre espécies crípticas são baseadas somente nos perfis cromatográficos (GEBRE-MICHAEL *et al.*, 1994; MAHAMAT & HASSANALI, 1998). Diante desta dificuldade para reprodutibilidade da técnica de CG, bem como a falta de conhecimento desses compostos para *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani*, no **Capítulo II** descreve-se uma metodologia padronizada de identificação e, principalmente, extração e leitura desses compostos caracterizados por CG para populações de *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani* (machos e fêmeas) procedentes de diferentes localidades do Brasil. Essa caracterização química poderia oferecer indícios de possíveis feromônios para machos de *L. whitmani*, os quais depois de sintetizados e confirmados por testes comportamentais viriam a ser utilizados em armadilhas para a captura da espécie, como já vem sendo realizado para *L. longipalpis s.l.* (BRAY *et al.*, 2009, 2010).

Aliado a estudos de ecologia química dessas espécies o uso de armadilhas pouco seletivas atualmente representa algumas das maiores dificuldades em se estudar o grupo. O pouco conhecimento sobre os locais de desenvolvimento das formas imaturas foca as ações de monitoramento e controle para os insetos adultos. Porém, devido a sua sazonalidade, biologia e ecologia que variam de região para região ou entre localidades em uma mesma região, uma das grandes limitações do uso de armadilhas, que embora ofereçam excelentes resultados para o estudo de fauna, é o fato de não poderem ser amplamente utilizadas como métodos de monitoramento ou controle (ALEXANDER,

2002; AMÓRA *et al.*, 2009). Baseado nas premissas propostas por MAROLI *et al.* (1997) o **Capítulo III** apresenta um trabalho realizado no Pará onde modificações na armadilha BG-Sentinela[®] visou potencializar a captura de flebotomíneos, utilizando-se de diversas variáveis (ex. fonte luminosa, altura, posição da abertura de sucção, cairomônio), uma vez que essa armadilha apresenta resultados promissores com culicíneos e anofelinos (KRÖCKEL *et al.*, 2006; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2006, 2007, GAMA, 2009) e não se conhece sua possível eficácia para flebotomíneos.

Armadilhas luminosas que apresentassem fácil operacionalidade, ausência de fontes de energia, integridade dos insetos capturados e, principalmente, baixo custo na captura de espécies de flebotomíneos transmissoras de leishmânias, seria uma valiosa ferramenta a ser utilizada na vigilância entomológica empregada pelos órgãos públicos de saúde, além da aplicação dessa armadilha em nível acadêmico para diversos estudos com esses insetos. O **Capítulo IV** descreve alguns testes utilizando-se do feromônio sexual sintético 9-metil-germacreno-B e luz química, realizados em Minas Gerais e na Bahia, que permitiram desenvolver e testar protótipos de uma armadilha, que conjuga as características acima para as espécies *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani*.

Diante do exposto, o presente trabalho visa fornecer subsídios, aliados a dados morfológicos e moleculares realizados por outros pesquisadores, à caracterização dos HCCs de *L. whitmani* como pertencente ou não a um complexo de espécies. Supõe-se que a epidemiologia da leishmaniose visceral possa estar ligada ao fato de populações de *L. longipalpis s.l.* serem caracterizadas como espécies crípticas (LAINSON & RANGEL, 2005). Utilizando a análise desses HCCs, essa técnica poderia vir a somar os esforços em caracterizar *L. whitmani* como um complexo e com isso entender melhor o comportamento vetorial dessa espécie e, conseqüentemente, a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Brasil. Além disso, a busca de uma armadilha para flebotomíneos de baixo custo e eficiência comprovada forneceria uma nova perspectiva ao monitoramento de espécies, especialmente àquelas relatadas no presente trabalho.

3. Objetivo geral

Desenvolver estudos de ecologia química em laboratório e campo para as espécies *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani*, provenientes de diferentes regiões do Brasil.

3.1. Objetivos específicos

- 1- Apresentar uma revisão discutindo a posição taxonômica, a biologia e a ecologia de *L. whitmani*;
- 2- Padronizar a técnica de Cromatografia Gasosa para análise de hidrocarbonetos cuticulares para flebotomíneos, utilizando as espécies *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani* provenientes de diferentes regiões do Brasil;
- 3- Testar a armadilha BG-Sentinela[®] para a captura de flebotomíneos e observar as respostas da espécie *L. longipalpis s.l.*;
- 4- Desenvolver uma armadilha para a captura de flebotomíneos, com ênfase nas espécies *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani*.

Capítulo I

Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), o mais importante vetor de Leishmaniose Cutânea no Brasil: um complexo de espécies crípticas?

Resumo

ANDRADE, Andrey José de. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), o mais importante vetor de Leishmaniose Cutânea no Brasil: um complexo de espécies crípticas?

O objetivo do presente artigo é apresentar uma revisão de alguns aspectos relevantes sobre a ecologia, biologia e epidemiologia de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, o mais importante transmissor de leishmaniose tegumentar americana no Brasil. Por possuir comportamento distinto nas diversas regiões geográficas e por se associar à transmissão de duas espécies leishmânicas dermatrópicas, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (V.) shawi*, *L. whitmani*, tem sua identidade taxonômica discutida, com base na hipótese, anteriormente levantada, de que seria um complexo de espécies crípticas. Nesta revisão, esta hipótese é colocada, considerando não apenas as evidências na literatura que sugerem a existência de três diferentes linhagens geográficas, mas também análises morfológicas, morfométricas e moleculares das diferentes populações. Alguns dados que contestam a hipótese do complexo, admitindo que a espécie seja dotada de competência para se adaptar ao ambiente drasticamente modificado, inclusive potencializando sua competência vetorial, são discutidos.

1. Introdução

A espécie *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* foi descrita a partir de exemplares procedentes de Ilhéus, Estado da Bahia, Brasil como *Flebotomus whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) e sua biologia foi estudada pela primeira vez por BARRETTO (1941). Esta espécie apresenta ampla distribuição na América do Sul, especialmente no Brasil (MARTINS *et al.* 1978; YOUNG & DUNCAN, 1994; RANGEL & LAINSON, 2003).

Uma recente revisão sobre a distribuição geográfica da espécie no Brasil mostrou que *L. whitmani* tem sido registrada desde a região Amazônica até os Estados da Região Sul (COSTA *et al.*, 2007) estando presente em diferentes coberturas vegetais, passando pela Floresta Amazônica, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica, em ambientes rurais, periferia das cidades e intradomicílios. A espécie desenvolveu hábito antropofílico, além de estar associada a abrigos de animais domésticos de algumas áreas do Nordeste e Sudeste (VEXENAT *et al.*, 1986a; AZEVEDO *et al.*, 1990; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994). Na Região Centro-Oeste, a antropofilia tem sido notada, mas essa prática ainda é exofílica (GALATI *et al.*, 1996), e no Sul tem sido associada a ambientes peridomésticos e silvestres (TEODORO *et al.*, 1998). Na Região Norte, principalmente na Amazônia, foi referida como *L. whitmani s.l.*, pois ainda conserva o hábito silvestre e é incriminada na transmissão de *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* Lainson, Braga, Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira, 1989. Em outras regiões do Brasil, a espécie é incriminada como vetor de *L.(V.) braziliensis* Vianna, 1912 (RANGEL *et al.*, 1996) onde já se encontra adaptada a áreas degradadas e pode ser prevalente e altamente antropofílica (RANGEL & LAINSON, 2003).

As diferenças na biologia da espécie, sua capacidade vetorial e as variações climáticas e ambientais às quais está associada, têm sugerido *L. whitmani* como um complexo de espécies crípticas (LAINSON, 1988; RANGEL *et al.*, 1996). Para alguns autores, entretanto, *L. whitmani* é uma espécie com uma grande capacidade de se adaptar a mudanças ambientais e, conseqüentemente, a novos nichos ecológicos (PETERSON & SHAW, 2003).

O presente trabalho apresenta evidências que discutem a posição taxonômica da espécie *L. whitmani*, bem como outros estudos que a incriminam como a principal espécie de flebotomíneo associada à transmissão de duas espécies de *Leishmania*, responsáveis por casos humanos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil. Dados sobre a espécie são apresentados de forma a promover uma reflexão sobre os fatores associados à sua biologia em todo o território brasileiro.

2. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939)

Em 1934, exemplares de flebotomíneos foram coletados no Estado da Bahia pelo Dr. P.C.A. Coutinho, enquanto trabalhava no Serviço de Febre Amarela, mantido pelo Governo brasileiro em colaboração com a Divisão Sanitária Internacional da Fundação Rockefeller. Posteriormente, em 1939, ele e Dr. J.O. Coutinho, em homenagem ao Dr. Loring Whitman, até então membro daquela fundação, descreveram a espécie *Flebotomus whitmani*, a partir de diversos exemplares machos e fêmeas coletados em Ilhéus (Bahia), sua localidade tipo. Ainda, neste trabalho de descrição, os autores chamaram a atenção para a importância da “armadura bucal” (cibário) na sistemática dos flebotomíneos (ANTUNES & COUTINHO, 1939).

Passados dois anos de sua descrição, algumas observações foram feitas sobre seu ciclo evolutivo. Ressalta-se que já naquela época, a espécie apresentava grande incidência em zonas de alta endemicidade de LTA no Estado de São Paulo, sendo muito antropofílica, sugerida como a possível transmissora onde a doença era registrada (BARRETTO, 1941). As primeiras evidências sobre a biologia desse flebotomíneo em campo foram publicadas ainda na década de 40 (PESSÔA & BARRETTO, 1944) onde foi relatada a sua abundância e antropofilia, além de ter sido encontrada com infecção por flagelados, possivelmente *L. braziliensis*. Sua presença era coincidente com casos de LTA, sendo considerada a principal espécie vetora no Estado de São Paulo.

Hoje esse cenário não é muito diferente. Segundo COSTA *et al.* (2007), *L. whitmani* está amplamente distribuída no Brasil, não sendo registrada somente no Estado de Santa Catarina e essa distribuição seria coincidente com casos de LTA no país. Na América Latina, também ocorre na Guiana Francesa, Peru, Paraguai, Argentina e Suriname (MARTINS *et al.*, 1978; YOUNG & DUNCAN, 1994; RANGEL & LAINSON, 2003).

Estudos realizados no Brasil têm mostrado a distinta ecologia dessa espécie. Aliados à sua capacidade vetorial, sua presença nos mais diversos ambientes, sujeita a interferência de fatores abióticos, sua biologia tem se apresentado distinta de acordo com as condições ambientais (PETERSON & SHAW, 2003; RANGEL & LAINSON 2003; COSTA *et al.*, 2007).

Seus registros são frequentes em áreas silvestres e/ou domiciliares, adaptando-se a todas as modificações ambientais impostas pelo homem (PETERSON & SHAW, 2003). A

plasticidade alimentar a caracterizou como uma espécie oportunista, ainda que de origem silvestre (LAINSON *et al.*, 1979; GALATI *et al.*, 1996).

3. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*: aspectos da biologia e da competência vetorial em diferentes regiões geográficas no Brasil

A biologia e ecologia de *L. whitmani* têm sido apresentadas em diversos trabalhos na literatura, para as cinco regiões geográficas do Brasil (MAYRINK *et al.*, 1979; SHERLOCK *et al.*, 1996; MISSAWA & DIAS, 2008; VILELA *et al.*, 2008). Alguns destes limitam-se apenas a fazer seu registro, sem que haja qualquer discussão, provavelmente devido ao baixo número de espécimes capturados (GOMES *et al.*, 1979; RANGEL *et al.*, 1996; ODORIZZI & GALATI, 2007). Contudo, o conjunto destes trabalhos torna-se importante na medida em que se pode conhecer a distribuição geográfica, seus hábitos, habitats e a sua participação na cadeia epidemiológica da LTA, bem como os ambientes aonde a espécie vem sendo encontrada.

Em geral, mesmo podendo ser coletada em áreas de vegetação primária, claramente com um comportamento de flebotomíneo silvestre, trata-se de uma espécie que também tem sido registrada em grande abundância, para algumas localidades onde possui comprovado hábito antropofílico, podendo ser encontrada tanto no interior das residências, quanto no peridomicílio, junto aos abrigos de animais domésticos revelando notável plasticidade alimentar. Há ainda evidências de que a espécie está associada à áreas com impacto ambiental (RANGEL & LAINSON, 2003; LAINSON & SHAW, 2005).

Iniciando pela região Norte, os estudos realizados em várias áreas de floresta primária no Pará (LAINSON *et al.*, 1979) apontaram que *L. whitmani* se apresentava como uma espécie essencialmente silvestre, o que torna estas populações diferentes das demais que ocorrem em outras regiões no Brasil. Características tais como a alta frequência na copa e sobre a base dos troncos das árvores de grande porte e a pouca tendência para picar o homem, bem como a sua ausência no interior das residências claramente conferem à espécie um perfil silvestre (READY *et al.*, 1986; LAINSON, 1988). As investigações mais recentes, ao mesmo tempo em que sustentam os hábitos silvestres desta espécie (GIL *et al.*, 2003; AZEVEDO *et al.*, 2008), mostram sua capacidade de ocupar áreas impactadas, com profundas alterações ecológicas, como o que se pode observar no Estado de Tocantins (VILELA *et al.*, 2008).

Evidências apontam que na Região Norte do Brasil, *L. whitmani* está associada a veiculação de duas leishmânias dermatóricas: *L. braziliensis*, assim como nas demais regiões geográficas, e *L. shawi*, restrita a Amazônia. Inicialmente, promastigotas do subgênero *Viannia* foram encontradas em espécimes coletados em área de transmissão de *L. (Viannia) guyanensis* Floch, 1954, em Monte Dourado (PA), o que levou à idéia equivocada de que este flebotomíneo juntamente com *L. (N.) umbratilis* Ward & Fraiha, 1977, estariam veiculando este parasito. Posteriormente, uma leishmânia caracterizada como *L. shawi*, isolada de *L. whitmani*, procedente de floresta primária do Estado do Pará, levou a dedução de que o parasito identificado no município de Monte Dourado não seria *L. guyanensis*, o que ratificou definitivamente o papel de *L. whitmani* como transmissor de *L. shawi* (LAINSON *et al.*, 1981; RANGEL *et al.*, 1996; LAINSON & SHAW, 1998).

Nas Regiões Nordeste e Sudeste, o comportamento de *L. whitmani* reflete a adaptação da espécie ao peridomicílio de áreas impactadas, sempre numa clara associação com animais domésticos (especialmente galinhas, porcos, bois e cavalos), além de poder ser coletada no interior das residências; a espécie nas áreas de estudo sempre se revelou altamente antropofílica (VEXENAT *et al.*, 1986b; AZEVEDO *et al.*, 1990; AZEVEDO & RANGEL, 1991; SHERLOCK, *et al.*, 1996). Na Região Sudeste, os trabalhos de BARRETTO (1943) e de FORATTINI (1953), mesmo registrando a ocorrência de *L. whitmani* nas florestas primárias, mostrava que a espécie podia ser encontrada em plantações de bananas, no ambiente peridomiciliar em associação com animais domésticos. Os estudos mais recentes já demonstram que a espécie está muito próxima das residências, podendo invadí-las, onde estariam praticando hematofagia de forma eficiente (MAYRINK *et al.*, 1979; PASSOS *et al.*, 1991; SOUZA *et al.*, 2001, 2002, 2004; RANGEL & LAINSON, 2003). Da mesma forma, no Sul do Brasil, *L. whitmani* pratica antropofilia, habita o peridomicílio de áreas rurais revelando um hábito alimentar eclético em animais domésticos no ambiente antrópico, embora possua alta prevalência nas matas residuais alteradas (RANGEL & LAINSON, 2003; DIAS SVERSUTTI *et al.*, 2007).

Na Região Centro-Oeste do Brasil, a espécie encontra-se bem estudada apenas nos Estados do Mato Grosso e do Mato Grosso do Sul, onde apresenta ampla distribuição, com destacada sazonalidade, é registrada ocupando diferentes nichos ecológicos, e alguns autores trabalham com a hipótese de *L. whitmani* esteja em processo de urbanização (GALATI *et al.*, 1996; MASSAFERA *et al.*, 2005; MISSAWA & DIAS, 2007; MISSAWA & MACIEL, 2008).

Atualmente, este flebotomíneo é sugerido como o mais importante transmissor de LTA no Brasil (RANGEL & LAINSON, 2009), considerando sua dispersão e ocorrência em associação com as áreas de transmissão, especialmente de *L. braziliensis*, habitando diferentes coberturas vegetais e vivendo em condições climáticas as mais variadas (COSTA *et al.*, 2007). A recente associação das alterações ecológicas e mudanças climáticas globais certamente têm contribuído para a expansão da LTA no território brasileiro e, neste contexto, *L. whitmani* figura como um flebotomíneo, cuja capacidade de adaptação a áreas degradadas o aproxima cada vez mais do homem e dos animais domésticos no ambiente rural e nas periferias de cidades (COSTA *et al.*, 2007; SHAW, 2008). Estudo recente, utilizando a técnica da modelagem de nicho ecológico, pôde comparar três importantes transmissores de LTA num cenário de alterações climáticas ocorrendo no Brasil, onde *L. whitmani*, quando comparada a *L. (N.) intermedia* (Lurz & Neiva, 1912) e *L. migonei* França, 1920 estaria em processo contínuo de adaptação e ampliaria seu raio de dispersão geográfica (PETERSON & SHAW, 2003).

Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, em Estados tais como Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná, *L. whitmani* tem revelado aspectos importantes relativos à competência vetorial, tais como antropofilia e registro de infecção natural por *L. braziliensis*, onde com frequência ocorre em altas densidades, estando associado ao ambiente peridomiciliar (MAYRINK *et al.*, 1979; FALQUETO, 1995; LUZ *et al.*, 2000; TEODORO *et al.*, 2003). Desde os primeiros estudos realizados no Estado de São Paulo acerca deste flebotomíneo, PESSÔA & COUTINHO (1941) encontraram um exemplar infectado por flagelados, supostamente promastigotas, o que estimulou estudos que revelaram o hábito silvestre e a antropofilia da espécie (BARRETTO, 1943; FORATTINI, 1954).

No Nordeste, este flebotomíneo também é considerado um importante transmissor de *L. braziliensis*, especialmente pelo achado de espécimes com infecção natural na região de Três Braços (BA) e em Baturité (CE) (HOCH *et al.*, 1986; RYAN *et al.*, 1990). Destacam-se, ainda, as informações sobre a ocorrência de *L. whitmani* em alta densidade no ambiente domiciliar e a prática da antropofilia. Tais características se apresentam como importantes para definir a competência vetorial da espécie observada nestas e em outras localidades de estados nordestinos (AZEVEDO *et al.*, 1990; AZEVEDO & RANGEL, 1991; QUEIROZ *et al.*, 1994; LAINSON & SHAW, 1998; RANGEL & LAINSON, 2003).

Possivelmente, na região Centro-Oeste, levando-se em conta a sua dispersão, *L. whitmani* também assume o papel de vetor de leishmaniose tegumentar. Estudos conduzidos

em Corguinho no Estado do Mato Grosso do Sul, registraram a espécie como a mais abundante, antropofílica e naturalmente infectada possivelmente por *L. braziliensis* (NUNES *et al.*, 1995). GALATI *et al.* (1996), ao estudar a fauna flebotomínica deste mesmo município, verificaram a alta frequência de *L. whitmani* na maioria dos ecótopos selecionados; estava presente no solo e na copa das árvores de vários ambientes, sugerindo que a espécie fosse dotada de hábitos alimentares ecléticos, destacando sua importância na cadeia de transmissão de leishmaniose tegumentar no Estado.

Na região Norte, nos Estados do Acre e Tocantins, *L. whitmani* está sendo sugerida como provável vetor da *L. braziliensis*. Recentemente, os estudos conduzidos por AZEVEDO *et al.* (2008) no Estado do Acre, incluindo a capital Rio Branco demonstraram que *L. whitmani* se apresentava como a espécie predominante. Além de ser registrada em todos os municípios com transmissão de *L. braziliensis*, nos locais prováveis de infecção, o que fez com que os autores sugerissem o flebotomíneo como transmissor desta leishmânia no Estado. O Estado de Tocantins vem sofrendo constantes impactos ambientais decorrentes, principalmente, da construção de usinas hidrelétricas e estabelecimento de novos assentamentos, o que possibilitou a alta incidência de casos humanos de leishmaniose tegumentar; neste ambiente degradado, além do fato de *L. whitmani* ocorrer em cerca de 95% dos municípios endêmicos (VILELA *et al.*, 2008).

No Estado do Pará, *L. whitmani*, na floresta primária, até o momento parece não estar relacionada à transmissão de *L. braziliensis* (LAINSON *et al.*, 1981; RANGEL *et al.*, 1996; LAINSON & SHAW, 1998).

4. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani*: um complexo de espécies crípticas ou uma espécie com elevada capacidade de adaptação às alterações ambientais e climáticas?

Estudos desenvolvidos no Estado do Pará registraram um padrão de comportamento de *L. whitmani*, diferente do que é observado nas demais regiões do Brasil, onde a espécie ocorre. A espécie se apresenta como essencialmente silvestre, pode ser coletada sobre o tronco e na copa das árvores de grande porte, possuindo pouca tendência antropofílica, o que só ocorreria em condições especiais (LAINSON *et al.*, 1979; READY *et al.*, 1986; SHAW *et al.* 1991). Com base nestas diferenças qualitativas relacionadas com antropofilia e domiciliação, LAINSON (1988) sugeriu *L. whitmani*, como um complexo de espécies, por apresentar hábitos alimentares variados e ocupar diferentes habitats.

Na década de 90, populações de *L. whitmani* foram separadas em três linhagens baseadas nas seqüências de DNA mitocondrial (READY *et al.*, 1997), com distribuição alopatrica, no sudoeste da Amazônia; em uma região central de clima seco; e em uma zona climática de Mata Atlântica. RANGEL *et al.* (1996) reconheceram duas linhagens filogenéticas que poderiam estar inseridas em um complexo de espécies: (a) a forma do Estado do Pará, ao norte e ao sul do Rio Amazonas e a (b) forma típica do Nordeste do Brasil, Ceará e Bahia (Ilhéus, localidade-tipo). Esta última está associada a transmissão de *L. braziliensis* e que se distinguiu da população amazônica por diferenças significativas em estudos morfométricos de 11 caracteres, especialmente o filamento genital e a relação filamento-bomba ejaculadora. Os estudos de DNA genômico claramente separavam a população do Pará das duas do nordeste. Discutindo a lógica da existência de três diferentes linhagens, READY *et al.* (1998) sugeriram uma concordância destas linhagens com zonas bioclimáticas, onde a linhagem Amazônica estaria associada à região de Floresta Tropical Amazônica, a linhagem do Nordeste associada a zona de Cerrado e a linhagem Norte-Sul associada à Região de Floresta Tropical Atlântica. Considerando que estas zonas climáticas existem há 2-3 milhões de anos, pode-se supor com base no relógio molecular do DNA mitocondrial que as linhagens coexistiam nessa mesma datação.

Estudos sugeriram a existência de uma quarta linhagem de *L. whitmani* no Estado de Rondônia. Entretanto, com base na análise de 31 haplótipos de populações de *L. (N.) whitmani* das Regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul, o cladograma mostrou apenas duas linhagens: uma das Regiões de Floresta (linhagem de Rondônia, linhagem Amazônia e linhagem Nordestina) e outra Norte-Sul, procedente da Zona de Região de Cerrado, sugerindo a existência de clados de haplótipos e um contínuo intercruzamento de populações de *L. whitmani* nas florestas do Brasil (ISHIKAWA *et al.*, 1999), o que levou esses autores a questionarem a hipótese de complexo de espécies crípticas (**Fig. 1**). Estudos morfométricos de populações de *L. whitmani* procedentes do Nordeste e Sudeste evidenciaram a existência de dois conglomerados de populações biogeográficas, que foram sustentados, posteriormente, com base na análise da variabilidade genética destas populações biogeográficas, que sugeriram dois agrupamentos: Corte de Pedra (BA), Ilhéus (BA) e Serra de Baturité (CE) num primeiro grupo, e Martinho Campos (MG) num segundo (MARGONARI *et al.*, 2004).

Em Buriticupu (Amazônia Maranhense), onde têm sido registrados casos humanos de LTA determinados por *L. shawi* e *L. braziliensis*; uma situação bastante peculiar foi apontada por REBÊLO *et al.* (2000). Estes autores sugeriram que *L. (N.) whitmani* seria o flebotômíneo

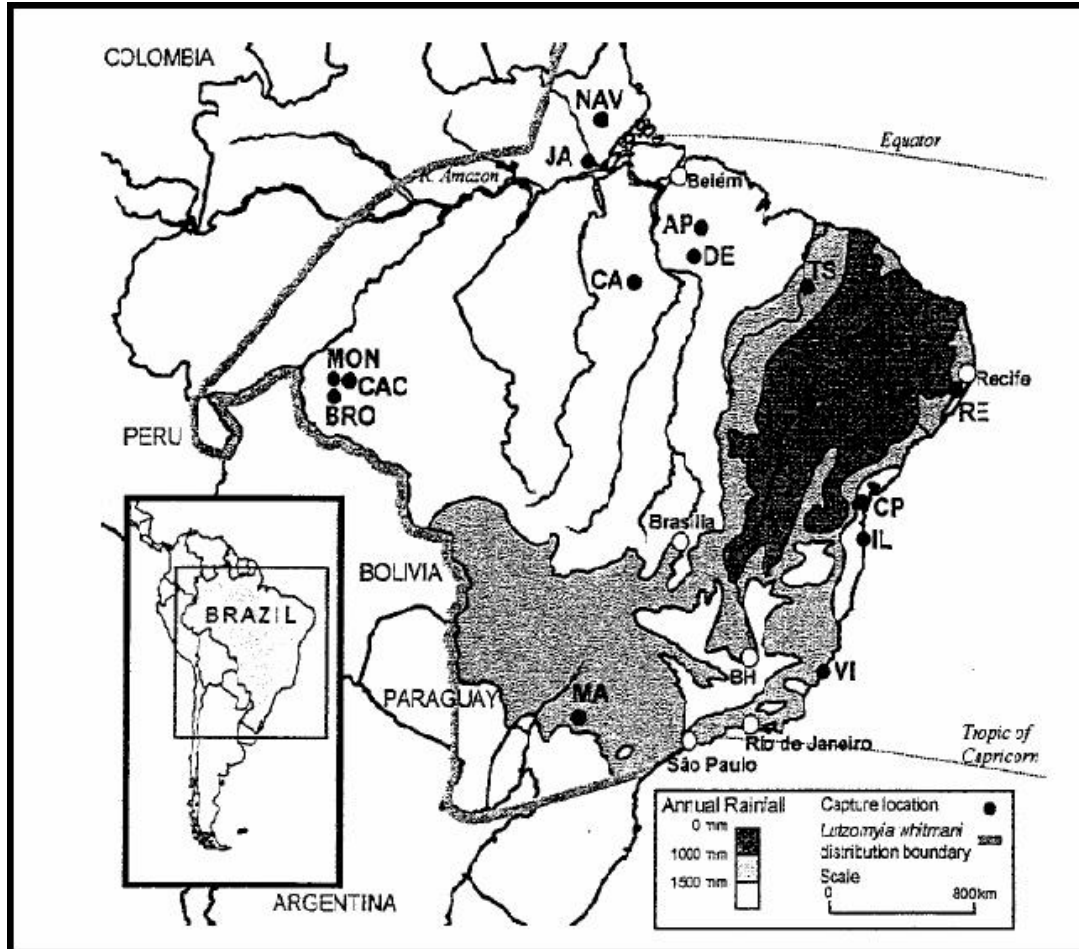


Figura 1- Linhagens de *Lutzomyia whitmani* que ocorrem no Brasil. Locais de captura - Amapá: Serra do Navio (NAV); Bahia: Corte de Pedra (CP), Ilhéus (IL); Espírito Santo: Viana (VI); Pará: Água Parada (próximo a Paragominas) (AP), Serra dos Carajás (CA), Dom Elizeu (DE), Monte Dourado(JA); Paraná: Maringá (MA); Pernambuco: Refrigério (RE); Piauí: Teresina (TS); Rondônia: Buriti (BRO), Cacaulândia (CAC), Montenegro (MON). (Fonte: ISHIKAWA *et. al.*,1999).

envolvido na transmissão da doença, associada aos dois parasitos. Nestes estudos, foi verificado que *L. whitmani* ocorreu em abundância no ambiente silvestre e também apresentou alta frequência no ambiente domiciliar. Portanto, um padrão amazônico silvestre e outro peridoméstico do vetor estariam ocorrendo numa “zona de transição”.

Recentemente, foi estudada a variabilidade genética de populações de *L. whitmani* de Buriticupu (MA), de Ilhéus (BA), área de transmissão de *L. (V.) braziliensis* e de Paragominas (PA), área de transmissão de *L. shawi*, através da técnica de Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR). Dentre seis “primers” testados, um deles se revelou altamente polimórfico, identificando uma banda de 200bp em alguns indivíduos de Buriticupu, bem como em todos de Paragominas, estando tal banda ausente em todos os espécimes de Ilhéus. Estes dados sugerem a ocorrência em simpatria de duas distintas populações de *L. whitmani* em Buriticupu, e possivelmente associadas à transmissão de duas diferentes espécies de *Leishmania*. Os estudos realizados com essa espécie de flebotomíneo, caracterizando-a como pertencente a um complexo de espécies podem ser observados na **Tabela 1**.

GOMES & GALATI (1977) discutiram o habitat florestal como uma característica essencial para desenvolvimento de flebotomíneos. Contudo, hoje algumas discussões surgem no sentido de explicar a capacidade de algumas espécies de flebotomíneos sobreviverem em áreas impactadas e até mesmo no ambiente urbano. Tem-se atribuído às variações climáticas globais e modificações ambientais as mudanças comportamentais de alguns vetores de leishmanioses (SHAW, 2008).

Seguindo a lógica deste raciocínio as leishmanioses estariam se expandido além do seu ecótopo natural por conta dos distúrbios ambientais, de diferentes naturezas, o que ocasiona uma maior exposição do homem aos insetos vetores (SHAW, 2007, 2008).

Nesta perspectiva, pode-se supor que *L. whitmani* seria uma espécie com a capacidade de se adaptar aos mais diversos habitats, que vão desde áreas de vegetação preservada até ambientes alterados, quer seja por ações antrópicas, quer seja por mudanças climáticas. A partir desse pressuposto, todas as diferenças biológicas e/ou comportamentais da espécie, observadas para as regiões fisiogeográficas do Brasil, não estariam a favor de um complexo de espécies. Um estudo trabalhando com modelagem de nicho ecológico tem sugerido que com tamanha capacidade de sobreviver as mudanças ambientais e o fato de se adaptar a novos nichos ecológicos, *L. whitmani* seria capaz de tolerar os efeitos das mudanças climáticas globais e expandir sua distribuição geográfica (PETERSON & SHAW, 2003).

5. Considerações finais

Lutzomyia whitmani, atualmente, pode ser considerado como o mais importante transmissor de leishmaniose tegumentar no Brasil, associado à transmissão de duas leishmânias dermatrópicas: *Leishmania braziliensis* e *L. shawi*. Dentre os flebotomíneos neotropicais, destaca-se por sua notável capacidade de ocupar diferentes nichos ecológicos, diferentes aspectos fisiogeográficos e climáticos. Além de sua comprovada antropofilia, é uma espécie dotada de grande plasticidade alimentar na maior parte do Brasil. Mesmo já se mostrando adaptada ao ambiente domiciliar, a espécie tem sido encontrada em áreas de florestas, especialmente na Região Norte do Brasil, mantendo ainda hábitos silvestres. Evidências e estudos sugerem que *L. whitmani* seria um complexo de espécies crípticas, por diferenças observadas em aspectos comportamentais, na morfologia de adultos e mesmo na atuação como vetor de leishmaniose tegumentar. Apesar dessas variações interpopulacionais, alguns estudos preferem admitir ser uma espécie com fantástica capacidade de se adaptar ao ambiente modificado, não sendo dependente do ambiente silvestre para sobreviver.

Tabela 1- Estudos realizados com a espécie *Lutzomyia whitmani* que levantaram a hipótese de que ela pertence a um complexo de espécies.

Distribuição Geográfica	Coordenadas (Sul)	Coordenadas (Oeste)	Procedência	Habitat	Armadilhas	Parasito que circula na área	Bibliografia
Bahia	14,50°	39,06°	Ilhéus	Peridoméstico	Colônia	<i>L. braziliensis</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	14°47'02"	39°02'58"	Ilhéus	Peridoméstico	CDC miniatura, Capturador de Castro, Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	RANGEL <i>et al.</i> (1996)
	14°47'02"	39°02'58"	Ilhéus	-	CDC e Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	SOUZA <i>et al.</i> (2004)
	14°47'02"	39°02'58"	Ilhéus	-	CDC e Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	DIAS <i>et al.</i> (1999)
	13,23°	39,40°	Corte da Pedra	Peridoméstico	CDC miniatura	<i>L. braziliensis</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	13°26'23"	39°39'36"	Corte da Pedra	-	CDC e Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	SOUZA <i>et al.</i> (2004)
Pernambuco	13°26'23"	59°39'36"	Corte da Pedra	-	CDC e Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	DIAS <i>et al.</i> (1999)
	08,26°	35,31°	Refrigério	Peridoméstico	CDC miniatura	<i>L. braziliensis</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	08°23'	35°27'	Refrigério	Plantação de banana	CDC em "Experimental chicken shed"	<i>L. braziliensis</i>	CAMPBELL-LENDRUM <i>et al.</i> (2000)
	08°22'59"	35°27'09"	Amaraji	-	CDC e Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	DIAS <i>et al.</i> (1999), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	05,09°	42,46°	Teresina	Peridoméstico	CDC miniatura	<i>L. braziliensis</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	05°08'	42°48'	Teresina	Área de floresta	CDC em "Experimental chicken shed"	<i>L. braziliensis</i>	CAMPBELL-LENDRUM <i>et al.</i> (2000)
Ceará	04°19'43"	38°53'05"	Baturité	Peridoméstico	CDC miniatura, Capturador de Castro, Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	RANGEL <i>et al.</i> (1996)
	04°19'43"	38°53'05"	Baturité	-	CDC e Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	SOUZA <i>et al.</i> (2004)
	04°19'43"	38°53'05"	Baturité	-	CDC e Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	DIAS <i>et al.</i> (1999)
Paraná	23,36°	52,26°	Maringá	Peridoméstico	CDC miniatura	<i>L. braziliensis</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	23°40'	52°25'	Fazenda Palmital	Fragmento de mata	"Experimental chicken shed"	<i>L. braziliensis</i>	CAMPBELL-LENDRUM <i>et al.</i> (2000)

Espírito Santo	20,21°	40,30°	Viana	Peridoméstico	CDC miniatura	<i>L. braziliensis</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
Minas Gerais	19°19'54"	45°14'13"	Martinho Campos	-	CDC e Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	SOUZA <i>et al.</i> (2004)
	19°19'54"	45°14'13"	Martinho Campos	-	CDC e Armadilha de Shannon	<i>L. braziliensis</i>	DIAS <i>et al.</i> (1999)
Pará	04,20°	47,33°	Dom Eliseu	Troncos de árvores	Colônia	<i>L. shawi</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	-	-	Dom Eliseu	Peridoméstico	CDC (1m do solo e na copa de árvores), Capturador de Castro	<i>L. shawi</i>	RANGEL <i>et al.</i> (1996)
	03°	47,27°	Paragominas	Troncos de árvores	Capturador de Castro	<i>L. shawi</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	06°	50,23°	Serra dos Carajás	Troncos de árvores	Capturador de Castro	<i>L. shawi</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	-	-	Serra dos Carajás	Peridoméstico	CDC (1m do solo e na copa de árvores), Capturador de Castro	<i>L. shawi</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	0,34°	52,46°	Monte Dourado	Troncos de árvores	Colônia	<i>L. shawi</i>	READY <i>et al.</i> (1997), ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	-	-	Monte Dourado	Peridoméstico	CDC (1m do solo e na copa de árvores), Capturador de Castro	<i>L. shawi</i>	RANGEL <i>et al.</i> (1996)
	-	-	Serra do Navio	Área de floresta	CDC miniatura	Isolados compatíveis com <i>L. guyanensis</i>	ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
Amapá	-	-	Buriti	Área de floresta	CDC miniatura	<i>L. braziliensis</i> / <i>L. shawi</i>	ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
Rondônia	-	-	Cacaulândia	Área de floresta	CDC miniatura	<i>L. braziliensis</i> / <i>L. shawi</i>	ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
	-	-	Montenegro	Área de floresta	CDC miniatura	<i>L. braziliensis</i> / <i>L. shawi</i>	ISHIKAWA <i>et al.</i> (1999)
Maranhão	-	-	Buriticupu	Peridoméstico	CDC miniatura	<i>L. braziliensis</i> / <i>L. shawi</i>	READY <i>et al.</i> (1998)

Capítulo II

Padronização de metodologia para identificação de hidrocarbonetos cuticulares por Cromatografia Gasosa em *Lutzomyia longipalpis* s.l. e *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)

Resumo

ANDRADE, Andrey José de. **Padronização de metodologia para identificação de hidrocarbonetos cuticulares por Cromatografia Gasosa em *Lutzomyia longipalpis s.l.* e *L. whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**

No Brasil, algumas espécies de flebotomíneos têm sido discutidas como um complexo (eg. *Lutzomyia longipalpis s.l.* e *Lutzomyia whitmani*) e a caracterização dos Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) é uma ferramenta que pode ser utilizada para separação de espécies crípticas fornecendo informações sobre a epidemiologia de doenças e direcionando ações efetivas de controle. O objetivo do presente estudo é padronizar uma metodologia de extração e identificação dos possíveis HCCs para *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani* utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa (CG). Foram avaliados o programa de temperatura da coluna cromatográfica, o método e o tempo de extração dos compostos e o número de insetos a serem utilizados. Machos e fêmeas de *L. whitmani* provenientes dos estados da Bahia, Pará, Minas Gerais, e Paraná e de *L. longipalpis s.l.* de Minas Gerais, Pará e Piauí foram utilizados nas análises. Para padronização da CG foram utilizados exemplares da segunda espécie, totalizando três repetições por estado. Para identificação dos compostos foi injetada uma mistura padrão de HCCs (C₁₃-C₄₀) e calculando-se o Índice de Retenção (IR). Além da mistura foi injetado o feromônio sintético 9-metilgermacreno-B. Somente os extratos de machos de *L. longipalpis s.l.* do Pará não apresentaram o pico do feromônio. Os perfis cromatográficos de machos e fêmeas co-específicos foram semelhantes, porém somente os machos de *L. longipalpis s.l.* provenientes de Minas Gerais e Pará apresentaram picos do C₂₂ e C₁₆, respectivamente e do Piauí para o C₁₅, C₂₆, C₂₅ e C₂₈; para fêmeas foram registrados somente picos do C₂₂ (Minas Gerais); e C₁₈, C₂₇ e C₃₂ (Pará). Observou-se que para detecção de picos cromatográficos utilizaria-se uma programação da coluna de 50 minutos utilizando 100 flebotomíneos no tempo de extração de 20 minutos em 1 ml de hexano. *Lutzomyia whitmani* mostrou pouca diferença entre os possíveis HCCs identificados para machos onde o C₂₁ só não foi encontrado para os do Pará, enquanto o C₃₃ apareceu somente na população de Minas Gerais e do Paraná. Houve maior diferença entre os HCCs quando comparados machos e fêmeas co-específicos, de cada Estado, com exceção de Minas Gerais onde os compostos foram todos diferentes entre os sexos. A técnica de CG foi padronizada para extração de HCCs na cutícula de flebotomíneos, a qual mostrou que esses compostos podem variar entre as populações e entre os sexos de *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani*.

1. Introdução

A necessidade de ferramentas adicionais às clássicas já utilizadas para identificar insetos vetores tem sido constantemente enfatizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) devido ao fato de algumas doenças serem transmitidas por membros pertencentes a potenciais complexos de espécies crípticas (PHILLIPS & MILIGAN, 1986). A capacidade vetorial dos membros de um complexo pode variar significativamente o que torna importante a correta identificação destas espécies crípticas para estudos epidemiológicos e para seu efetivo controle (PHILLIPS & MILLIGAN, 1986). A caracterização dos Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) tem provado ser de grande utilidade na separação de espécies de insetos vetores pertencentes a complexos, uma vez que a presença destes compostos na cêra da cutícula é consistente com a espécie e parecem ser espécie-específicos (MOLINEUX & PHILLIPS, 1988; PHILLIPS *et al.*, 1988). Estes compostos podem variar entre diferentes espécies, entre os sexos e entre diferentes instares larvais de uma mesma espécie (LOCKEY, 1991).

Três principais classes de mistura de hidrocarbonetos (n-alcanos, olefinas, metilalcanos) têm sido identificadas para insetos cuja cutícula apresenta uma mistura de n-alcanos e os mais abundantes possuem cadeia que variam seu comprimento entre nC_{23} a nC_{31} . Alcenos e metilalcanos normalmente ocorrem como misturas isoméricas e muitas espécies de insetos também apresentam um grande número desses componentes (LOCKEY, 1991). A quantidade desses HCCs pode ser afetada por condições ambientais, como habitat, temperatura, umidade relativa (HADLEY, 1986).

Os procedimentos experimentais para se obter e examinar os HCCs se inicia através da extração dos lipídeos com solvente orgânico e, posteriormente, a separação e análise dos hidrocarbonetos por Cromatografia Gasosa (CG) e sua identificação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) (LOCKEY, 1988, 1991; PHILLIPS *et al.*, 1988). As técnicas podem ser potencialmente usadas para trabalhos de campo, pois os HCCs são quimicamente estáveis, além de ser possível utilizar adultos capturados em armadilhas luminosas, a fresco, ou mortos estocados por um longo período (CARLSON & SERVICE, 1980). A identificação de um composto por CG pode ser feita comparando-o ao de uma mistura de alcanos de diferentes números de átomos de carbono através do cálculo do índice de Kovats, também chamado de Índice de Retenção (IR). Este IR é característico do

composto, sendo independente das condições analíticas utilizadas (KOVATS, 1965). Quando possível essa identificação dos compostos deve ser confirmada por CG-EM.

Para os flebotomíneos, a análise de compostos, como terpenos por CG-EM para separar espécies crípticas é conhecida, principalmente, para a espécie *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Lutz & Neiva, 1912), na qual, tem sido possível identificar diferentes tipos de feromônios entre populações do Brasil (PHILLIPS *et al.*, 1986; HAMILTON & WARD, 1991), tem-se caracterizado diferentes tipos de feromônios (BAUZER *et al.*, 2007; ARAKI *et al.*, 2009), bem como o isolamento reprodutivo entre populações (WARD *et al.*, 1983). Atualmente, a presença de diferentes tipos de feromônios sexuais presentes em machos de *L. longipalpis* s.l. é relatada e parece variar de acordo com as diferentes regiões do Brasil. Em Minas Gerais foram identificados três terpenos: o cembreno (1 e 2) e o 9-metil-germacreno-B, sendo que este último é produzido também por machos do Piauí (ARAKI *et al.*, 2009).

No Velho Mundo, KAMHAWI *et al.* (1987) identificaram duas populações distintas de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 em um foco de leishmaniose visceral na França, por análise dos HCCs, assim como já foi observada variação intraespecífica de *P. perfiliewi* Parrot, 1930 (PHILLIPS *et al.*, 1990b). A caracterização dos HCCs permitiu a separação de fêmeas das espécies *P. martini* Parrot, 1936 e *P. celiae* Minter, 1962, as quais ocorrem em simpatria e são consideradas isomórficas, tanto para as populações coletadas em campo quanto àquelas provenientes de criação em laboratório (GEBRE-MICHAEL *et al.*, 1994).

No Novo Mundo, o *Flebotomus unisetosus* foi nomeado como espécie tipo do subgênero *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (YOUNG & DUNCAN 1994). Espécies deste subgênero foram agrupadas em quatro séries (*squamiventris*, *guyanensis*, *davisi*, *panamensis*) informalmente baseadas e nomeadas de acordo com características morfológicas de machos e, ocasionalmente, de fêmeas (MARTINS *et al.*, 1978). Na revisão taxonômica realizada por CARVALHO *et al.* (2006) destacou-se a grande dificuldade em se diferenciar as espécies incluídas na série *squamiventris*, principalmente entre as fêmeas. Dentre as espécies do subgênero *Psychodopygus*, *L. wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971) e *L. complexa* (Mangabeira, 1941), ocorrem em simpatria na Serra dos Carajás (PA), sendo ambas consideradas transmissoras de *L. (V.) braziliensis* (RYAN *et al.*, 1986) no Estado do Pará. Através da análise dos HCCs separou-se, com sucesso, indivíduos fêmeas de ambas as espécies (RYAN *et al.*, 1986), as quais são morfologicamente semelhantes (LANE & READY, 1985). Na série *panamensis* PHILLIPS *et al.* (1990a) conseguiram separar espécies simpátricas de *L. carrerai carrerai* (Barretto, 1966) e *L. yucumensis* (Le Pont, Caillard,

Tibayrenc & Desjeux, 1986), provenientes da Bolívia, através da CG dos HCCs. Um alto grau de separação (87%) foi obtido baseado na composição química destas duas espécies. MAHAMAT & HASSANALI (1998) demonstraram correlação entre a composição de HCCs e dos caracteres morfológicos de 10 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Sergentomyia* do Kênia.

JUSTINIANO *et al.* (2004) sugeriram, entre outras técnicas, o uso da análise de HCCs para separar duas populações de *L. umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977), transmissor de *L. (V.) guyanensis* na Região Norte da América do Sul, uma vez que foram observadas diferenças, em laboratório, na biologia dessas populações. As bases para a quimiotaxonomia têm sido estabelecidas para numerosos grupos de insetos e o desenvolvimento destas incluirá a caracterização da composição química dos componentes cuticulares como uma ferramenta para classificação dos táxons (LOCKEY, 1991).

Embora os feromônios sexuais de diversas populações de *L. longipalpis s.l.* sejam conhecidos (BAUZER *et al.*, 2007; ARAKI *et al.*, 2009), não se sabe sobre os possíveis hidrocarbonetos que compõe a cutícula desses insetos. Além desse fato, não há informação na literatura acerca da composição química da cutícula de *L. whitmani*. Utilizando a técnica de CG o presente trabalho buscou padronizar a técnica para detecção desses compostos utilizando como modelos *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani*, fornecendo subsídios para caracterizá-las ou não como um complexo de espécies crípticas.

2. Objetivo

Padronizar a metodologia de extração de compostos da cutícula para flebotomíneos e identificar os hidrocarbonetos cuticulares utilizando Cromatografia Gasosa.

2.1. Objetivos específicos

1- Realizar análises de CG de extratos de *L. longipalpis s.l.*, provenientes do Pará, de Minas Gerais e do Piauí, comparar se há diferença entre os cromatogramas das populações e caracterizar os possíveis HCCs das populações;

2- Identificar os possíveis HCCs de machos e fêmeas de populações de *L. whitmani* provenientes da Bahia, Pará, Minas Gerais e Paraná.

3. Material e Métodos

3.1. Procedência dos flebotomíneos

Populações da espécie *L. longipalpis s.l.* foram obtidas de colônias mantidas em diferentes laboratórios, exceto a de Minas Gerais, que foi coletada na Gruta da Lapinha (campo), município de Lagoa Santa. Os exemplares de *L. whitmani* foram todos obtidos de campo de distintas regiões do Brasil. Para as duas espécies, somente os insetos previamente mortos foram utilizados para os testes. Todos os flebotomíneos, provenientes de campo ou de colônia, foram colocados em tubos do tipo *Eppendorf* e acondicionados, a seco, em geladeira. As procedências das espécies, aqui chamadas de populações, estão descritas abaixo:

- *Lutzomyia longipalpis s.l.* (**Fig. 1**)- foi utilizada uma população proveniente da Gruta da Lapinha (campo), Lagoa Santa (Minas Gerais) cedida pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/BH) (campo). A segunda população foi proveniente de Teresina (Piauí) e foram cedidas pelo Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos da Universidade Federal de Minas Gerais (LFIH/ UFMG). Essa população encontrava-se na 30ª geração. A terceira população foi proveniente de Santarém (152ª geração), Cametá (12ª geração) e Barcarena (27ª geração) (Pará) mantidas no Insetário de Flebotomíneos do Departamento de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas (IEC/PA). A espécie proveniente do Pará foi considerada como mesma população, mesmo possuindo procedências distintas.

- *Lutzomyia whitmani* (**Fig. 2**)- a primeira população foi procedente do município de Ilhéus (Bahia), localidade tipo da espécie. Os flebotomíneos foram capturados em peridomicílio com armadilhas luminosas do tipo CDC (SUDIA & CHAMBERLAIN, 1962). A segunda população foi proveniente da microrregião de Paragominas (Pará). Os flebotomíneos foram capturados na Fazenda Água Parada, utilizando armadilhas CDC, porém instaladas a 1,5 e a 20 metros do solo, durante três dias consecutivos. A armadilha de Shannon (SHANNON, 1939) também foi utilizada durante quatro horas em uma noite. Todos

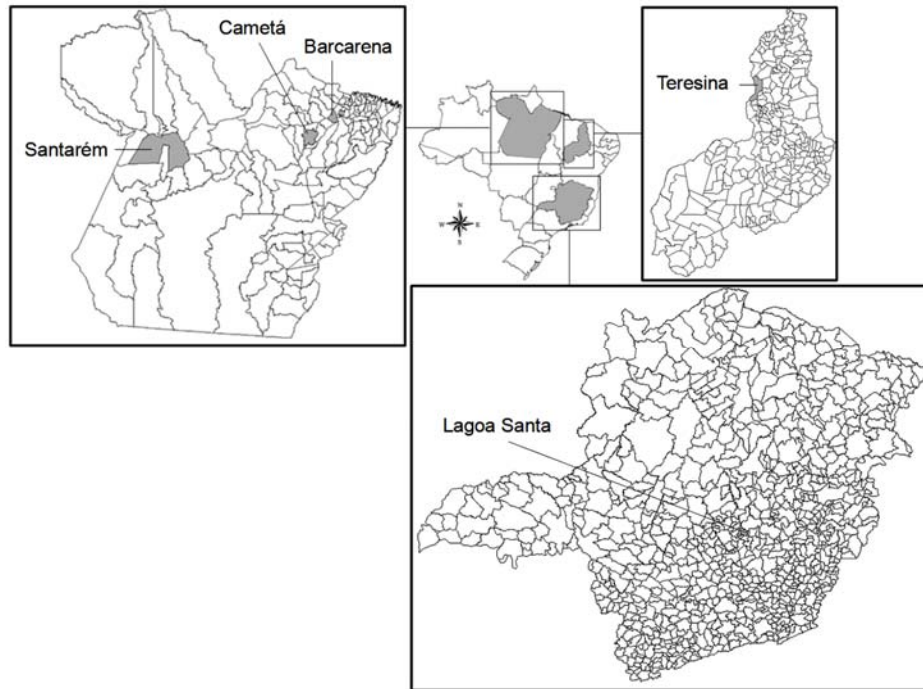


Figura 1- Procedências das populações de *Lutzomyia longipalpis s.l.*: MG- Lagoa Santa (19°37'44''S, 43°53'23''W); PI- Teresina (05°05'21''S, 42°48'07''W); PA- Barcarena (01°30'21''S, 48°37'33''W); Cametá (02°14'40''S, 49°29'45''W); Santarém (02°26'35''S, 54°42'30''W). (Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas – IBGE, 2009).

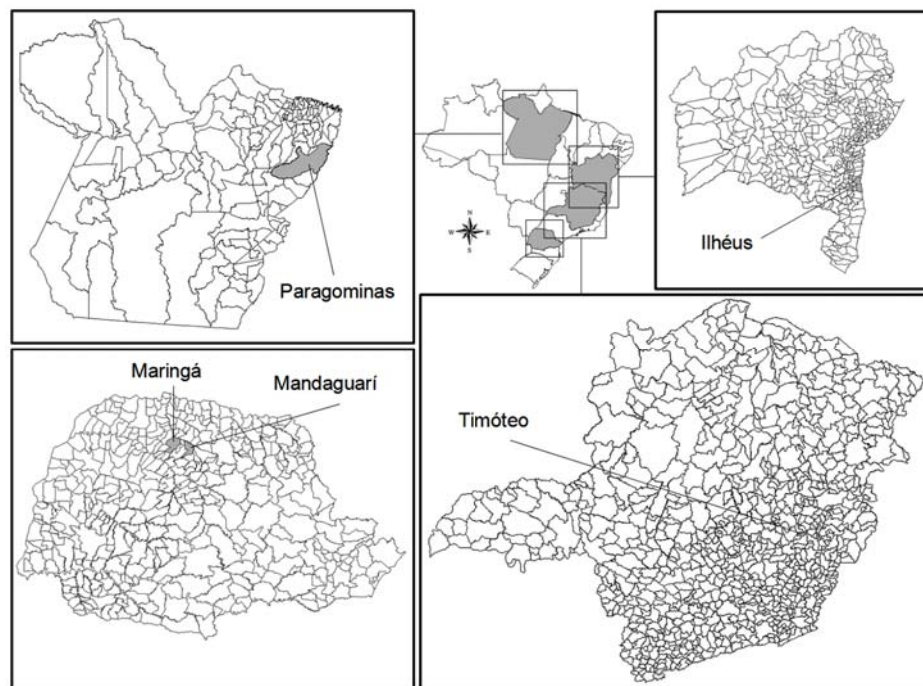


Figura 2- Procedências das populações de *Lutzomyia whitmani*: BA- Ilhéus (14°47'20''S, 39°02'58''W); PA- Paragominas (02°59'45''S, 47°21'10''W); PR- Maringá (23°25'31''S, 51°56'19''W) e Mandaguari (23°32'51''S, 51°40'15''W); MG- Timóteo (19°34'57''S, 43°38'40''W). (Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas – IBGE, 2009).

os insetos foram recolhidos do interior das CDCs, com capturadores de Castro, ainda vivos e estocados em geladeira. Posteriormente foi feita a confirmação da espécie (por morfologia externa) em estereomicroscópio. A terceira população foi coletada nas cidades de Maringá e Mandaguari (Paraná), que é um município que pertence a Região Metropolitana de Maringá. As fêmeas de *L. whitmani* foram coletadas em área de mata no Conjunto Residencial Borba Gato (23°27'10"S e 51°57'39"W) no município de Maringá. Os machos foram provenientes de um chiqueiro localizado no sítio Flôr de Maio, no município de Mandaguari. Para ambas as coletas foram utilizadas armadilhas de Falcão, entre 18:00 e 06:00 horas. A quarta população foi proveniente de Timóteo (Minas Gerais) e os flebotomíneos foram capturados utilizando duas armadilhas de Falcão instaladas em peridomicílio, durante uma noite, no bairro Recanto do Sossêgo, o qual está inserido dentro do Parque Estadual do Rio Doce.

3.2. Triagem dos insetos

Os flebotomíneos foram triados de acordo com o sexo, através de observação em estereomicroscópio. Posteriormente, machos e fêmeas foram separados em morfotipos quanto ao tamanho e a coloração. Para machos de *L. longipalpis s.l.* a coloração pálida que apresentam no terceiro e/ ou quarto tergito e para fêmeas a coloração mais escura das coxas II e III, foram os principais critérios adotados para a separação de outros flebotomíneos, principalmente para aqueles espécimes procedentes de campo. Machos e fêmeas de *L. whitmani* foram separados de outros flebotomíneos por tamanho e contraste de coloração do tórax (pleura e escudo) em morfotipos (Lw). Para confirmar taxonomicamente as espécies, após a morfotipagem, lâminas de 10 machos e 10 fêmeas foram confeccionadas e analisadas através de microscopia óptica, segundo a proposta taxonômica de YOUNG & DUNCAN (1994).

Alguns critérios foram adotados para a exclusão dos indivíduos para as análises: a) não estarem íntegros (inteiros); b) possuírem menos de três pernas; c) ausência de um dos seguimentos corporais (cabeça ou abdômen); d) não apresentar as duas asas; e) no caso das fêmeas, estarem ingurgitadas. Os insetos também foram verificados quanto a presença de ácaros e fungos, caso detectados esses microorganismos os espécimes foram descartados.

3.3. Dados do Cromatógrafo Gasoso e extração dos compostos cuticulares

Os extratos foram analisados em Cromatógrafo Gasoso (Shimadzu 17-A, Shimadzu, Kyoto, Japão) com um Detector de Ionização de Chama (FID), equipado com uma coluna DB-1 (30 m x 0.25 mm, i.d. 0.25 μ m; J&W Scientific). Antes de todas as extrações o solvente (Hexano, 99% de pureza, Merck), que foi utilizado nos extratos, foi injetado como branco. Foram realizados extratos dos algodões utilizados para filtragem dos extratos dos insetos para se observar se haviam registros destes filtros pelo cromatógrafo.

Machos e fêmeas foram separados, quantificados, colocados em um frasco de vidro (Supelco, Clear Screw Top Vial, 2 ml) e imersos em 1 ml do solvente, quantidade suficiente para cobri-los. Após o tempo de permanência de cada amostra, o solvente foi filtrado em uma pipeta de Pasteur contendo um chumaço de algodão no fundo, para retirar as contaminações com partes dos insetos, em frasco de vidro contendo um *Micro Insert* (Supelco, 28 x 6 mm, 0,1 ml). Após a extração, a amostra foi concentrada, até secar, em Nitrogênio e os frascos etiquetados e levados para o “freezer” a -20°C, como recomendado por WARD *et al.* (1989). Todas as amostras foram injetadas manualmente utilizando uma seringa de vidro (Hamilton, 10 μ l, Nevada) e analisadas no Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores da UFMG. Todos os cromatogramas foram analisados na atenuação cinco mantendo a mesma resposta para os picos (30mV).

As extrações dos compostos da cutícula dos flebotomíneos, nas diferentes fases do trabalho, são descritas abaixo, com suas particularidades.

3.4. Cromatografia Gasosa (CG): padronização do programa de temperatura para análise cromatográfica

Foi realizada uma injeção “splitless” de 1 μ l de cada extrato a uma temperatura inicial da coluna de 100°C em um gradiente de 10°C por 1 minuto, até atingir 230°C a qual aumentava 5°C a cada 2 minutos até atingir a máxima de 300°C, temperatura na qual permanecia por 20 minutos. O gás de arraste utilizado foi o Hélio e o tempo de corrida da amostra foi de 50 minutos. Foi utilizada a populações de *L. longipalpis s.l.* proveniente da Gruta da Lapinha, Lagoa Santa (MG).

Para a realização da cromatografia estipulou-se, arbitrariamente, um número fixo de 50 flebotomíneos. Após a triagem e a sexagem, os flebotomíneos foram transferidos para um frasco de vidro contendo 1ml do solvente hexano. Os tempos de permanência de cada amostra (50 machos e 50 fêmeas) foram de 20 min, 2h e 24h, aqui chamados “pool” de diferentes

insetos (utilizados e descartados) seguindo a mesma metodologia descrita no item **3.3**, com tempo de corrida de 30 min (MAHAMAT & HASSANALI, 1998) para machos e de 50 min para fêmeas. Para a leitura no cromatógrafo a gás, os extratos foram redissolvidos em 20µl de hexano e 1µl foi injetado no aparelho. Foi realizada uma injeção para o mesmo extrato de 50 insetos (“pool” de mesmos insetos, utilizados e reaproveitados) e para cada diferente tempo de extração (20 min, 2h e 24h) visando observar se haveria alteração no número e no tamanho dos picos cromatográficos (tempo de corrida= 50 min).

3.5. Observar o tempo de extração dos compostos cuticulares por GC

Os mesmos procedimentos definidos anteriormente (programação de temperatura da rampa, volume de injeção dos extratos, número e procedência de insetos utilizados) foram adotados para se definir tempo de extração dos compostos cuticulares. No tempo de corrida de 50 minutos, as amostras foram injetadas após os tempos de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos de extração em solvente.

3.6. Avaliar o melhor número de flebotomíneos a serem utilizados para detecção dos compostos por CG

Após definir o tempo de extração dos compostos cuticulares (**item 3.5**), procurou-se uma amostra (isenta de contaminantes) com um número de insetos que apresentasse o maior número de picos cromatográficos. Foram testados diferentes números de flebotomíneos (10, 20, 50 e 100 indivíduos) e somente os machos foram avaliados, adotando a mesma programação da coluna cromatográfica descrita no **item 3.4.2**.

3.7. Comparar os extratos de *Lutzomyia longipalpis s.l.*, provenientes das populações do Pará, Minas Gerais e Piauí

Após definidos os parâmetros citados (tempo de corrida, tempo de extração e número de insetos) três repetições do extrato hexânico de cada uma das populações (machos e fêmeas) foram injetadas no cromatógrafo e comparadas com uma mistura de padrões de hidrocarbonetos de cadeia linear (C₁₃-C₄₀) para indentificar os possíveis hidrocarbonetos através do Índice de Retenção (= Índice de Kovat) (KOVATS, 1965). Além dessa mistura,

foram injetados e comparados o tempo de retenção de um padrão isolado de heptano (C₁₇) e de heneicosano (C₂₁) para confirmar os alcanos contidos nas amostras e a seqüência dos HCCs da mistura (**Fig. 3**). Foram realizadas cinco repetições dos perfis cromatográficos da mistura de hidrocarbonetos C₁₃-C₄₀, a partir da qual foi gerada a fórmula para o cálculo do IR. Para o cálculo do índice foram consideradas as seqüências de hidrocarbonetos do C₁₃ ao C₃₃ (LOCKEY, 1991). Além destes hidrocarbonetos foi adquirido um sintético do feromônio sexual de machos de *L. longipalpis s.l.* 9-metil-germacreno-B (cedido pelo Dr. Antony M. Hooper - Department of Biological Chemistry, Rothamsted, UK) para comparação com os machos provenientes dos três Estados (Minas Gerais, Pará e Piauí).

Os gráficos foram apresentados em diferentes escalas para visualização dos possíveis HCCs, portanto não são comparáveis entre os machos de fêmeas da espécie de cada localidade.

3.8. Avaliar a técnica de CG para machos e fêmeas de *Lutzomyia whitmani*

A técnica de CG que foi padronizada para *L. longipalpis s.l.* foi utilizada para machos e fêmeas de *L. whitmani* (**ver item 3.1**). Para avaliar essa técnica foram utilizados exemplares da Bahia (72 ♂ e 67 ♀); Pará (37 ♂ e 28 ♀); Paraná (100 ♂ e 100 ♀) e Minas Gerais (100 ♂ e 100 ♀). Os volumes do solvente para as redissoluções das amostras foram ajustados de acordo com o número de insetos disponíveis para as análises. A metodologia de extração e identificação foi definida como: (1) tempo de extração de 20 min. em 1 ml de Hexano; (2) concentrado em nitrogênio e redissolvidos em 10µl do solvente; (3) injetado 1µl (“splitless”) no CG; (4) com tempo de 50 minutos para o programa de temperatura da coluna cromatográfica. Assim como para *L. longipalpis s.l.*, para indentificar os possíveis hidrocarbonetos cuticulares foi utilizado o Índice de Retenção (= Índice de Kovat) (KOVATS, 1965).

Os gráficos foram apresentados em diferentes escalas para visualização dos possíveis HCCs, portanto não são comparáveis entre os machos de fêmeas da espécie de cada localidade.

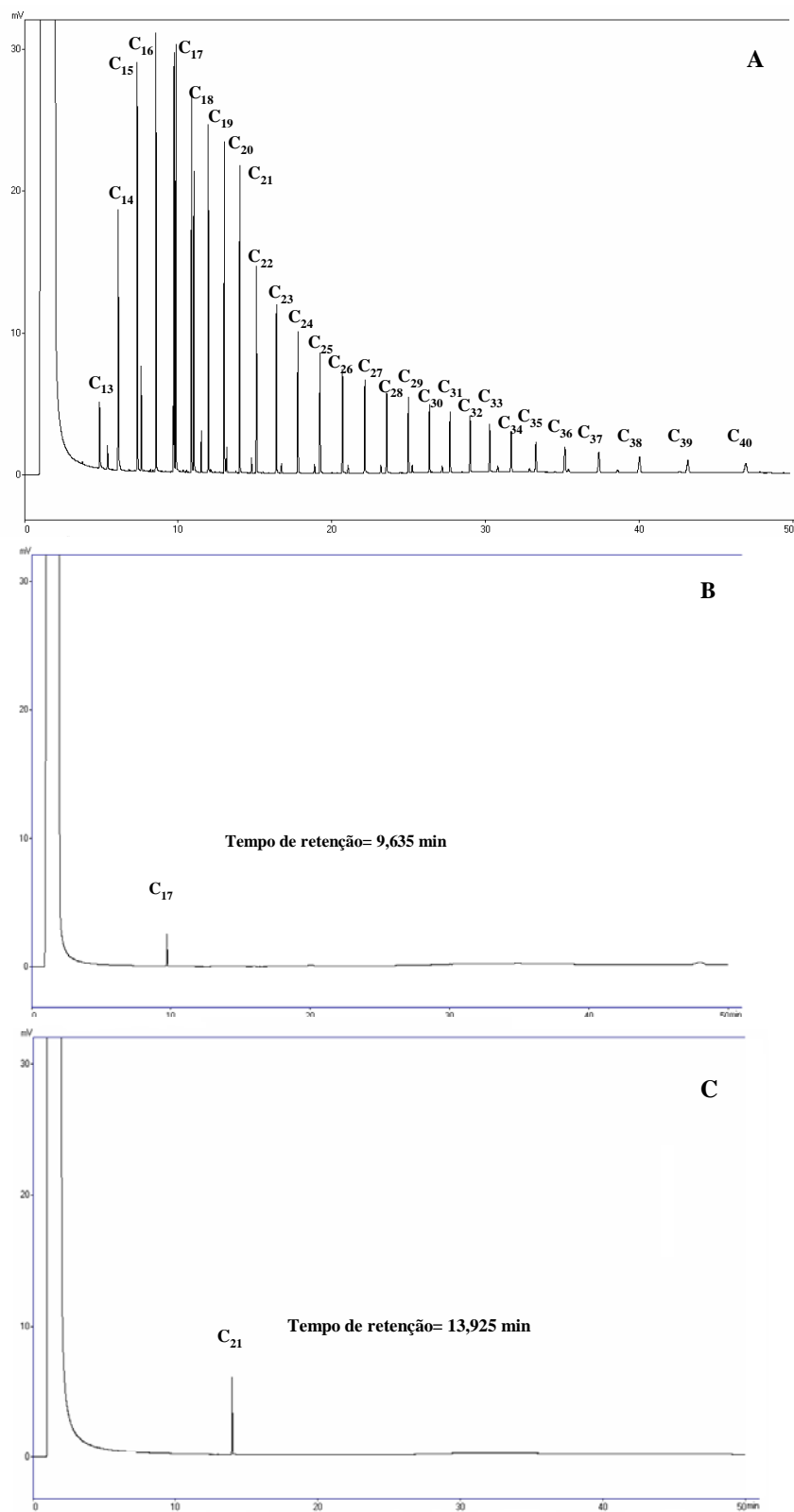


Figura 3- Perfis cromatográficos (tempo de corrida= 50 minutos): (A) mistura de hidrocarbonetos (C₁₃-C₄₀) utilizada como padrão para cálculo do Índice de Retenção; (B) heptano; (C) heneicozano.

3.9. Análise dos Dados

Os picos cromatográficos de cada extrato amostrado foram comparados com os picos da mistura de hidrocarbonetos (alcanos) utilizando o Índice de Retenção (IR). A fórmula utilizada para o cálculo do IR está ilustrada na **Figura 4**, onde o eixo x” representa o IR (Número de Carbonos x 100) e o “eixo y” o tempo de retenção (minutos) das amostras.

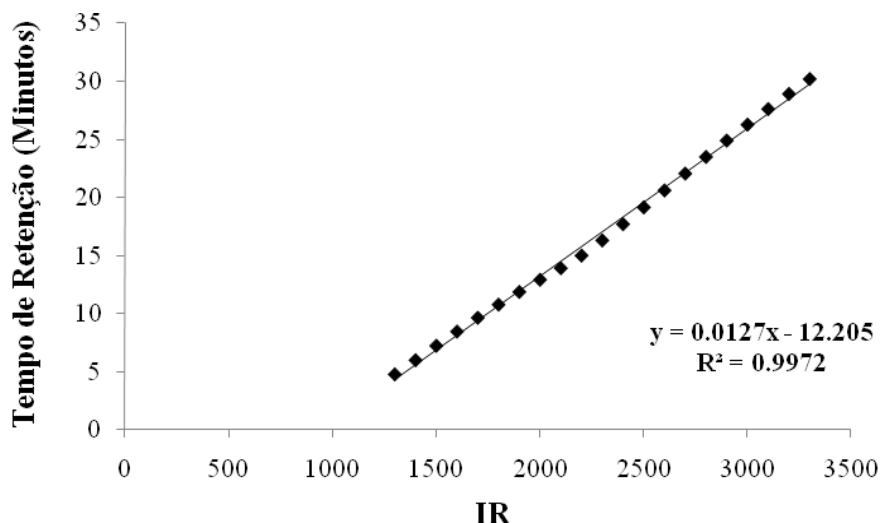


Figura 4- Fórmula utilizada para o cálculo do Índice de Retenção (IR) onde o “eixo x” representa o IR ($nC \times 100$) e o “eixo y” o tempo de retenção (minutos) das amostras após injeções da mistura de hidrocarbonetos (C_{13} - C_{33}) ($n=5$).

4 - Resultados

Observou-se que os tempos de 20 min., 2 h e 24 h de extração, permitiram a visualização de picos cromatográficos (“pool” de diferentes insetos), porém o tempo de corrida de 30 min. deveria ser aumentado para a detecção de todos os picos gerados pela injeção dos extratos (cromatograma completo) (**Fig. 5A**). As outras amostras injetadas (extratos hexânicos de “pool” de mesmos insetos) nos tempos de extração de 20 min, 2 h e 24 h (ver item 3.2) confirmaram que no tempo de 30 min não seria obtido um cromatograma completo (**Fig. 5B**) para os extratos e que as extrações realizadas de “pool” de diferentes insetos geravam maior resposta dos picos (eixo y). Com isso, o tempo de corrida foi aumentado para 50 min.

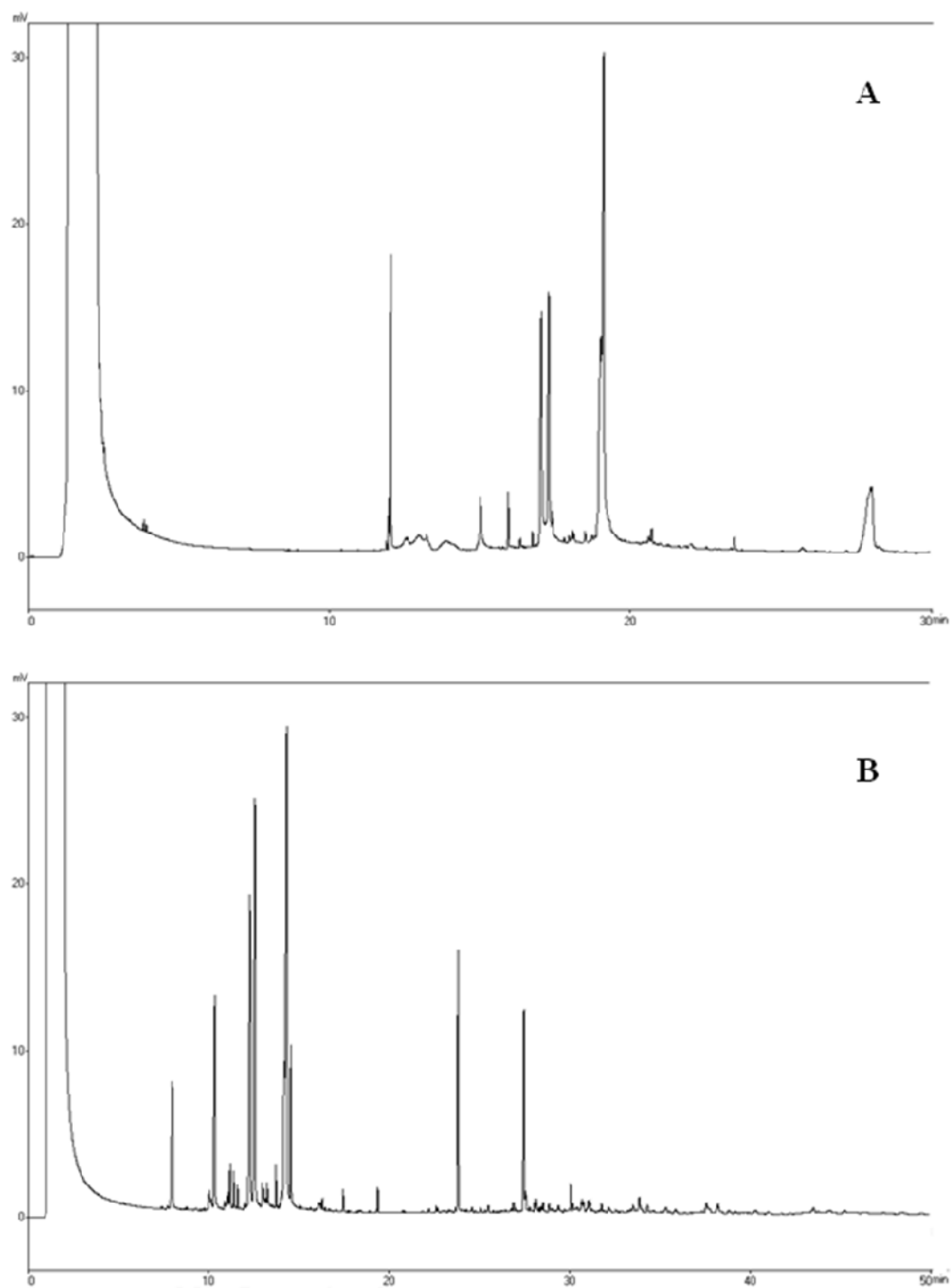


Figura 5- Perfis cromatográficos de extratos hexânicos: **A)** 50 ♂ de *Lutzomyia longipalpis s.l.* no tempo de 30 minutos de corrida; **B)** 50 ♀ de *Lutzomyia longipalpis s.l.* no tempo de 50 minutos de corrida.

4.3. Observação do tempo de extração dos compostos cuticulares por GC

Foi observado um padrão na detecção dos picos cromatográficos, tanto para machos como para fêmeas (**Fig. 6A e B**). Para os machos os tempos de 10 (21 picos) e 20 minutos (51 picos), apresentaram um maior número de picos. Para fêmeas essas observações puderam ser feitas nos tempos de 10 (46 picos), 20 (28 picos) e 30 minutos (64 picos). Embora, não tenha identificado se esses compostos se tratavam de hidrocarbonetos, optou-se por trabalhar no tempo de extração de 20 minutos, cuja média de picos somados, produzidos por machos e fêmeas, foi a maior (40 picos).

4.4. Verificação do número de flebotomíneos a serem utilizados para detecção dos compostos por CG

Foi observado que o número de flebotomíneos interferiu no número de picos cromatográficos, bem como nas respostas geradas pelos mesmos (10 insetos= 35 picos; 20 insetos= 32; 50 insetos= 95 picos; 100 insetos= 125 picos). Quanto maior o número de insetos utilizados para a extração, maior foi a quantidade de picos detectados pelo CG e maior a resposta dos perfis cromatográficos (ver eixo “y” do gráfico- **Fig. 7**). Como não era possível saber quais dos picos eram gerados por hidrocarbonetos optou-se por trabalhar com o maior número de insetos (100), quando se dispunha de quantidades suficientes para as análises.

4.5. Comparação dos extratos de *Lutzomyia longipalpis* s.l., provenientes das populações do Pará, Minas Gerais e Piauí

As populações de Minas Gerais e do Piauí apresentaram picos com o mesmo tempo de retenção do feromônio sexual feromônio 9-metil germacreno-B (**Fig. 8A e B**). No entanto nos extratos de machos de *L. longipalpis* s.l. oriundos do Pará não foi observada a sobreposição com o pico do feromônio (**Fig. 8C**).

As **Figuras 9, 10 e 11** mostram os perfis cromatográficos de machos e de fêmeas das mesmas populações de *L. longipalpis* s.l. provenientes dos diferentes Estados de Minas Gerais, Pará e Piauí, respectivamente. Baseado no tempo de retenção dos compostos, alguns possíveis hidrocarbonetos (C) puderam ser plotados nestas figuras e ainda, através da análise do IR foi possível

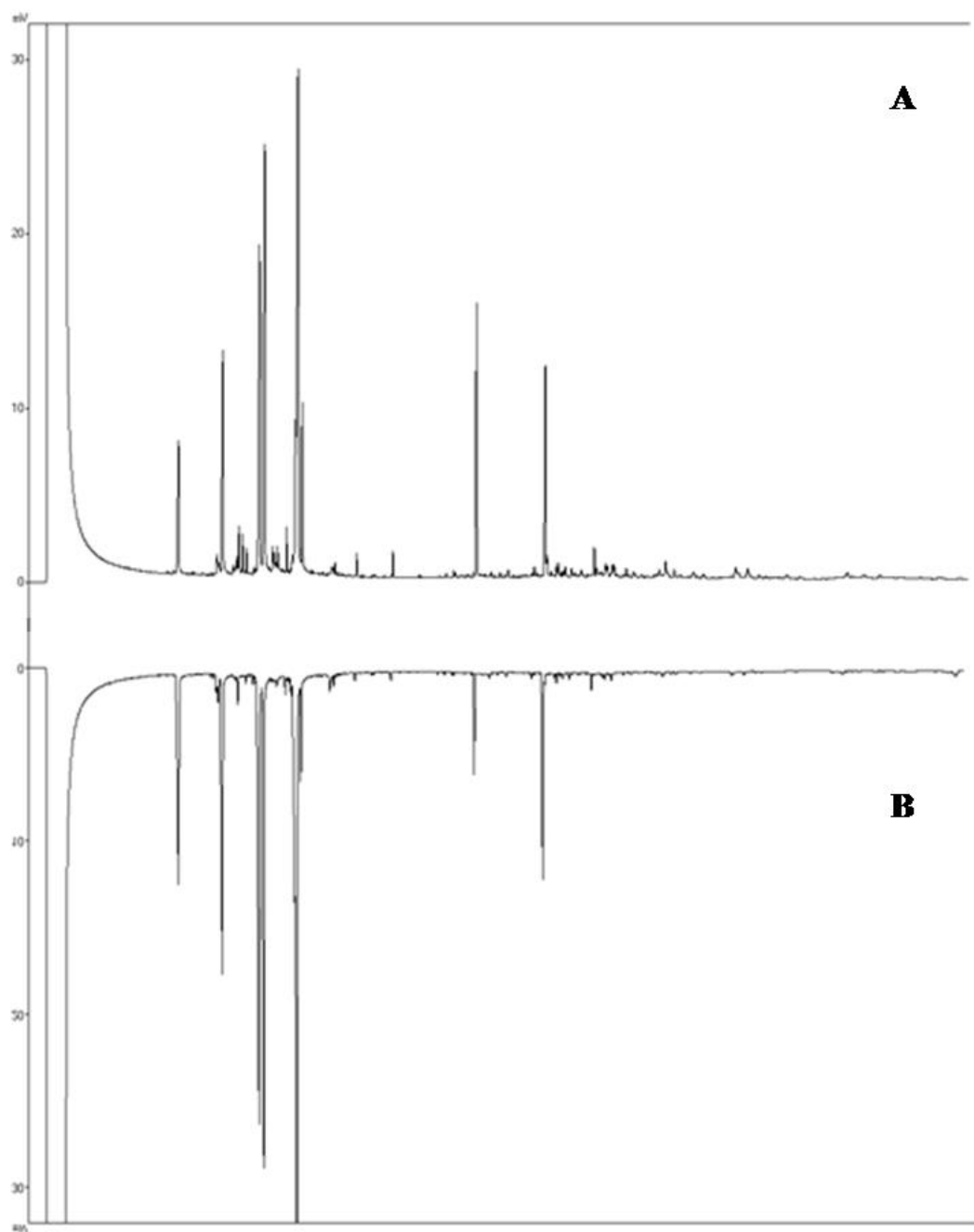


Figura 6- Perfis cromatográficos de extratos hexânicos: **A)** 50 ♂ de *Lutzomyia longipalpis s.l.* no tempo de 30 minutos de extração; **B)** 50 ♀ de *Lutzomyia longipalpis s.l.* no tempo de 20 minutos de extração.

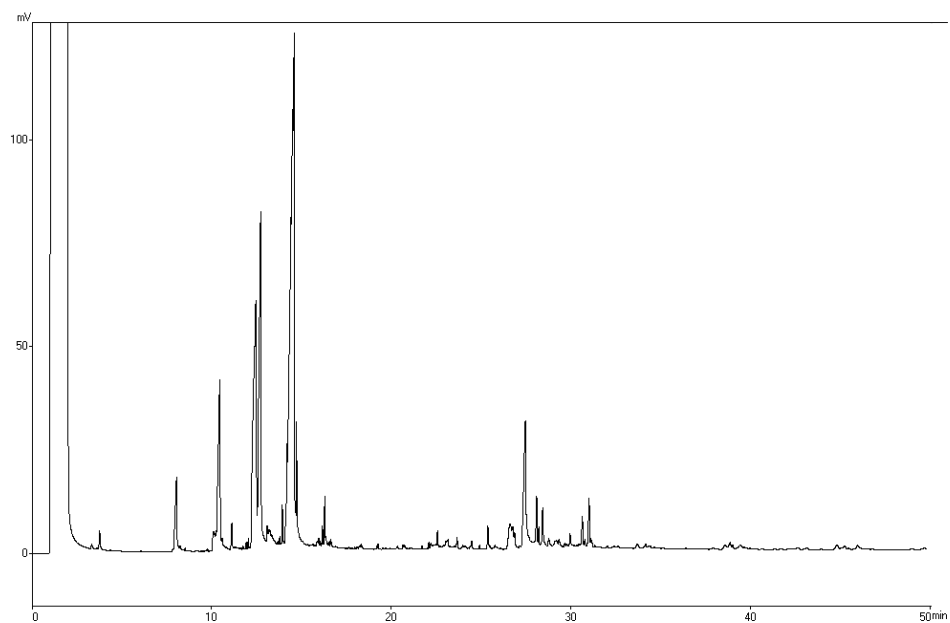


Figura 7- Perfil cromatográfico de extrato hexânico (20 minutos) de 100 ♂ de *Lutzomyia longipalpis s.l.* de Lagoa Santa, Minas Gerais (Total de picos= 125)

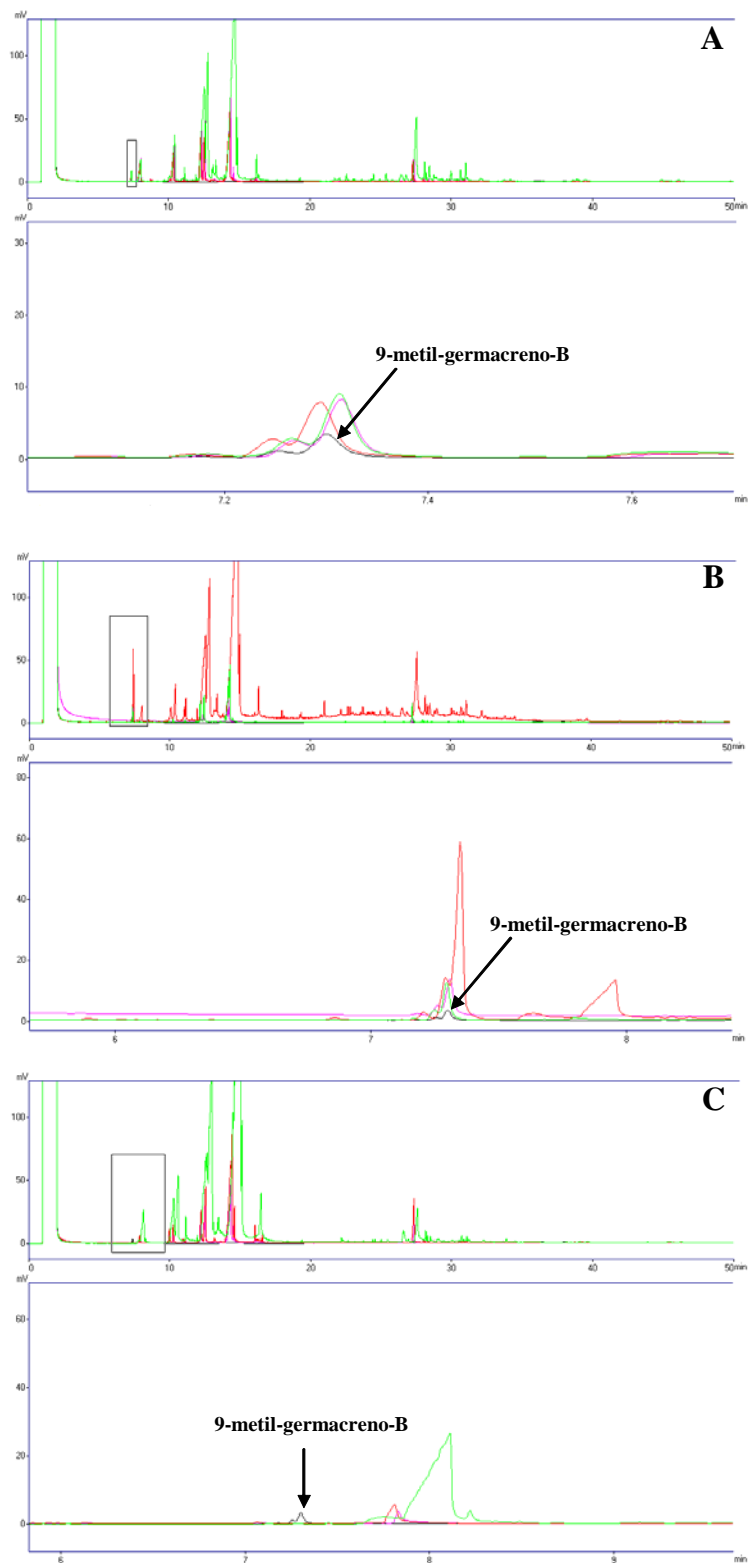


Figura 8- Sobreposição dos perfis cromatográficos de machos de *Lutzomyia longipalpis s.l.* (n de insetos= 100, tempo de corrida= 50 minutos) de Minas Gerais (A), Piauí (B) e Pará (C) com o feromônio sintético do 9-metil-germacreno-B gerados por Cromatografia Gasosa (cromatogramas coloridos-verde, rosa, vermelho-representam 3 repetições dos extratos).

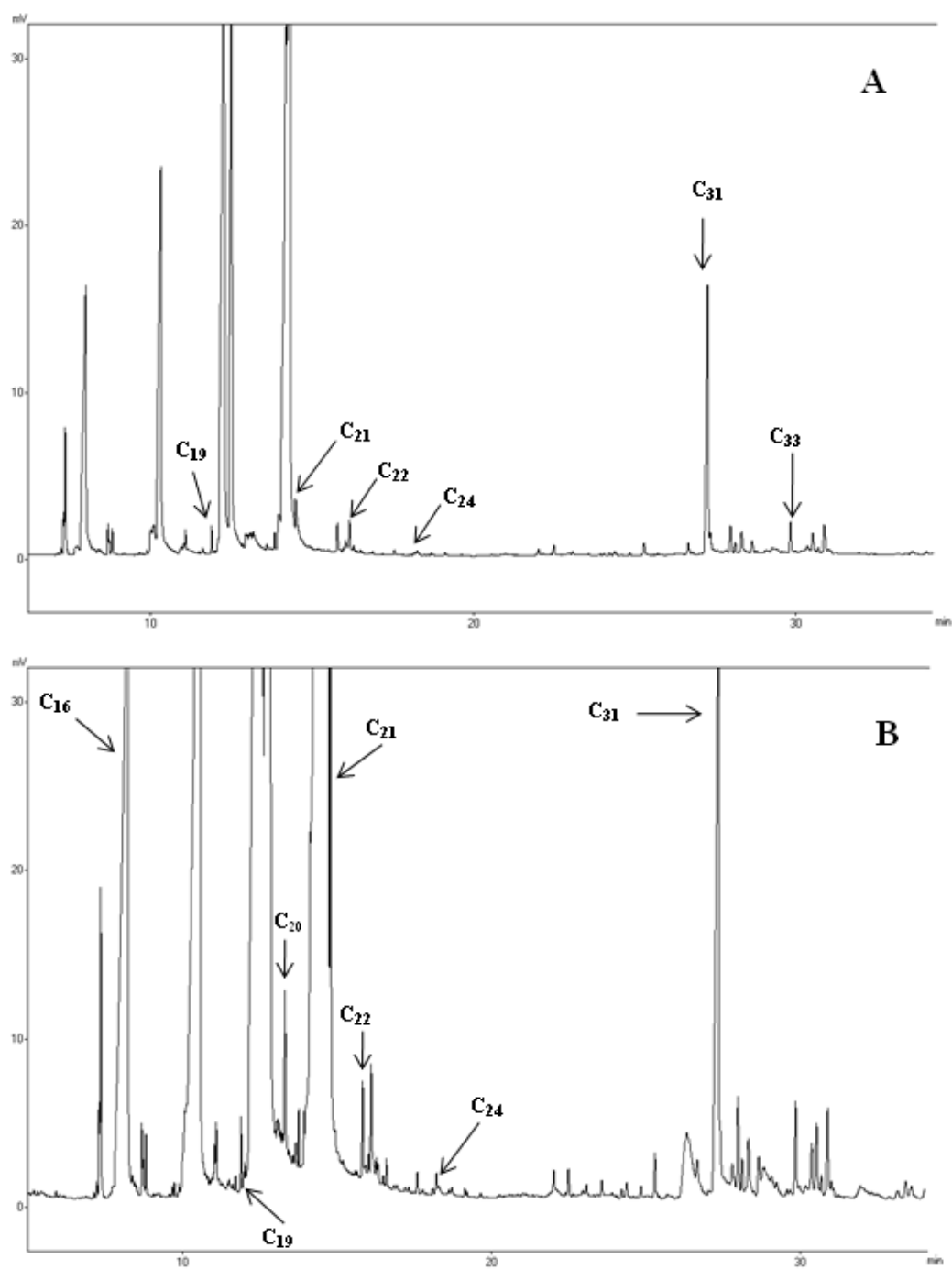


Figura 9- Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 100 machos (A) e 100 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* s.l. (100 insetos/1ml de hexano durante 20 minutos de extração) provenientes de Lagoa Santa, Minas Gerais (Programação cromatográfica= 50 minutos).

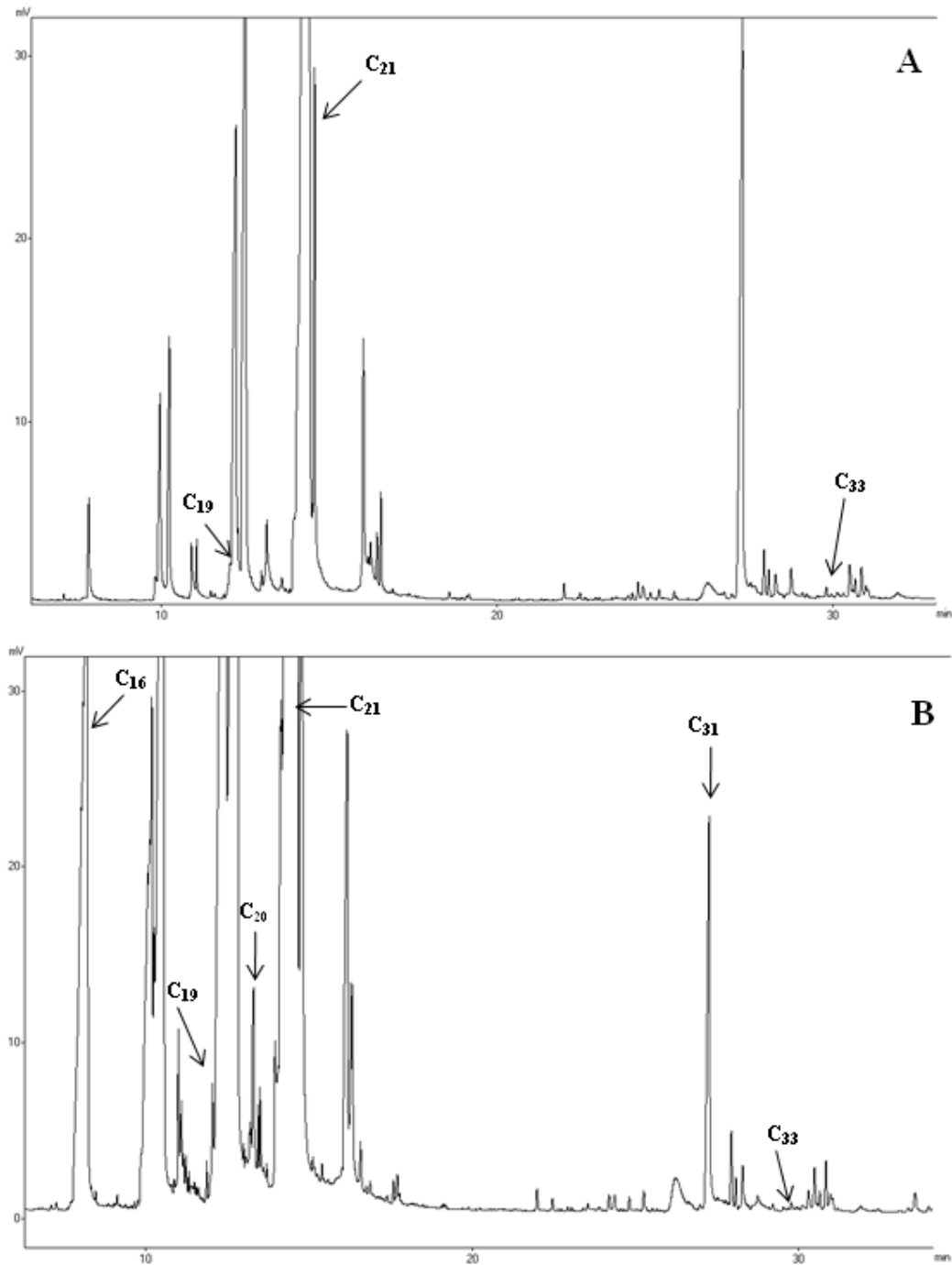


Figura 10- Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 100 machos (**A**) e 100 fêmeas (**B**) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* s.l. (100 insetos/1ml de hexano durante 20 minutos de extração) provenientes da Cametá, Pará (Programação cromatográfica= 50 minutos).

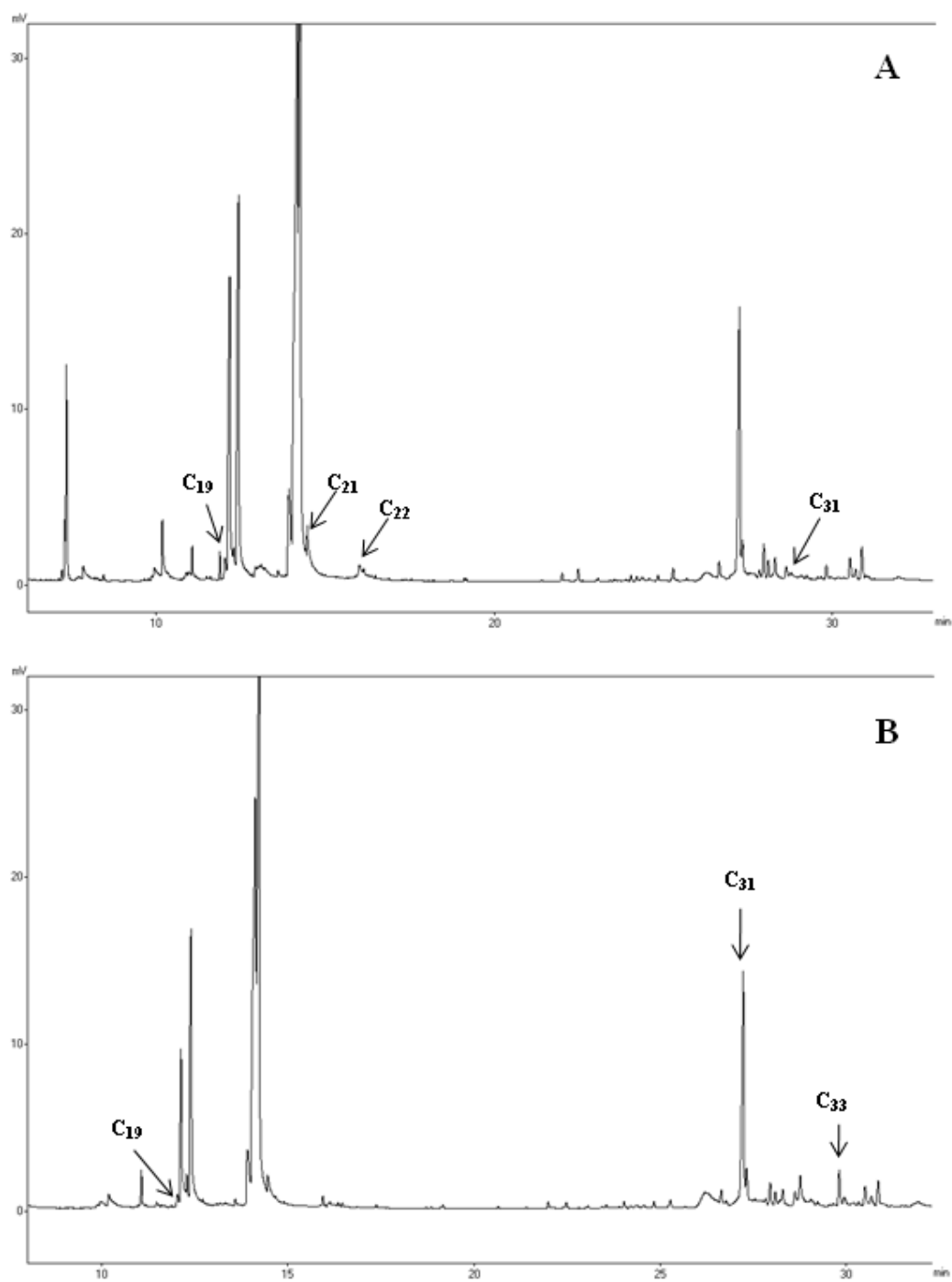


Figura 11- Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 100 machos (A) e 100 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis s.l.* (100 insetos/1ml de hexano durante 20 minutos de extração) provenientes de Teresina, Piauí (Programação cromatográfica= 50 minutos).

observar que nem sempre o pico de maior intensidade representava um HCC (**ANEXOS A e B**). A comparação foi feita com o tempo de retenção gerado pelo padrão de alcanos injetado (C₁₃-C₃₃), mostrou que nenhum dos compostos se sobrepôs ao pico gerado pelo algodão usado na filtragem dos extratos (**Fig. 12**).

As **Tabelas 1 e 2** mostram os possíveis compostos, na mesma posição dos alcanos lineares do padrão, presentes em machos e fêmeas de cada uma das populações (três repetições), respectivamente, e suas frequências relativas. Ao todo foram encontrados nove HCCs para machos de Minas Gerais e do Pará e 15 para as populações do Piauí. Somente machos de *L. longipalpis s.l.* provenientes de Minas Gerais registraram o pico do C₂₂ e os machos do Pará para o C₁₆. Já machos provenientes do Piauí apresentaram picos para C₁₅, C₂₆, C₂₅ e C₂₈. Quando comparados os HCCs de cada uma dessas populações de machos foi possível notar maior similaridade no número de picos cromatográficos dos possíveis HCCs entre indivíduos provenientes de Minas e do Piauí (oito picos), bem como entre Pará e Piauí (oito picos) e menor similaridade entre Minas Gerais e Pará (quatro picos). Para fêmeas das populações de Minas Geras, Pará e Piauí foram registrados oito, 10 e quatro picos de possíveis HCCs, respectivamente. Assim como nos machos de Minas Gerais somente as fêmeas apresentaram registro para o C₂₂. Somente as fêmeas de *L. longipalpis s.l.* do Pará registraram picos para o C₁₈, C₂₇ e C₃₂ (**Tabela 2**). Na similaridade entre os picos o inverso do que aconteceu para machos foi observado para as fêmeas onde, os possíveis HCCs se mostraram mais semelhantes entre populações do Pará e Minas Gerais (sete picos), do que entre Minas Gerais e Piauí ou Pará e Piauí (quatro picos cada).

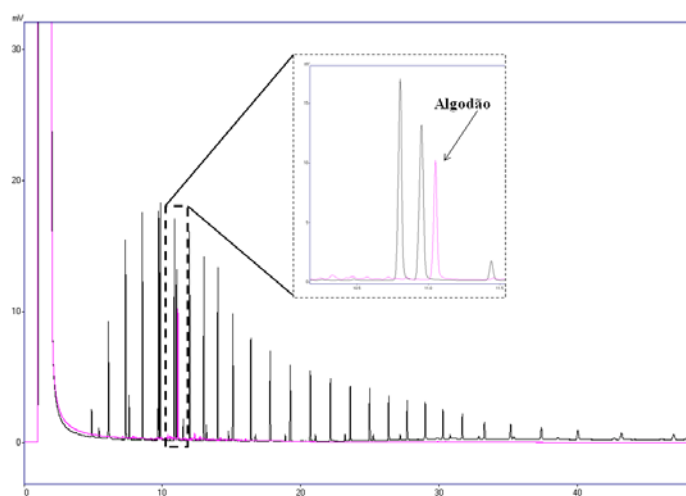


Figura 12- Perfil cromatográfico da mistura de hidrocarbonetos (C₁₃-C₄₀) utilizada como padrão para cálculo do Índice de Retenção e relação ao pico cromatográfico do algodão utilizado para a filtragem das amostras

Tabela 1- Possíveis Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) extraídos de 100 machos de *Lutzomyia longipalpis* s.l. (n= 3) provenientes dos Estados de Minas Gerais, Pará e Piauí identificados através do Índice de Retenção (IR) gerado pela mistura de alcanos (C₁₃-C₄₀) e sua porcentagem de área (%).

HCCs	Machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i>					
	IR Minas Gerais		IR Pará		IR Piauí	
		(%)		(%)		(%)
C₁₃	-	0	-	0	-	0
C₁₄	-	0	-	0	-	0
C₁₅	-	0	-	0	1499*	0,007
C₁₆	-	0	1602*	0,28	-	0
C₁₇	-	0	-	0	-	0
C₁₈	-	0	1796	0,41	1804	0,003
C₁₉	1902	0,01	1903	0,34	1901	0,14
C₂₀	2004	2,38	2001	0,013	2000	0,073
C₂₁	2105	10,59	2095	3,88	2096	0,43
C₂₂	2198*	0,2	-	0	-	0
C₂₃	-	0	2302	0,013	2301	0,22
C₂₄	2400	0,01	-	0	2405	0,01
C₂₅	-	0	-	0	2505*	0,02
C₂₆	-	0	-	0	2598	0,03
C₂₇	-	0	2702	0,06	2701	0,13
C₂₈	-	0	-	0	2800*	0,04
C₂₉	2897	0,007	-	0	2900	0,04
C₃₀	2998	0,007	-	0	3004	0,3
C₃₁	3097	1,57	-	0	3098	2,72
C₃₂	-	0	3205	0,008	3199	0,2
C₃₃	3300	0,04	3302	0,034	3303	0,013

*: Picos de possíveis HCCs que ocorreram somente nestas populações.

Tabela 2- Possíveis Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) extraídos de 100 fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* s.l. (n= 3) provenientes dos Estados de Minas Gerais, Pará e Piauí identificados através do Índice de Retenção gerado pela mistura de alcanos (C₁₃-C₄₀) e sua porcentagem de área (%).

HCCs	Fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i>					
	IR		IR		IR	
	Minas Gerais	(%)	Pará	(%)	Piauí	(%)
C ₁₃	-	0	-	0	-	0
C ₁₄	-	0	-	0	-	0
C ₁₅	-	0	-	0	-	0
C ₁₆	1602	4,3	1602	3,2	-	0
C ₁₇	-	0	-	0	-	0
C ₁₈	-	0	1804*	1,9	-	0
C ₁₉	1901	0,05	1904	0,11	1903	0,19
C ₂₀	2003	0,11	2000	0,03	-	0
C ₂₁	2102	19,3	2104	6,8	2098	0,8
C ₂₂	2199*	0,2	-	0	-	0
C ₂₃	-	0	-	0	-	0
C ₂₄	2395	0,03	2404	0,003	-	0
C ₂₅	-	0	-	0	-	0
C ₂₆	-	0	-	0	-	0
C ₂₇	-	0	2704*	0,01	-	0
C ₂₈	-	0	-	0	-	0
C ₂₉	-	0	-	0	-	0
C ₃₀	-	0	-	0	-	0
C ₃₁	3099	0,8	3096	0,7	3100	4,03
C ₃₂	-	0	3205*	0,003	-	0
C ₃₃	3300	0,03	3301	0,003	3304	0,44

*: Picos de possíveis HCCs que ocorreram somente nestas populações.

4.6. Avaliação da técnica de CG para machos e fêmeas de *Lutzomyia whitmani*

Os hidrocarbonetos cuticulares de machos e fêmeas de *L. whitmani* procedentes dos Estados da Bahia, Pará, Minas Gerais e Paraná podem ser observados nas **Figuras 13, 14, 15 e 16**, respectivamente. Baseado no tempo de retenção dos compostos, os possíveis hidrocarbonetos (C) puderam ser plotados por comparação com o IR gerado pelo padrão de alcanos injetado (C₁₃-C₃₃).

As **Tabelas 3 e 4** mostram os possíveis alcanos lineares presentes em machos e fêmeas de cada uma das populações (uma repetição), respectivamente, e suas porcentagens de área. O C₃₁ estava presente em todos os machos das populações e o C₂₁ só não foi encontrado para os machos provenientes do Pará, enquanto o C₃₃ apareceu somente em *L. whitmani* provenientes de Minas Gerais e do Paraná.

Assim como os machos do Pará, as fêmeas apresentaram um pico cromatográfico somente para o C₃₁ (**Fig. 14**) e as fêmeas de Minas Gerais diferiram dos machos co-específicos por não apresentar registro para o C₃₁. No entanto a quantidade dos possíveis HCCs detectados em fêmeas de *L. whitmani* de Minas Gerais foi maior que de machos onde foram identificados o C₂₀, C₁₆, C₁₉, C₂₂, C₂₄ e C₃₀, sendo os cinco últimos hidrocarbonetos ausentes também em fêmeas da Bahia, Pará e Paraná. Os possíveis HCCs de machos e fêmeas de Minas Gerais foram diferentes entre os sexos (**Figura 15**).

Os hidrocarbonetos presentes em fêmeas da Bahia e do Paraná foram semelhantes (**Tabela 4**), porém somente as fêmeas do Paraná apresentaram um pico do C₃₃, mesmo quando comparada às fêmeas de Minas Gerais e do Pará.

É possível notar, ainda, uma semelhança entre os perfis cromatográficos de fêmeas e machos da mesma localidade, independente da presença dos possíveis HCCs que foram identificados em baixa frequência para ambos os sexos (**Figs. 13-16**).

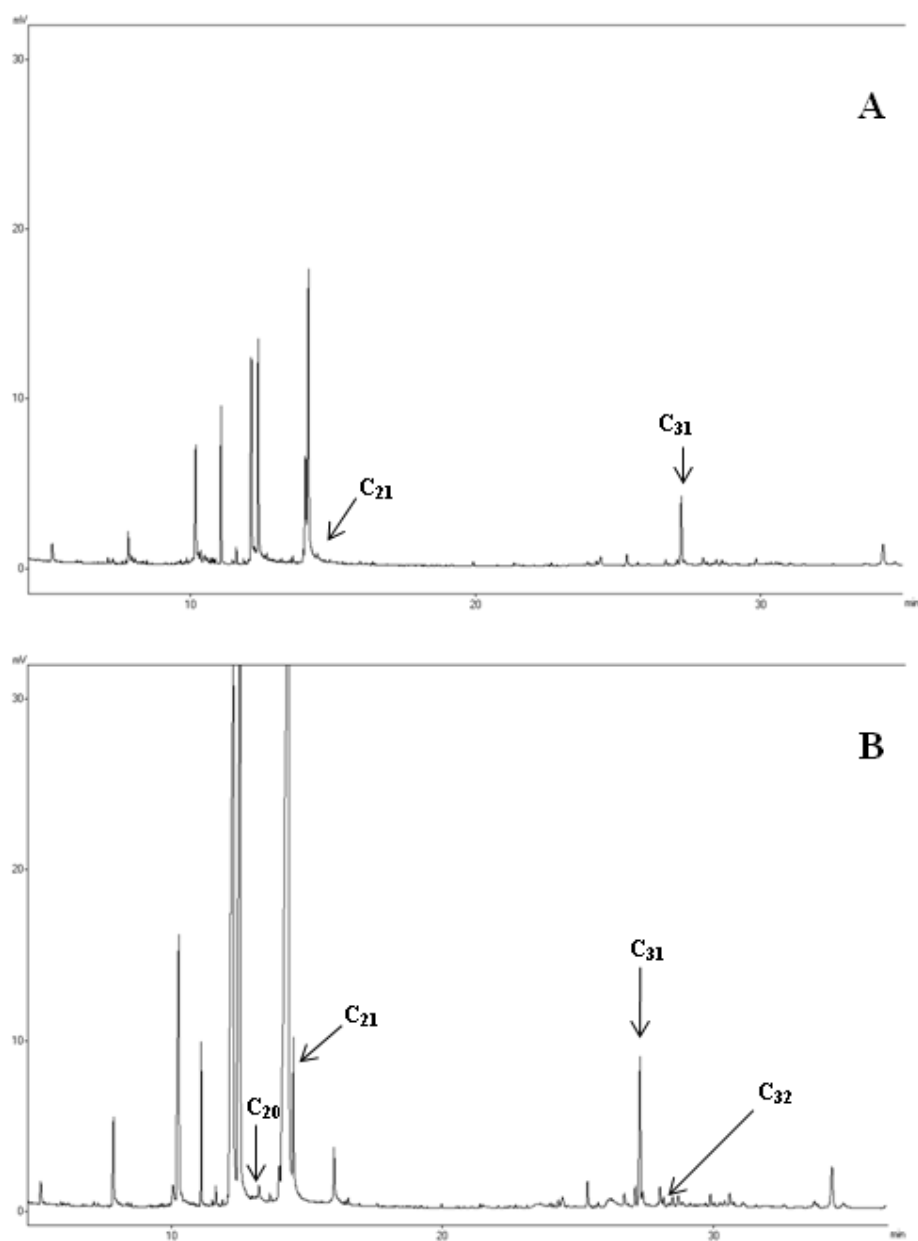


Figura 13- Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 72 machos (A) e 67 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia whitmani* durante 20 minutos de extração provenientes de Ilhéus, Bahia (Programação cromatográfica= 50 minutos).

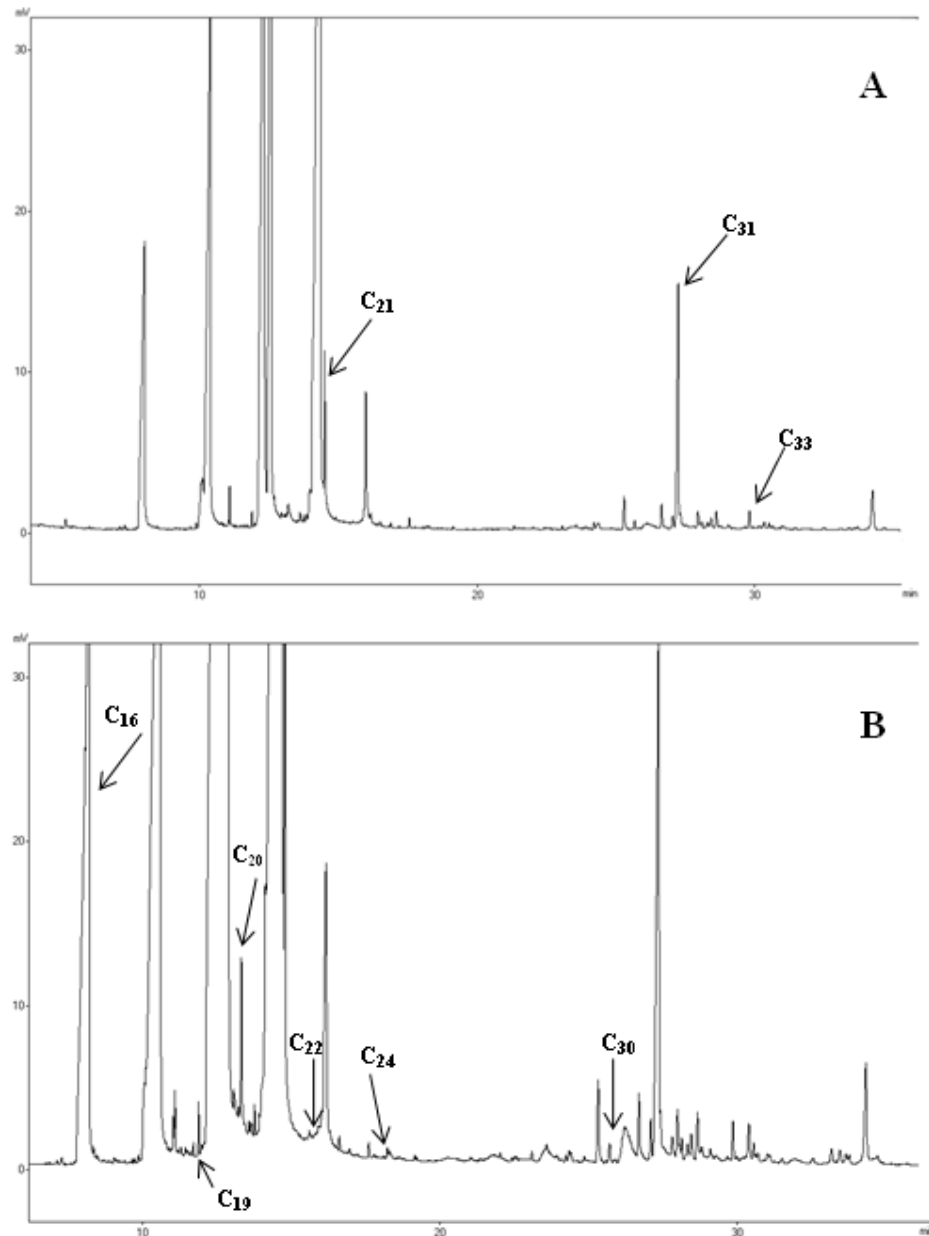


Figura 14- Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 100 machos (A) e 100 fêmeas (B) de flebotômíneos da espécie *Lutzomyia whitmani* durante 20 minutos de extração provenientes de Timóteo, Minas Gerais (Programação cromatográfica= 50 minutos).

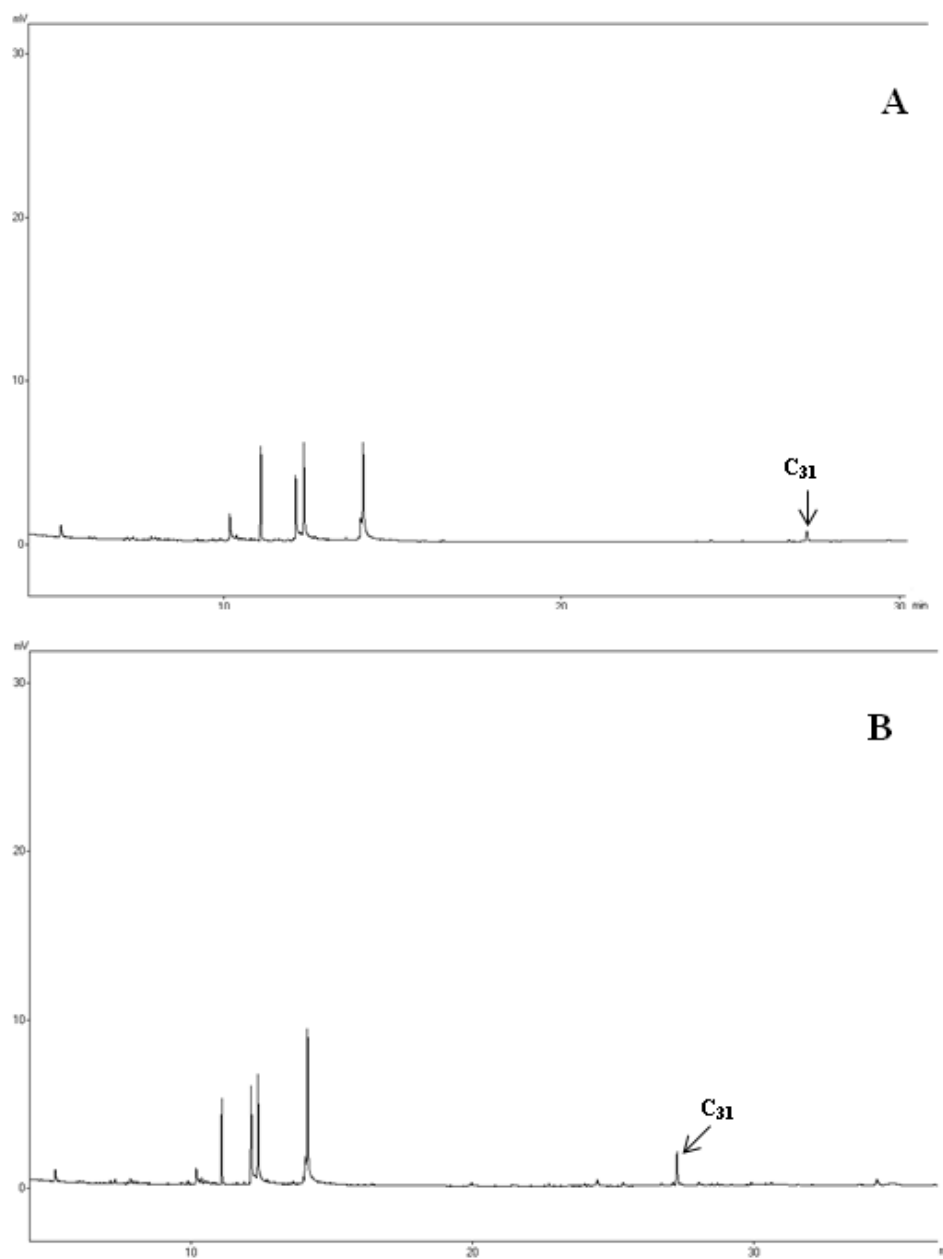


Figura 15- Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 37 machos (A) e 28 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia whitmani* durante 20 minutos de extração provenientes de Paragominas, Pará (Programação cromatográfica= 50 minutos).

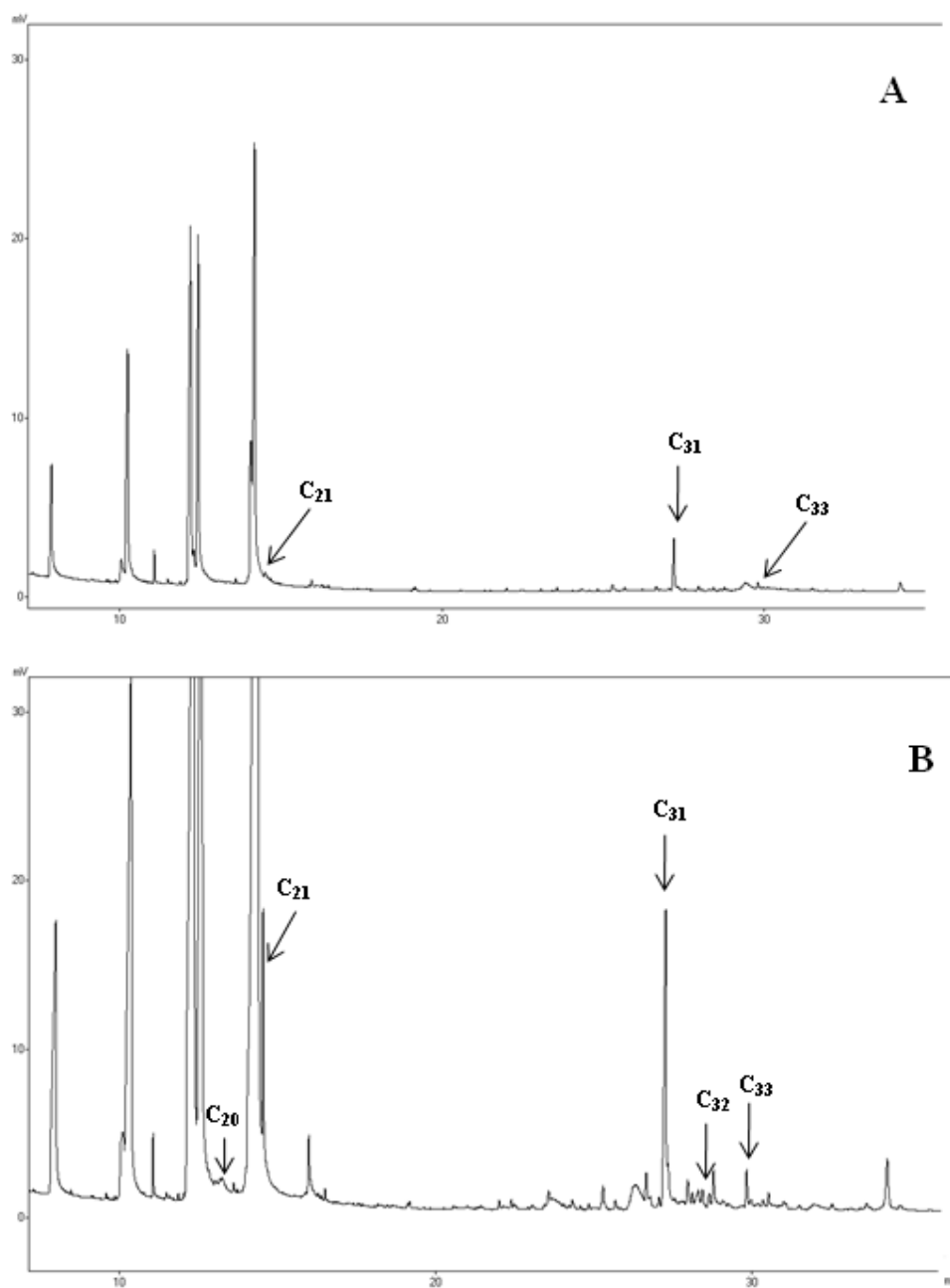


Figura 16- Hidrocarbonetos (C) de extratos hexânicos de 100 machos (A) e 100 fêmeas (B) de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia whitmani* durante 20 minutos de extração provenientes de Maringá e Mandaguari, Paraná (Programação cromatográfica= 50 minutos).

Tabela 3- Possíveis Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) extraídos de machos de *Lutzomyia whitmani* ($n= 1$) provenientes dos Estados da Bahia, Pará, Minas Gerais e Paraná identificados através do Índice de Retenção (IR) gerado pela mistura de alcanos (C₁₃-C₄₀) e sua porcentagem de área (%).

HCCs	Machos de <i>Lutzomyia whitmani</i>							
	IR		IR		IR		IR	
	Bahia	(%)	Pará	(%)	Minas Gerais	(%)	Paraná	(%)
C ₁₃	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₄	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₅	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₆	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₇	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₈	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₉	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₀	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₁	2097	0,47	-	0	2097	1,36	2097	0,36
C ₂₂	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₃	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₄	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₅	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₆	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₇	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₈	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₉	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₃₀	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₃₁	3100	4,99	3102	2,55	3101	2,93	3096	2,32
C ₃₂	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₃₃	-	0	-	0	3303	0,17	3302	0,26

Tabela 4- Possíveis Hidrocarbonetos Cuticulares (HCCs) extraídos de fêmeas de *Lutzomyia whitmani* ($n= 1$) provenientes dos Estados da Bahia, Pará, Minas Gerais e Paraná identificados através do Índice de Retenção (IR) gerado pela mistura de alcanos (C₁₃-C₄₀) e sua porcentagem de área (%).

HCCs	Fêmeas de <i>Lutzomyia whitmani</i>							
	IR		IR		IR		IR	
	Bahia	(%)	Pará	(%)	Minas Gerais	(%)	Paraná	(%)
C ₁₃	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₄	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₅	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₆	-	0	-	0	1602*	5,73	-	0
C ₁₇	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₈	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₁₉	-	0	-	0	1902*	0,01	-	0
C ₂₀	1997	0,21	-	0	2005		2000	0,18
C ₂₁	2097	2,44	-	0	-	0	2101	2,40
C ₂₂	-	0	-	0	2202*	0,25	-	0
C ₂₃	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₄	-	0	-	0	2398*	0,02	-	0
C ₂₅	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₆	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₇	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₈	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₂₉	-	0	-	0	-	0	-	0
C ₃₀	-	0	-	0	2995*	0,01	-	0
C ₃₁	3104	2,63	3102	6,60	-	0	3103	3,32
C ₃₂	3199	0,15	-	0	-	0	3195	0,17
C ₃₃	-	0	-	0	-	0	3305*	0,31

*: Picos de possíveis HCCs que ocorreram somente nestas populações.

5. Discussão

A análise de HCCs envolve a determinação de diferenças espécie-específicas nos hidrocarbonetos contidos na camada de cera da cutícula (PHILLIPS *et al.*, 1988), sendo utilizada na separação de espécies crípticas inseridas em complexos (CARLSON & SERVICE, 1980; MILLIGAN *et al.*, 1986; RYAN *et al.*, 1986; ROSA-FREITAS *et al.*, 1992; MILLIGAN *et al.*, 1993). Poucos são os estudos com flebotomíneos utilizando CG ou CG-EM para a identificação de HCCs, como ferramenta para a separação de complexos (RYAN *et al.*, 1986; KAMHAWI *et al.*, 1987; PHILLIPS *et al.*, 1990a, b; GEBRE-MICHAEL *et al.*, 1994; MAHAMAT & HASSANALI, 1998) e estes apresentam distintas metodologias de extração, identificação, quantificação e análises desses compostos.

No presente trabalho, embora nenhum registro cromatográfico tenha sido observado na Fase I, esta foi importante para considerar que, o gás de arraste utilizado (Hidrogênio) poderia ser o responsável pela não produção de picos cromatográficos. Porém, antes de considerar esse possível problema, seria necessário confirmar se o Cromatógrafo Gasoso estava registrando picos. Com isso foi injetado um extrato hexânico do tergito III de machos (a fresco) de *L. longipalpis s.l.*, provenientes da Gruta da Lapinha e foi detectado um pequeno pico. Injetou-se também um padrão de hidrocarboneto (C₂₁) e observou-se o pico do composto, descartando problemas no cromatógrafo ou mesmo com o gás de arraste utilizado na Fase I (Hidrogênio).

Já na Fase II, as observações levaram a considerar que a programação da rampa de corrida poderia não estar adequada para detecção dos picos pelo cromatógrafo, ou mesmo que os números de insetos (1-5) não seriam suficientes para os registros no CG. Com isso uma nova programação foi testada (aumentando o tempo de 30 para 50 minutos), alterando-se gás de arraste, usado na Fase I, pelo Hélio, o qual é preferido quando se emprega na CG o detector FID, já o Hidrogênio é utilizado para o detector do cromatógrafo por captura de elétrons (COLLINS *et al.*, 2006). Posteriormente, os resultados demonstraram que os testes utilizando de 1 a 5 flebotomíneos (testes 1, 2 e 3 da Fase I) não permitiria a detecção de picos cromatográficos, devido ao baixo número de indivíduos, pois quando aumentado esse número de 10 a 100 flebotomíneos para extração, foi observado que os perfis cromatográficos poderiam variar de acordo com o número de insetos e até mesmo entre os sexos. Com um tempo fixo para extração de 20 minutos, observou-se que o número de flebotomíneos realmente interferia no número de picos cromatográficos e na resposta dos mesmos. Tal

observação pôde ser realizada, pois foi mantida a mesma atenuação no Cromatógrafo Gasoso para interpretação dos cromatogramas (30mV). Nitidamente, esses registros cromatográficos foram mais intensos quando utilizados mais de 50 insetos/ extrato. A literatura não fornece uma metodologia padronizada sobre um número exato de flebotomíneos para extração de HCCs. Entretanto, a comparação de cromatogramas gerados, entre mesmas espécies ou espécies distintas de insetos, pode ser feita com números de indivíduos diferentes (PHILLIPS *et al.*, 1990) ou apenas com partes de insetos (JUÁREZ *et al.*, 2002).

Outro fator que poderia interferir nas leituras seria a idade dos insetos, para diferenciação dos compostos cuticulares identificados (HORNE & PRIESTMAN, 2002). No presente trabalho, não se tinha a idade controlada das populações de *L. longipalpis s.l.* Com isso, optou-se por trabalhar com um “pool” de insetos e com um número de flebotomíneos superiores ao de outros trabalhos (PHILLIPS *et al.*, 1990; MILLEST, 1992; MAHAMAT & HASSANALI, 1998). Ainda foi possível observar que, após determinada a programação da temperatura (50 minutos), o ideal seria trabalhar sempre com os insetos e posteriormente descartá-los. Devem ser utilizados números superiores a 20 flebotomíneos, quer sejam machos ou fêmeas, pelo menos quando as leituras forem baseadas na quantificação dos picos cromatográficos e nas respostas destes, como no presente trabalho. Para *L. whitmani* também não se tinha a idade dos insetos controlada, por serem provenientes de campo.

Devido às funções dos HCCs (HOWARD & BLOMQUIST, 2005), para *L. longipalpis s.l.*, esperava-se que um maior número, destes possíveis compostos, fosse encontrado nos flebotomíneos de Minas Gerais, uma vez que os exemplares de colônia (Pará e Piauí) sofreriam menos com fatores abióticos. Alguns autores sugerem que para estudos de sistemática de insetos e para estudos geográficos de populações, a análise de HCCs deve ser feita com insetos vindos de campo (GEBRE-MACIEL *et al.*, 1994; KAMHAWI *et al.*, 1987), como realizado para *L. whitmani* no presente trabalho. GEBRE-MICHAEL *et al.* (1994) não encontraram diferenças nos HCCs que seriam utilizados como marcadores quimiotaxômicos em espécies de *P. martini* e *P. celiae*, provenientes de laboratório, porém observaram grande diferenças nesses perfis entre espécimes provenientes de campo e laboratório. Entretanto comparando perfis cromatográficos de tabaníneos, estocados por um ou dois anos, não foi verificada grande mudança nas leituras quando comparadas à insetos frescos (HOPPE *et al.*, 1990).

As análises de HCCs de flebotomíneos permitem a separação de espécies crípticas e isomórficas, tão bem quanto diferenciar distintas populações entre mesmas espécies (RYAN

et al., 1986; KAMHAWI *et al.*, 1987). No presente trabalho, através do cálculo do IR, foi possível notar que alguns dos possíveis HCCs ocorreriam somente para populações de *L. longipalpi s.l.* de Minas Gerais, Pará ou Piauí, os quais poderiam funcionar como marcadores quimiotaxonômicos para as espécies analisadas. O C₂₂ parece ser exclusivo da espécie proveniente de Minas Gerais, tanto para machos como para fêmeas. Alguns HCCs, como C₁₇, C₂₄, C₂₇ e C₃₅ já foram identificados para flebotômicos e permitiu, através de análise discriminante, separar *L. wellcomei* e *L. complexa* (RYAN *et al.*, 1986). O C₂₄ e C₂₇ também foram detectados nos exemplares de *L. longipalpis s.l.* analisados no presente trabalho, porém o C₁₇ não foi detectado em nenhum dos sexos nas populações dessa espécie. Análises dos prováveis HCCs de machos das três populações de *L. longipalpis s.l.* não apresentaram uma marcante diversidade dos compostos identificados sendo que os cromatogramas foram semelhantes entre machos e fêmeas co-específicos de cada uma das populações.

A sobreposição dos cromatogramas mostrou ainda que os machos de *L. longipalpis s.l.* provenientes de Minas Gerais e do Piauí apresentaram picos no mesmo tempo de retenção do feromônio sexual sintético 9-metil-germacreno-B, levando a considerar que mesmo mortos os machos poderiam reter o feromônio na cutícula, o qual se sabe que é produzido por glândulas subcuticulares (LANE & SOUZA BERNADES, 1990). Possivelmente, o pico não foi detectado para os espécimes do Pará, pois o feromônio que se conhece para populações do Estado é um cembreno (tipo 1) (ARAKI *et al.*, 2009).

Toda a etapa de padronização da metodologia para extração de HCCs utilizando *L. longipalpis s.l.* como modelo, forneceu, além de uma caracterização desses possíveis hidrocarbonetos para a espécie, um direcionamento para a extração em *L. whitmani*, espécie também considerada como pertencente a um complexo (READY *et al.*, 1997, 1998; ISHIKAWA *et al.*, 1999; MARGONARI *et al.*, 2004). Para a primeira espécie as três repetições analisadas, através da CG, permitiram uma maior identificação e diversidade nesses possíveis HCCs. Já para *L. whitmani*, apenas uma repetição foi representada, devido a indisponibilidade de exemplares para as análises. No entanto uma comparação entre as duas espécies não seria possível por possuírem diferentes procedências (ex. campo, colônia, Estados).

A localidade-tipo de *L. whitmani* é Ilhéus, na Bahia (ver **Capítulo I**) e seria a população “padrão” para comparação entre os compostos e a população do Pará é considerada como silvestre (READY *et al.*, 1986; LAINSON, 1988), esperando-se até mesmo que os HCCs das populações procedentes desse Estado conservassem um padrão químico

“ancestral”. No entanto, dado ao baixo número de repetições, maiores inferências não puderam ser feitas quando comparadas àquelas populações (Bahia e Pará) às de Minas Gerais e do Paraná. Acredita-se que o número de insetos não tenha interferido nas análises, pois PHILLIPS *et al.* (1989) conseguiram separar fêmeas de *L. carrerai carrerai* de *L. yucumensis* utilizando 27 e 26 indivíduos, respectivamente. Menores números de flebotomíneos, do que àqueles do presente trabalho, também foram usados para diferenciar espécies de *Phlebotomus* e *Sergentomyia* no Quênia (MAHAMAT & HASSANALI, 1998). Possivelmente, a utilização da técnica de CG-EM para identificação dos HCCs, elucidaria melhor essas questões. Por outro lado, baseado nos resultados da CG, algumas observações puderam ser feitas referentes às populações nos quatro Estados brasileiros amostrados.

Tanto machos como fêmeas da espécie, provenientes do Pará, apresentaram somente o pico do C₃₁, possuindo menor diversidade química e com um perfil cromatográfico com menor número e intensidade de picos. Esse hidrocarboneto estava presente também nas outras populações, podendo ser descartado como um marcador quimiotaxonômico para *L. whitmani* desse Estado.

Nem os machos e nem as fêmeas da Bahia apresentaram compostos exclusivos para sua população, assim como para os espécimes do Pará, no entanto a sua caracterização química foi muito semelhante a da espécie proveniente do Paraná, mostrando certa similaridade entre as duas. O que aproximaria as populações de *L. whitmani* de Minas Gerais e do Paraná é o C₃₃. Inesperadamente, embora os perfis cromatográficos de machos e fêmeas de Minas Gerais tenham sido semelhantes, ambos os sexos apresentaram um perfil químico distinto para todos os compostos. A sabida liberação de feromônios sexuais por machos de flebotomíneos como *L. longipalpis*, *L. lenti*, *L. pessoai*, *L. cruzi*, *L. lichyi* e *L. carmelinoi* (HAMILTON *et al.*, 2002) permite supor que um dos hidrocarbonetos identificados (C₂₁, C₃₁ ou C₃₃) poderiam funcionar como o semioquímico para atração de fêmeas dessa população. Porém, para as outras populações essa inferência não pode ser feita, pois os possíveis HCCs presentes em machos também estavam presentes nas fêmeas.

Através de diferenças na biologia, morfometria e na sua capacidade vetorial *L. whitmani* tem sido sugerida como um complexo de espécies crípticas (LAINSON, 1988; RANGEL *et al.*, 1996). Baseado nestes resultados, *L. whitmani* seria uma espécie com grande capacidade de se adaptar a grandes mudanças ambientais e, conseqüentemente, a novos nichos ecológicos corroborando PETERSON & SHAW (2003), pois os possíveis HCCs identificados não permitiu inferir se *L. whitmani* estaria inserida em um complexo de espécies

crípticas. Por outro lado, a técnica de CG confirma-se como uma ferramenta para estudos de HCCs em populações de flebotomíneos. Com a metodologia padronizada, nas condições apresentadas (programação da coluna de 50 minutos utilizando 100 flebotomíneos no tempo de extração de 20 minutos em 1 ml de hexano) o próximo passo seria realizar um maior número de repetições ou uma análise por CG-EM, afim de buscar não só os HCCs, mas também outros compostos que poderiam funcionar como marcadores quimiotaxonômicos.

ANEXO A - Tabelas ilustrando que as maiores áreas geradas pelo pico cromatográfico não correspondem a possíveis hidrocarbonetos cuticulares de machos de *L. longipalpis* s.l. (uma repetição).

Gruta da Lapinha (MG)				Santarém/ Barcarena (PA)				Teresina (PI)				
Pico	Tempo	Área	%	Pico	Tempo	Área	%	Pico	Tempo	Área	%	IR
28	12.038	3284	0	28	11.204	28577	0,1	28	10.731	1097	0	1804
29	12.333	415811	5,5	29	11.273	17983	0,1	29	10.794	2385	0	1809
30	12.475	600434	7,9	30	11.357	8286	0	30	10.882	1136	0	1816
31	12.740	883842	11,6	31	11.415	13498	0,1	31	10.994	48626	0,4	1824
32	13.004	7712	0,1	32	11.529	18612	0,1	32	11.086	51445	0,4	1832
33	13.095	55664	0,7	33	11.651	7098	0	33	11.173	10495	0,1	1838
34	13.172	12778	0,2	34	11.726	9156	0	34	11.268	4807	0	1846
35	13.272	81672	1,1	35	11.904	18094	0,1	35	11.333	2843	0	1851
36	13.475	10464	0,1	36	11.993	3958	0	36	11.390	2992	0	1856
37	13.617	11451	0,2	37	12.353	350506	1,7	37	11.436	2386	0	1859
38	13.690	2991	0	38	12.428	214216	1	38	11.511	12913	0,1	1865
39	13.737	6395	0,1	39	12.494	419297	2	39	11.617	3808	0	1873
40	13.787	3046	0	40	12.687	956908	4,5	40	11.658	2117	0	1877
41	13.893	14109	0,2	41	12.752	653604	3,1	41	11.692	4394	0	1879
42	13.922	7785	0,1	42	12.990	1501925	7,1	42	11.756	2527	0	1884
43	14.563	2238675	29,5	43	13.053	903608	4,3	43	11.887	22887	0,2	1895
44	14.616	299704	3,9	44	13.097	508023	2,4	44	11.968	3279	0	1901
45	14.686	669716	8,8	45	13.241	8871	0	45	12.487	963140	7,5	1942
46	14.791	251364	3,3	46	13.391	93027	0,4	46	12.793	1265710	9,9	1966
59	18.313	1756	0	59	14.573	1038760	4,9	59	13.881	8521	0,1	2051
60	19.163	2584	0	60	14.638	457525	2,2	60	13.946	18603	0,1	2057
61	19.238	6498	0,1	61	14.789	1609435	7,6	61	14.004	28389	0,2	2061
62	19.669	1246	0	62	14.898	1353769	6,4	62	14.669	3236158	25,3	2113
63	21.680	7015	0,1	63	14.948	645187	3,1	63	14.746	923740	7,2	2119
64	21.777	2255	0	64	15.008	999213	4,7	64	14.840	909749	7,1	2127
65	21.986	1821	0	65	15.106	1791067	8,5	65	14.935	456179	3,6	2134
66	22.058	6117	0,1	66	15.193	1420631	6,7	66	15.276	4894	0	2161
67	22.456	1854	0	67	15.310	884203	4,2	67	15.391	3233	0	2170
128	42.647	1140	0	128	30.518	9613	0	128	20.774	19268	0,2	2594
129	44.864	10843	0,1	129	30.672	26840	0,1	129	20.837	10483	0,1	2598
130	45.295	4624	0,1	130	30.745	3891	0	130	20.959	68862	0,5	2608
131	45.505	1898	0	131	30.834	10637	0,1	131	21.076	6321	0	2617
132	46.053	14309	0,2	132	30.919	3416	0	132	21.175	11301	0,1	2625
133	46.432	1814	0	133	31.030	22826	0,1	133	21.197	3637	0	2627
134	49.714	1960	0	134	31.162	13474	0,1	134	21.239	13281	0,1	2630

ANEXO B- Tabelas ilustrando que as maiores áreas geradas pelo pico cromatográfico não correspondem a possíveis hidrocarbonetos cuticulares de fêmeas de *L. longipalpis s.l.* (uma repetição).

Gruta da Lapinha (MG)				Santarém (PA)				Teresina (PI)				
Pico	Tempo	Área	%	Pico	Tempo	Área	%	Pico	Tempo	Área	%	IR
1	7.155	1971	0,0	1	3.314	9742	1,1	1	7.237	3170	0,2	1529
2	7.236	11662	0,1	2	7.930	100788	11,2	2	7.284	10865	0,7	1533
3	7.285	38031	0,5	3	8.163	18792	2,1	3	7.870	51502	3,2	1579
4	7.670	4572	0,1	4	8.429	1152	0,1	4	9.786	8627	0,5	1729
5	8.163	532738	6,4	5	9.823	2895	0,3	5	9.938	45109	2,8	1741
6	8.312	1361	0,0	6	9.921	31254	3,5	6	10.055	3016	0,2	1751
7	8.620	9301	0,1	7	10.017	7947	0,9	7	10.239	83834	5,2	1765
8	8.662	3998	0,0	8	10.233	84786	9,4	8	10.873	8554	0,5	1815
9	8.749	7144	0,1	9	10.316	5360	0,6	9	11.024	5183	0,3	1827
10	9.607	1445	0,0	10	10.397	1314	0,1	10	11.836	1173	0,1	1891
11	9.679	1965	0,0	11	10.497	13502	1,5	11	12.017	10657	0,7	1905
12	9.821	1616	0,0	12	11.021	1839	0,2	12	12.189	171217	10,6	1918
13	10.517	875755	10,6	13	12.008	2759	0,3	13	12.486	254803	15,8	1942
14	10.904	1036	0,0	14	12.135	70996	7,9	14	13.074	2755	0,2	1988
15	10.979	6548	0,1	15	12.406	149235	16,5	15	13.133	4240	0,3	1993
16	11.036	7779	0,1	16	12.658	15274	1,7	16	13.566	1434	0,1	2027
17	11.111	1292	0,0	17	13.389	1010	0,1	17	13.800	2127	0,1	2045
18	11.453	2152	0,0	18	13.914	6197	0,7	18	13.933	27944	1,7	2056
19	11.671	1509	0,0	19	14.059	68771	7,6	19	13.957	12089	0,8	2057
20	11.840	7880	0,1	20	14.172	122520	13,6	20	14.228	483927	30,0	2079
21	11.930	2669	0,0	21	14.297	23096	2,6	21	14.327	294369	18,3	2087
22	11.968	3482	0,0	22	14.395	51685	5,7	22	14.477	37190	2,3	2098
23	12.369	690590	8,4	23	14.704	2050	0,2	23	16.009	1922	0,1	2219
24	12.453	383584	4,6	24	16.182	2122	0,2	24	21.989	1083	0,1	2689
25	12.544	471611	5,7	25	27.169	5330	0,6	25	22.467	2084	0,1	2727
26	12.797	1226840	14,8	26	34.720	5702	0,6	26	24.201	1676	0,1	2863
27	13.028	4171	0,1	27	35.033	29689	3,3	27	24.379	1269	0,1	2877
28	13.076	1951	0,0	28	35.144	17052	1,9	28	25.272	2499	0,2	2947
29	13.138	2315	0,0	29	35.183	6121	0,7	29	26.639	1477	0,1	3055
30	13.180	2275	0,0	30	35.230	23600	2,6	30	27.224	38565	2,4	3101
31	13.264	25711	0,3	31	35.523	10169	1,1	31	27.322	3274	0,2	3108
32	13.393	1258	0,0	32	35.607	3592	0,4	32	27.957	6681	0,4	3158
33	13.530	1465	0,0	33	35.684	5583	0,6	33	28.091	2328	0,1	3169
34	13.623	3981	0,0	34	35.684	5583	0,6	34	28.296	4562	0,3	3185
35	13.716	5343	0,1	35	35.684	5583	0,6	35	28.623	2156	0,1	3211
36	13.896	4744	0,1	36	35.684	5583	0,6	36	29.814	2043	0,1	3304
37	14.080	83782	1,0	37	35.684	5583	0,6	37	30.519	4485	0,3	3360
38	14.536	2012306	24,3	38	35.684	5583	0,6	38	30.678	1319	0,1	3372
39	14.619	604907	7,3	39	35.684	5583	0,6	39	30.866	5913	0,4	3387
40	14.660	377084	4,6	40	35.684	5583	0,6	40	33.622	1327	0,1	3604

Capítulo III

**A armadilha BG-Sentinela[®] como ferramenta para captura de flebotomíneos (Diptera:
Psychodidae: Phlebotominae)**

Resumo

ANDRADE, Andrey José de. **A armadilha BG-Sentinela[®] como ferramenta para captura de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**

O monitoramento de flebotomíneos é feito principalmente através de armadilhas luminosas do tipo CDC. A BG-Sentinela[®] (BGS) é uma armadilha utilizada para captura de culicídeos usando o atraente sintético BG-Lure[®] (BGL) que imita o odor humano e atrai o mosquito *Aedes aegypti* e outros insetos hematófagos. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência da BGS na captura de flebotomíneos. Quatro experimentos foram conduzidos em área peridomiciliar do município de Barcarena (Pará, Brasil): (1) comparar as armadilhas CDC, BGS e T-Trap (funil da BGS); (2) avaliar o atraente BGL com a melhor fonte luminosa, melhor altura e posição de abertura da BGS; (3) avaliar a BGS sem luz, com luz incandescente e luz UV; (4) avaliar a abertura da BGS em três diferentes posições (invertida, de lado e normal, a 40cm e 1,5m do solo) para capturar *Lutzomyia longipalpis s.l.* A armadilha CDC foi utilizada como controle em todos os testes de campo. Para todos os experimentos foi utilizado o delineamento de quadrado latino. Durante todos os experimentos, foram registradas 20 espécies de flebotomíneos. Os resultados demonstraram que BGS não foi eficiente na captura de flebotomíneos na ausência de luz, sendo a luz incandescente mais atrativa que a luz UV, embora sem diferença significativa. O BGL não aumentou a captura de flebotomíneos, na presença ou ausência de luz. A armadilha CDC capturou mais flebotomíneos que a BGS com os dois tipos de luz (incandescente e UV). Uma maior captura de flebotomíneos, incluindo *L. longipalpis s.l.*, foi observada posicionando-se a BGS com a abertura de sucção voltada para baixo, a 1,5m de altura. Esse é o primeiro trabalho testando a BGS na captura de flebotomíneos no Novo Mundo e foi mostrado que seriam necessárias algumas adaptações como altura de instalação, na posição da abertura de sucção e de fonte luminosa para se fazer desta armadilha uma nova ferramenta para captura de flebotomíneos, incluindo *L. longipalpis s.l.*

1. Introdução

Armadilhas utilizadas para monitoramento de espécies de insetos vetores podem ser instaladas em campo antes e após ações de educação implementadas por Secretarias de Saúde, mesmo que para conhecimento de fauna local (AMÓRA *et al.*, 2009). Para os flebotomíneos as ações de saúde para vigilância epidemiológica são direcionadas para onde ocorrem casos de leishmanioses, sejam para as formas tegumentar ou visceral. Estas ações vão desde a limpeza de peridomicílios, construção de galinheiros ou pocilgas distantes de residências, uso de inseticidas químicos no ambiente ou em coleiras para cães, ou mesmo com o uso de armadilhas (AMÓRA *et al.*, 2009). Recomenda-se ainda medidas de proteção individual, como o uso de mosquiteiros, e medidas educativas; controle de reservatórios, além do levantamento entomológico (MS, 2000, 2007).

No passado, para se evidenciar hospedeiros preferenciais, na hematofagia do grupo, fazia-se a exposição de iscas animais, como cães, galinhas, eqüinos e gambás em campo (QUINNELL *et al.*, 1992; XIMENES *et al.*, 1999; BONGIORNO *et al.*, 2003), assim como as iscas humanas para detecção de espécies antropofílicas (QUINNELL *et al.*, 1992; AGUIAR *et al.*, 1996; REBOLLAR-TELEZ *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 2001). Apesar da relevância do monitoramento deste grupo para a pesquisa faunística e epidemiológica das espécies, a exposição de seres humanos em ambientes de transmissão de leishmanioses, tornou-se, atualmente uma questão ética. Esse método de captura era realizado, principalmente, em associação com armadilhas luminosas, próximo a abrigos naturais das espécies. A captura poderia ser feita por meio do tubo capturador de Castro ou através da utilização de aparatos que dependiam de atrativos usados em combinação ou não, incluídas, neste caso, as armadilhas de pano, de luz ou àquelas nas quais pode utilizar iscas animais (MAROLI *et al.*, 1997). Entre estas, estão a armadilha de Disney e a armadilha de Shannon, sendo que nesta última o homem podia servir como isca para avaliação do nível de antropofilia das espécies do gênero *Lutzomyia* (VILELA *et al.*, 2003).

Uma prática comum é a utilização de armadilhas luminosas em campo como forma dessas substituir o problema ético da exposição de seres humanos como iscas. Embora o uso das armadilhas luminosas elimine a atração humana, algumas espécies de flebotomíneos são altamente antropofílicas e não fototrópicas (ALEXANDER *et al.*, 1995; TRAVI *et al.*, 1998), enquanto outras parecem ser mais fototrópicas que antropofílicas. Trabalhos de campo com

flebotomíneos de comportamento crepusculares ou noturnos, avaliando a resposta visual são pouco conhecidos, embora se saiba que ambos os sexos sejam atraídos por luz artificial emitidas por armadilhas, como a CDC (SUDIA & CHAMBERLAIN, 1962). Sabe-se que as espécies *L. longipalpis s.l.* pode distinguir cores e discriminar entre diferentes comprimentos de onda de diferentes intensidades (MELLOR & HAMILTON, 2003), o que teria importantes implicações no desenho de armadilhas luminosas. A sensibilidade espectral de *L. longipalpis s.l.* é similar a de *Aedes aegypti*, com máxima amplitude na região de 360 a 490 nm, entre luz UV e azul-verde-amarela.

A confecção de uma armadilha para captura e monitoramento de flebotomíneos deve ser baseada no comportamento das espécies: (1) fototropismo positivo; (2) hematofagia; (3) geotropismo negativo; e estas envolvem capturas manuais ou armadilhas com e sem atraentes (MAROLI *et al.*, 1997). Uma armadilha que permita o uso de compostos sintéticos que imitem o odor humano tem se mostrado necessária diante das dificuldades que existem para o monitoramento de flebotomíneos, utilizando somente armadilhas luminosas. Estudos em laboratório têm mostrado que o suor humano funciona como atraente para a espécie, mesmo sem o CO₂ (HAMILTON & RAMSSONDAR, 1994; REBOLLAR-TELLEZ *et al.*, 1999), o qual é considerado o principal cairomônio na atração de insetos hematófagos (EIRAS, 2001).

O ácido láctico é um importante cairomônio na atratividade de alguns dípteros hematófagos (EIRAS & JEPSON, 1996; PINTO, 2001; STEIB *et al.*, 2001) e tem seu efeito aumentado quando em combinação com a amônia (GEIER *et al.*, 1999). Estes dois compostos, juntamente com o ácido capróico, fazem parte do BG Lure[®] (BGL), uma formulação de cairomônios que tem apresentado eficiência na captura de *A. aegypti* em armadilhas BG-Sentinela[®] (BGS) (KRÖCHEL *et al.*, 2006; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2006). A BGS foi avaliada em campo demonstrando que este novo sistema, captura eficientemente diversas espécies de mosquitos, principalmente *A. aegypti* e *A. albopictus* (KRÖCKEL *et al.*, 2006; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2006, 2007; FELTNER & FERRAU, 2008; MEERAUS *et al.*, 2008). KRÖCKEL *et al.* (2006) demonstram que a BGS é mais eficiente, na captura dessas espécies, quando comparada a outros métodos de captura de adultos, como o aspirador costal, e as armadilhas CDC, Fay-Prince e Mosquito Magnet. Posteriormente, foi demonstrado em campo, que armadilhas CDC iscadas com o BGL apresentam taxas de captura maiores para machos e fêmeas de *L. longipalpis s.l.* que armadilhas que continham somente fonte luminosa como atrativo (ANDRADE *et al.*, 2008).

Entretanto, até o momento, não se testou a armadilha BGS, associada ou não com o BGL, na captura de flebotomíneos.

2. Objetivo

Testar a armadilha BG-Sentinela (BGS) na captura de flebotomíneos, enfatizando as respostas da espécie *Lutzomyia longipalpis s.l.*

2.1. Objetivos específicos

- 1- Comparar a armadilha BGS e sua variante T-trap na captura de flebotomíneos com a CDC;
- 2- Observar se a BGS iscada com o BG-Lure é atratividade para flebotomíneos;
- 3- Avaliar a interferência de diferentes fontes luminosas na eficiência de captura da armadilha BGS para flebotomíneos;
- 4- Avaliar a eficiência da armadilha BGS na captura da espécie *Lutzomyia longipalpis s.l.*

3. Material e Métodos

3.1. Área de estudo

O Pará é o segundo maior estado do Brasil com uma extensão de 1.253.164,5 km² e está situado no centro da Região Norte tendo como limites o Suriname e o Amapá ao norte, o oceano Atlântico a nordeste, o Maranhão a leste, Tocantins a sudeste, Mato Grosso a sul, o Amazonas a oeste e Roraima e a Guiana a noroeste. O relevo é baixo e plano e 58% do território encontram-se abaixo de 200 metros. As altitudes superiores a 500 metros estão nas serras de Carajás, Caximbo e Acari. O município de Barcarena localiza-se a uma latitude de 01°30'21"S e a uma longitude de 48°37'33"W (**Fig. 1**), estando a uma altitude de 15 metros em relação do nível do mar. Sua população estimada em 2004 era de 72.441 habitantes e possui uma área de 1.316,299 km². O clima é do tipo equatorial úmido com temperatura média anual de 27°C e intensidade pluviométrica acima de 2.500 mm por ano sendo as precipitações mais abundantes nos seis primeiros meses do ano (PACHECO *et al.*, 2007). A cidade é um importante pólo industrial, onde é feita a industrialização, beneficiamento e exportação de caulim, alumina e alumínio. O município foi caracterizado como área de transmissão intensa de Leishmaniose Visceral (CRESCENTE *et al.*, 2009). Todos os experimentos descritos abaixo foram realizados nesse município.

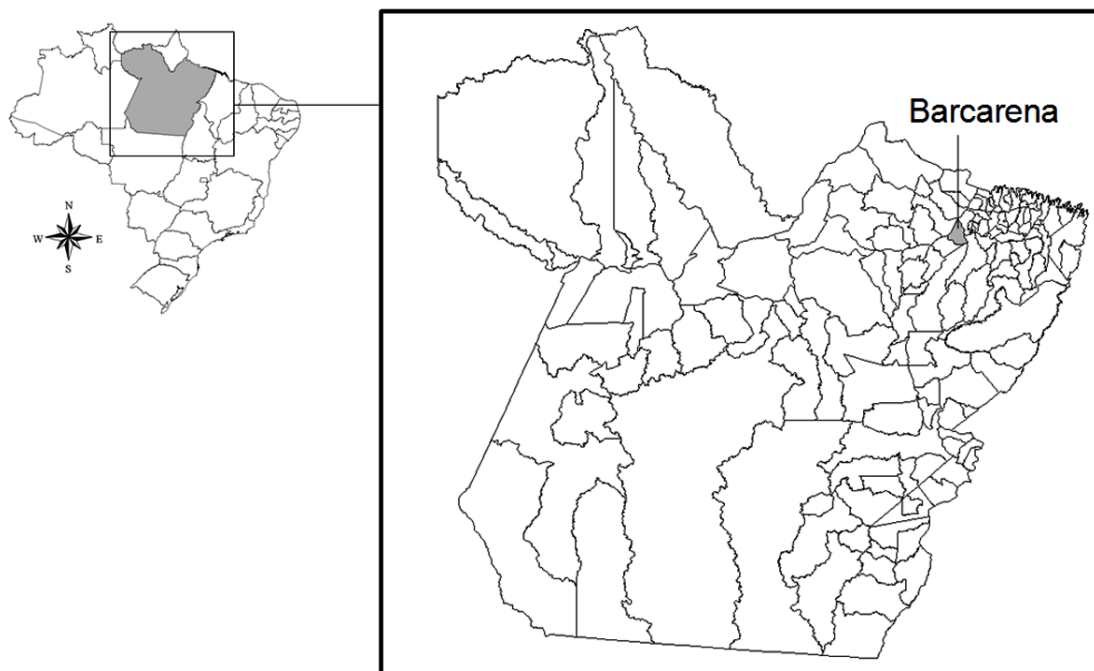


Figura 1- Município de Barcarena ($01^{\circ}30'21''\text{S}$, $48^{\circ}37'33''\text{W}$), localizado no Estado do Pará. (Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2009).

3.2. Delineamento experimental

EXPERIMENTO 1. Comparar a captura de flebotomíneos através das armadilhas BGS, T-trap e CDC

O desempenho da armadilha BG-Sentinela[®] (BGS) e de sua variante denominada T-Trap foram avaliados na captura de flebotomíneos em relação a CDC modificada, modelo HP (PUGEDO *et al.*, 2005) (controle). A armadilha BGS (Biogents BmGb, Regensburg, Alemanha) é composta por um cilindro branco de lona com 60cm de altura por 35cm de diâmetro, coberta na porção superior por um tecido branco. Apresenta um ventilador interno (12 volts) que promove sucção do ar para o interior da armadilha. Ao sair através do tecido da porção superior, o ar sugado para o interior da armadilha forma correntes de convecção como as geradas por um hospedeiro humano. Os insetos capturados ficam retidos em um saco coletor presente acima do ventilador, o que evita os danos causados pelas hélices aos exemplares coletados (ROSE *et al.*, 2006) (**Fig. 2**). A variante T-Trap (abertura de sucção + tubo + ventilador) corresponde a parte interna da BGS (13 cm de altura x 5,5 cm de diâmetro) e assim como a CDC não permite o refluxo do ar (**Fig. 2**).

As armadilhas foram instaladas próximas a um galinheiro, com aproximadamente 2m de distância, com sua abertura de sucção a 1,5 m do solo seguindo um delineamento de quadrado latino 3x3 (**Fig. 3**) totalizando 6 noites e duas repetições. Nas armadilhas, BGS e T-Trap, foi adaptado um bulbo luminoso de luz incandescente, o qual permanecia ligado a uma bateria de 6 volts (Newmax FNC 6100, Dong Ho Electric Ltda., Coréia do Sul) de 18:00h às 06:00h do dia seguinte (**Figs. 2 e 3**).

EXPERIMENTO 2. Avaliar a altura da BGS com luz incandescente e com o atraente sintético BGL

Após testar a armadilha BGS na presença de luz incandescente, objetivou-se avaliar a influência de instalação (altura da abertura de sucção da BGS) e da presença do atraente BG-Lure[®] (BGL) na captura de flebotomíneos. Os tratamentos foram: (1) CDC luminosa sem BGL (controle a 1,5m do solo); (2) BGS com luz incandescente a 1,5m do solo; (3) BGS com luz incandescente no solo; (4) BGS com BGL e luz incandescente a 1,5m do solo; (5) BGS com BGL e luz incandescente no solo; (6) BGS com BGL e sem luz incandescente a 1,5m do solo; (7) BGS com BGL e sem luz no solo. Os experimentos foram realizados seguindo o

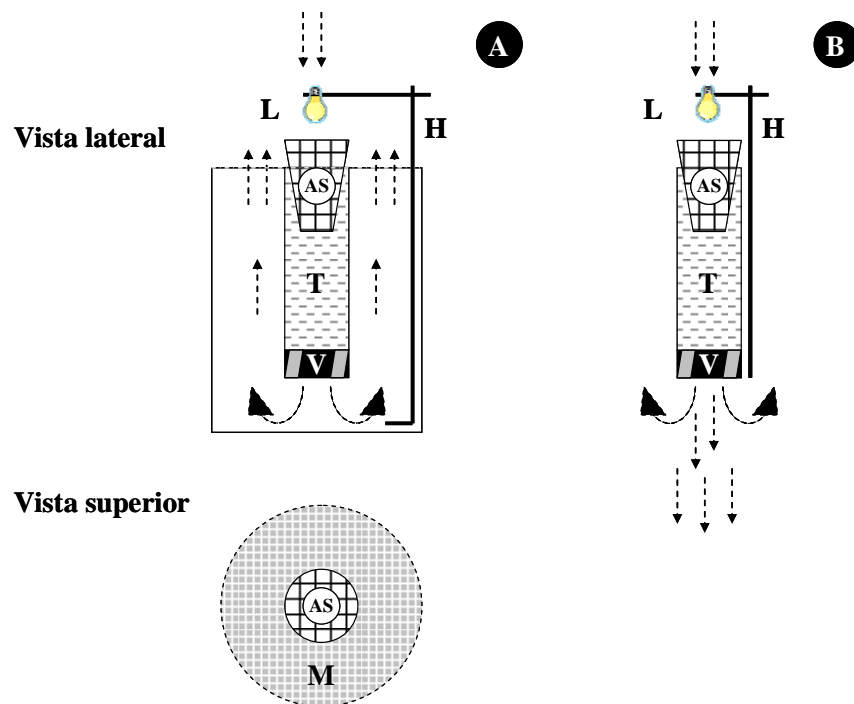


Figura 2- Representação esquemática das armadilhas BG-Sentinela (A) e T-Trap (B). AS: abertura de sucção contendo o saco coletor, T: tubo; V: ventilador; M: malha de cobertura; H: haste de fixação da luz incandescente (L).



Figura 3- BG-Sentinela e T-Trap dispostas a 1,5m de altura em torno de um galinheiro, na presença de luz incandescente (detalhe) (Barcarena, PA).

delineamento de quadrado latino 7x7 totalizando sete noites, com uma repetição com aproximadamente 2m de distância entre as armadilhas.

EXPERIMENTO 3. Avaliar a captura de flebotomíneos através das armadilhas CDC e BGS na ausência de luz, com luz incandescente e com luz UV

Na BGS foi adaptada uma haste contendo fonte de luz incandescente (3 watts) e de luz ultravioleta (UV) de 6 watts (Philips Electronics, São Paulo, SP), na parte superior da armadilha, sendo esta última também adaptada a CDC (**Fig. 4**).

Os tratamentos foram: (1) armadilha CDC-SL (sem luz); (2) CDC-LI controle (com luz incandescente); (3) CDC-LUV (com luz UV); (4) armadilha BGS-SL (sem luz); (5) BGS-LI (luz incandescente); (6) BGS-LUV (luz UV). As armadilhas CDCs foram instaladas a 1,5m de altura e as BGSs instaladas ao nível do solo seguindo as instruções do fabricante (www.bg-sentinel.com). O delineamento experimental foi quadrado latino 6x6, totalizando 18 noites consecutivas e 3 repetições com aproximadamente 2m de distância entre as armadilhas.

EXPERIMENTO 4. Avaliar a altura e posição da armadilha BGS na captura de *L. longipalpis* s.l.

Observações referentes a altura da BGS, tipo de luz e presença ou ausência do atraente BGL direcionaram um outro último experimento. Neste experimento foram avaliadas as alturas (40cm e 1,5m) e as posições da BGS (normal, invertida e lateral) na captura de flebotomíneos (**Fig. 5**). Cada armadilha foi instalada em sete pontos distintos, no interior de diferentes galinheiros: BGS invertida (abertura da BGS voltada para o solo) a 1,5m de altura do solo; BGS lateral (abertura da BGS voltada para o lado) a 1,5m de altura do solo; BGS normal (abertura da BGS voltada para cima) a 1,5m de altura do solo e nas mesmas posições, porém com a abertura de sucção a 40cm do solo (**Fig. 6**). Assim como nos experimentos anteriores, a armadilha CDC foi utilizada como controle, seguindo o delineamento do quadrado latino 7x7 totalizando sete noites, com uma repetição com mais de 100m de distância entre as armadilhas.

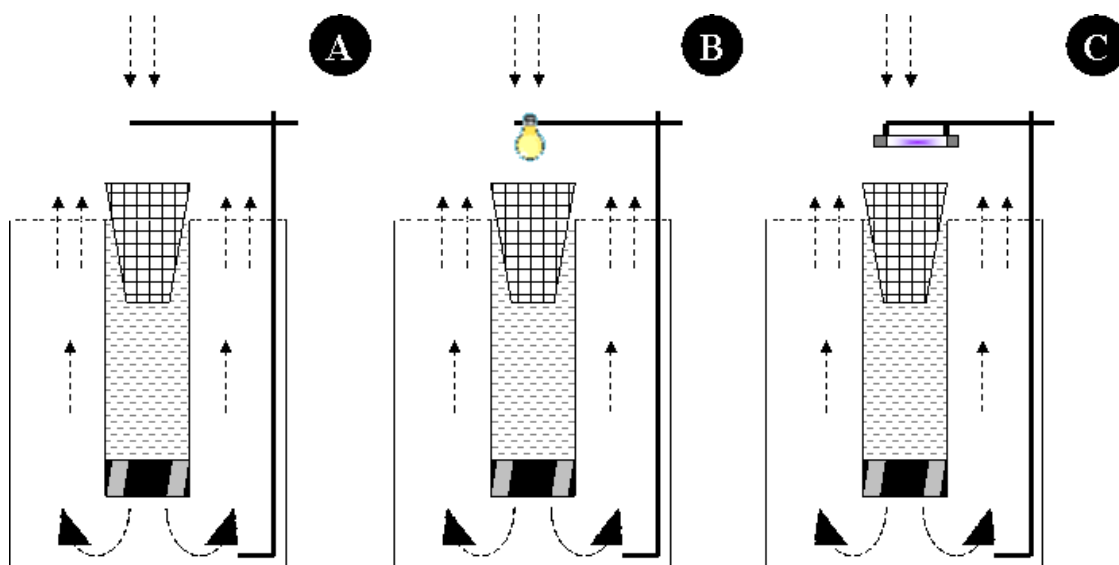


Figura 4- Representação esquemática da BG-Sentinela sem luz (A), com luz incandescente e (B) com luz ultravioleta (C).

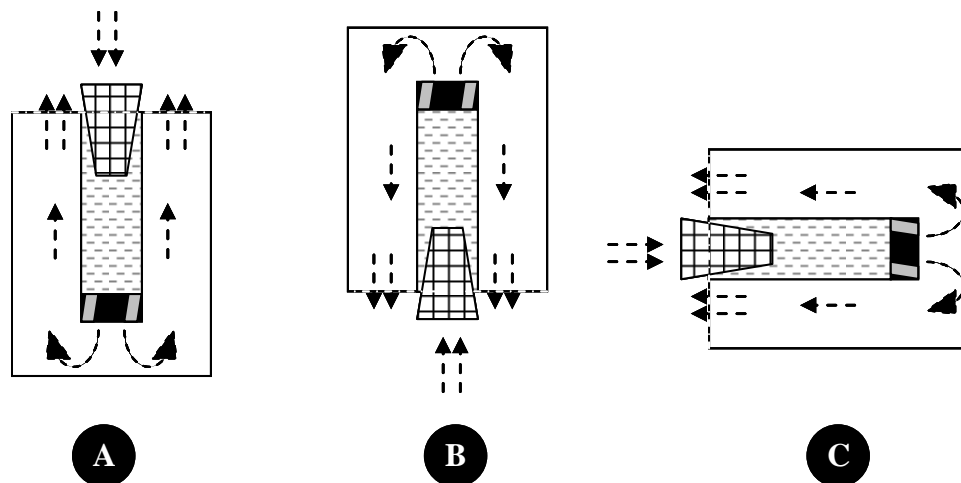


Figura 5- Representação esquemática da BG-Sentinela instalada na posição normal (A), invertida (B) e lateralmente (C).



Figura 6- Disposição da abertura de sucção a armadilha BG-Sentinela com luz incandescente na posição normal a 1,5 m do solo (**A**), BGS de lado a 1,5m do solo (**B**), BGS invertida a 1,5 m do solo (**C**), BGS normal a 40cm do solo (**D**), BGS de lado a 40cm do solo (**E**), BGS a 40cm do solo (**F**).

3.3. Triagem, montagem e identificação dos flebotomíneos

Os flebotomíneos coletados durante os experimentos foram levados para o Laboratório de Malária da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), localizado no município de Barcarena (PA), triados, etiquetados e colocados em tubos contendo álcool 70%. Posteriormente, o material foi transportado para o Departamento de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas, em Belém, para confecção das lâminas e identificação das espécies de acordo com a classificação proposta por YOUNG & DUNCAN (1994).

Alguns indivíduos não foram identificados ao nível de espécie devido à condição do material, portanto foram excluídos das análises (NI= não identificados). No Experimento 4, somente a espécie alvo do trabalho, *L. longipalpis s.l.*, foi identificada.

3.4. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a testes paramétricos (ANOVA e teste-t) quando esses seguiam distribuição normal. Caso a distribuição fosse não-paramétrica foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, para mais de duas ou apenas duas amostras, respectivamente. Todos os dados foram analisados utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2005).

4. Resultados

Foram capturados um total de 739 flebotomíneos, distribuídos em 20 espécies. As espécies mais representativas durante os experimentos 1, 2 e 3 para avaliação da BGS foram *L. antunesi* (27%), *L. longipalpis s.l.* (26%), *L. gomezi* (16%), *L. sordellii* (12%), *L. trinidadensis* (3%) e *L. brachipyga* (2%) (**Fig. 7**). No experimento 4 somente a espécie *L. longipalpis s.l.* foi identificada, totalizando 1.050 indivíduos, sendo 362 fêmeas e 688 machos, não sendo ilustrados na **Figura 7**.

4.1. Avaliação das armadilhas BGS, T-trap e CDC

Foram capturados 129 flebotomíneos distribuídos em 13 espécies (**Tab. 1**). A variante da BGS, T-Trap, capturou 48 flebotomíneos (10 espécies, 4 NI), enquanto que a CDC capturou 44 flebotomíneos (8 espécies, 5 NI) e a BGS capturou 37 (11 espécies, 1 NI) As três

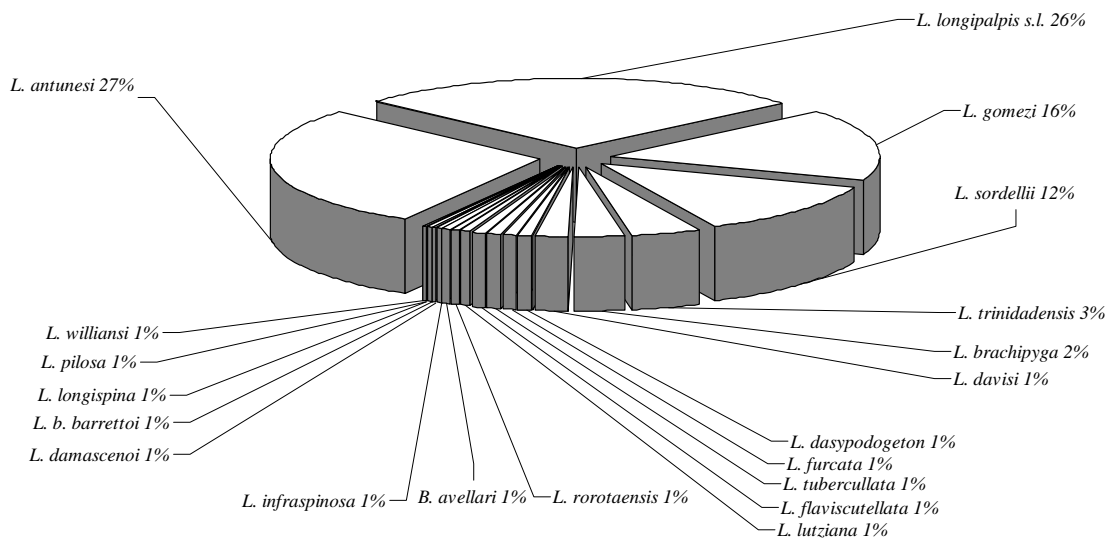


Figura 7- Espécies de flebotomíneos (%) capturadas em Barcarena (PA) durante os experimentos para avaliação da BG-Sentinela. **Dados do experimento 6 não foram incluídos.**

Tabela 1- Espécies de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: BG-Sentinela (BGS), T-Trap e CDC luminosa (controle) com luz incandescente a 1,5 m em Barcarena, PA (12-29/03/2007).

Espécies	Armadilhas						Total
	BGS		T-Trap		CDC		
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
<i>Lutzomyia antunesi</i>	10	5	7	2	7	6	37
<i>L. longipalpis s.l.</i>	0	1	7	6	2	7	23
<i>L. gomezi</i>	8	1	7	0	3	0	19
<i>L. davisii</i>	1	0	4	2	2	2	11
<i>L. sordellii</i>	3	1	1	1	3	2	11
<i>L. trinidadensis</i>	1	0	0	1	0	2	4
<i>L. furcata</i>	1	0	0	0	0	2	3
<i>L. dasyodogeton</i>	1	0	0	0	1	0	2
<i>L. flaviscutellata</i>	1	0	1	0	0	0	2
<i>L. infraspinosa</i>	0	0	1	1	0	0	2
<i>L. tuberculata</i>	1	0	1	0	0	0	2
<i>L. williamsi</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Brumptomyia avellari</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Brumptomyia sp.</i>	0	0	1	0	0	0	1
NI	1	0	4	0	5	0	10
Total	28	9	34	14	23	21	129

espécies mais capturadas nas três armadilhas foram *L. antunesi*, *L. longipalpis s.l.* e *L. gomezi* (**Tab. 1**). A BGS e a T-Trap capturaram mais fêmeas que machos, diferentemente do observado na CDC, incluindo os insetos NI (**Tab. 1**). Não foi observada diferença significativa quando comparados os três métodos de captura ou mesmo quando comparadas as capturas por sexo das espécies (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) (**Fig. 8**). Devido a similaridade na captura de flebotomíneos pela BGS e T-Trap (Mann-Whitney, $p > 0,05$), optou-se por trabalhar com a primeira, pois a conformação da T-Trap (ver item 3.2, **Fig. 2**) é muito semelhante a da CDC.

4.2. Avaliação da altura da BGS com luz incandescente e com o atraente sintético BGL

Foram capturados 192 flebotomíneos distribuídos em 12 espécies (**Tab. 2**). A BGS e luz incandescente a 1,5 m do solo, na ausência de cairomônio, capturou o maior número de flebotomíneos (81 espécimes), com maior variedade de espécies (sete espécies), superando até mesmo a CDC (23 espécimes, seis espécies) embora estatisticamente essa diferença não tenha sido significativa (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) (**Fig. 9, Tab. 2**).

As menores capturas foram obtidas para as armadilhas BGS com BGL e luz incandescente no solo (19 espécimes), BGS com BGL e sem luz incandescente a 1,5m (três espécimes) e BGS com BGL e sem luz incandescente no solo (dois espécimes). O número de fêmeas capturadas foi maior que o de machos em todos os tratamentos, assim como no experimento 1, não permitindo inferir sobre o papel do BGL na atração de acordo com os sexos dos indivíduos (**Tab. 2**).

A única espécie capturada pela BGS, na ausência de luz e ao nível do solo foi *L. flaviscutellata* (2 espécimes) e a espécie *L. longipalpis s.l.* só foi capturada na armadilha CDC (seis espécimes) e na BGS com luz incandescente a 1,5 m do solo (três espécimes), embora em pouca quantidade.

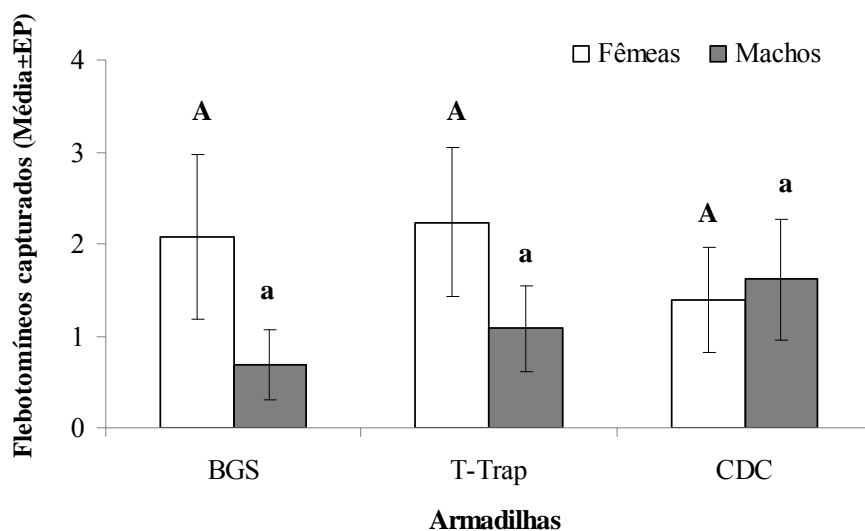


Figura 8- Média de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: BG-Sentinela (BGS), T-Trap e CDC ($n= 2$). [Letras iguais entre os tratamentos indicam ausência de diferença significativa (Kruskal-Wallis, $p> 0,05$)].

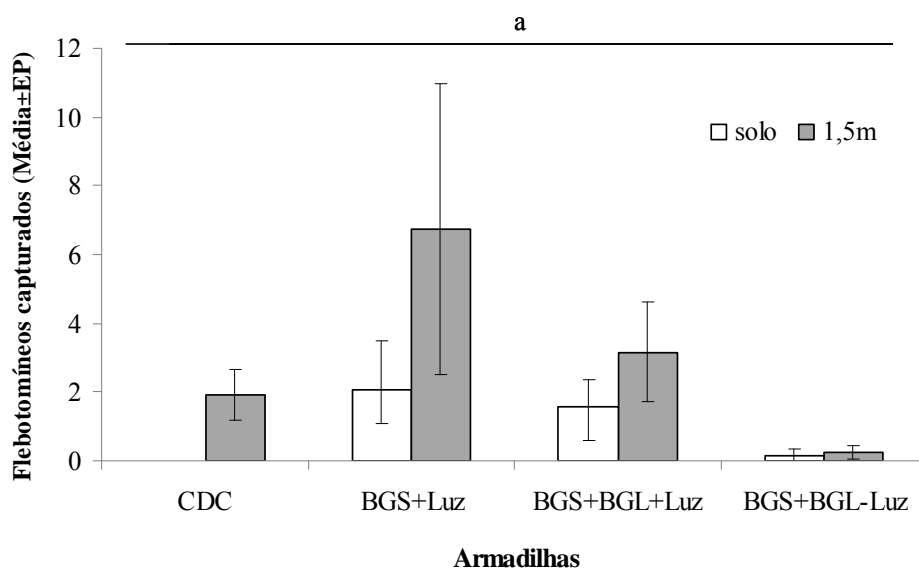


Figura 9- Média de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: CDC (com Luz incandescente) e pela BG-Sentinela com luz incandescente (BGS+Luz), com BG-Lure e Luz incandescente (BGS+BGL+Luz) e com BGL e sem luz (BGS+BGL-Luz), no solo e a 1,5m ($n= 1$) (Kruskal-Wallis, $p> 0,05$).

Tabela 2- Espécies de flebotomíneos capturadas pelas armadilhas: CDC, BG-Sentinela com luz incandescente a 1,5 m [BGS+Luz (1,5m)], BGS com luz incandescente no solo [BGS+Luz (solo)], BGS com BG-Luz e luz incandescente a 1,5 m [BGS+BGL+Luz (1,5m)], BGS com BGL e luz incandescente no solo [BGS+BGL+Luz (solo)], BGS com BGL sem luz incandescente 1,5m do solo ([BGS+BGL-Luz (1,5m)]), BGS com BGL sem luz incandescente no solo [BGS+BGL-Luz (solo)]em Barcarena, PA (Janeiro, 2008).

Espécies	Armadilhas												Total				
	CDC		BGS+Luz (1,5m)		BGS+Luz (solo)		BGS+BGL+Luz (1,5m)		BGS+BGL+Luz (solo)		BGS+BGL-Luz (1,5m)			BGS+BGL-Luz (solo)			
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂		♀	♂		
<i>Lutzomyia antunesi</i>	5	1	31	20	5	2	11	5	0	0	0	0	0	0	0	0	80
<i>L. gomezi</i>	4	1	13	1	14	2	6	1	7	2	2	0	0	0	0	0	53
<i>L. brachipyga</i>	0	1	4	6	0	0	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0	21
<i>L. sordellii</i>	3	1	1	0	2	0	5	1	4	0	0	0	1	0	0	0	18
<i>L. longipalpis s.l.</i>	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
<i>L. flaviscutellata</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3
<i>L. trinidadensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>L. tuberculata</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>L. rorotensis</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. damasceni</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. furcata</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. pilosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	16	7	52	29	21	4	28	11	17	2	2	1	2	2	0	0	192

4.3. Avaliação da captura de flebotomíneos das armadilhas CDC e BGS na ausência de luz, com luz incandescente e com luz UV

Foram capturados 429 flebotomíneos distribuídos em 18 espécies (**Tab. 3**). Durante os experimentos, a captura pela CDC (316 espécimes) foi maior que da BGS (113 espécimes), independente da fonte luminosa. Houve diferença significativa somente quando comparadas a CDC-SL (3 espécimes) e CDC-LUV (123 espécimes) (**Fig. 10**). Já na comparação entre os outros tratamentos não foi observada diferença (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) (**Fig. 10**).

Os resultados demonstraram que a luz incandescente na armadilha BGS (BGS-LI) capturou o maior número de flebotomíneos (58 espécimes) do que quando estava com luz UV (BG-LUV) (46 espécimes) ou na ausência de fonte luminosa (BG-SL) (nove espécimes) (**Tab. 3**). Resultado semelhante foi observado para a CDC (LI= 190; LUV= 123; SL= três espécimes), incluindo as observações para a espécie *L. longipalpis s.l.*

4.4. Avaliação da altura e posição da armadilha BGS na captura de *L. longipalpis s.l.*

Foram capturados 1.351 flebotomíneos (CDC= 354; BGS Invertida 1,5m= 321; BGS Lateral 1,5m= 215; BGS normal 1,5m= 215; BGS Invertida 40cm= 123; BGS Lateral 1,5m= 77; BGS normal 1,5m= 110) (**Tab.4**) e não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p > 0,05$) (**Fig. 11**). Deste total, 78% foi de *L. longipalpis s.l.* (1.050 espécimes), sendo 362 fêmeas e 688 machos (**Tab. 4**). A altura da abertura de sucção (1,5 m) e a posição (invertida) proporcionaram maior captura de flebotomíneos, dos quais 231 pertenciam à espécie *L. longipalpis s.l.* As armadilhas BGSs invertidas (1,5 m ou a 40 cm) capturaram mais *L. longipalpis s.l.* do que quando estas estavam na posição normal ou lateral (**Fig. 5 e 6**). Não foi observada diferença significativa em relação às capturas de machos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) e defêmeas (ANOVA, $p > 0,05$) nas armadilhas (**Fig. 12**). Em todos os tratamentos a captura de machos foi superior à captura de fêmeas, sendo que foi observada diferença significativa entre os sexos (Teste t, $p < 0,05$).

Tabela 3- Espécies de flebotomíneos capturadas pelas armadilhas: CDC e BG-Sentinela (BGS) sem luz (SL), com luz incandescente (LI) e luz ultravioleta (LUV) em Barcarena, PA (07-22/12 /2008).

Espécies	Armadilhas										Total		
	CDC					BGS							
	SL		LI		LUV		SL		LI			LUV	
♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
<i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i>	0	1	53	35	20	23	3	0	14	7	4	8	168
<i>L. antunesi</i>	0	0	18	28	8	21	0	0	1	8	4	5	93
<i>L. sordellii</i>	0	1	2	10	3	18	0	0	6	5	8	11	64
<i>L. gomezi</i>	0	0	2	22	2	11	0	1	0	11	0	3	52
<i>L. trinidadensis</i>	1	0	2	9	2	4	2	2	0	2	0	0	24
<i>L. dasypodogeton</i>	0	0	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	6
<i>L. lutziana</i>	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	4
<i>L. tuberculata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
<i>L. furcata</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>L. davisii</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3
<i>L. rorotaensis</i>	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	3
<i>Brumptomyia avellari</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
<i>L. barrettoii barrettoii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. brachipyga</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>L. damascenoi</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>L. flaviscutellata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>L. infraspinosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>L. longispina</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	1	2	84	106	39	84	5	4	21	37	18	28	429

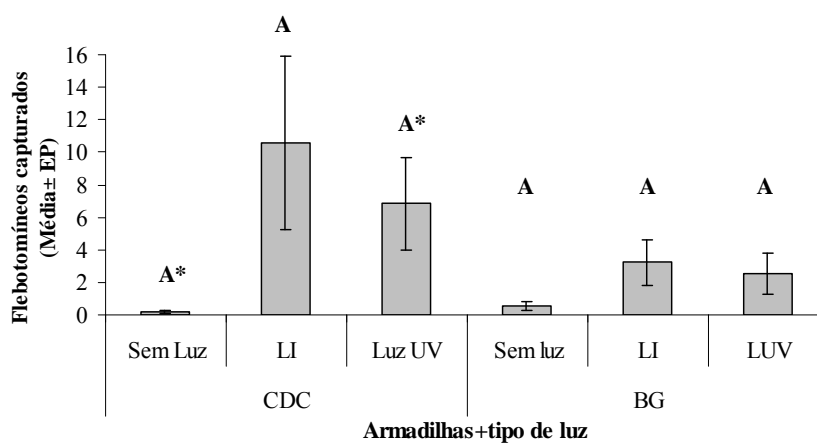


Figura 10- Média de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: CDC e BGS sem luz (SL), com luz incandescente (LI) e luz ultravioleta (LUV) ($n = 3$). [Letras iguais indicam ausência de diferença significativa entre tratamentos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$); ‘*’ mostra diferença significativa (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$)].

Tabela 4- *Lutzomyia longipalpis* s.l. capturados pelas armadilhas CDC, BG-Sentinela invertida a 1,5 m do solo (BGS Inv 1,5m), BGS de lado a 1,5 m do solo (BGS Lat 1,5m), BGS normal a 1,5 m do solo (BGS Nor 1,5m), BGS invertida a 40 cm do solo (BGS Inv 40 cm), BGS de lado a 40 cm do solo (BGS Lat 40 cm), BGS no solo (BGS Nor 40cm) em Barcarena, PA (Todas as armadilhas instaladas com luz incandescente e as alturas referem-se a abertura de sucção das armadilhas em relação ao solo) (15-21/01/2009).

Noites	Armadilhas																
	CDC		BGS Inv 1,5m		BGS Lat 1,5m		BGS Nor 1,5m		BGS Inv 40 cm		BGS Lat 40 cm		BGS Nor 40 cm		Total	Total	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂			
1 ^a	14	38	2	3	0	0	1	10	15	9	3	8	9	22	44	90	134
2 ^a	9	12	0	0	6	17	4	30	0	9	12	24	9	12	40	104	144
3 ^a	1	0	10	23	6	39	7	13	7	19	7	3	3	3	41	90	131
4 ^a	0	9	2	23	13	8	8	29	2	1	0	4	0	0	25	74	99
5 ^a	18	23	42	28	29	49	6	13	1	1	0	0	1	8	97	122	219
6 ^a	17	41	15	42	0	0	0	0	0	1	4	3	11	7	47	94	141
7 ^a	39	43	17	24	1	6	0	0	9	24	2	1	0	2	68	114	182
Total/ sexo	98	166	88	143	55	119	26	95	34	64	28	43	33	54	362	688	1.050
Total geral	264	231	174	121	98	71	87										

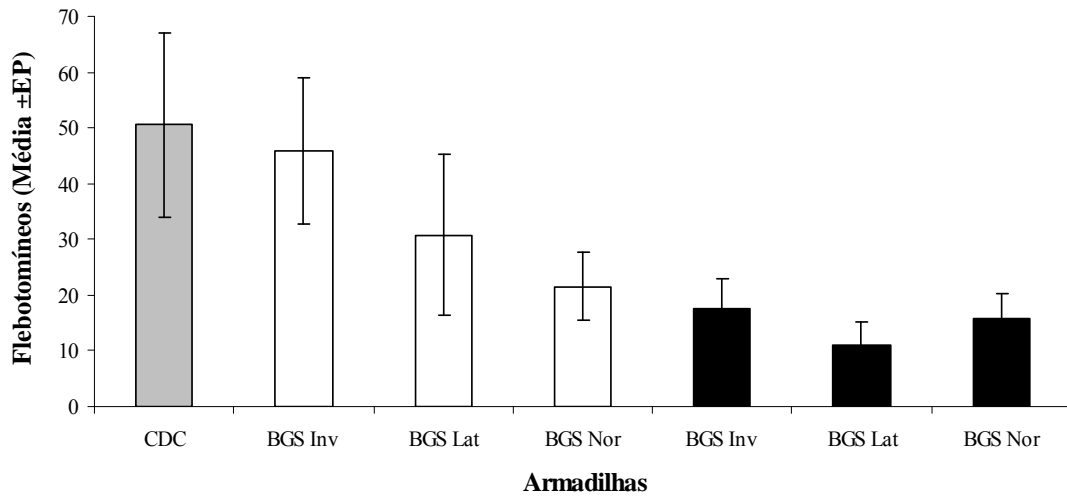


Figura 11- Ranking da média de flebotomíneos capturados pelas armadilhas: CDC, BG-Sentinelada invertida (BGS Inv), BGS de lado (BGS Lat), BGS normal (BGS Nor) (□= 1,5 m do solo; ■= 40 cm do solo) em Barcarena, PA ($n= 1$) (ANOVA, $p> 0,05$). (Todas as armadilhas instaladas com luz incandescente e as alturas referem-se a abertura de sucção das armadilhas em relação ao solo).

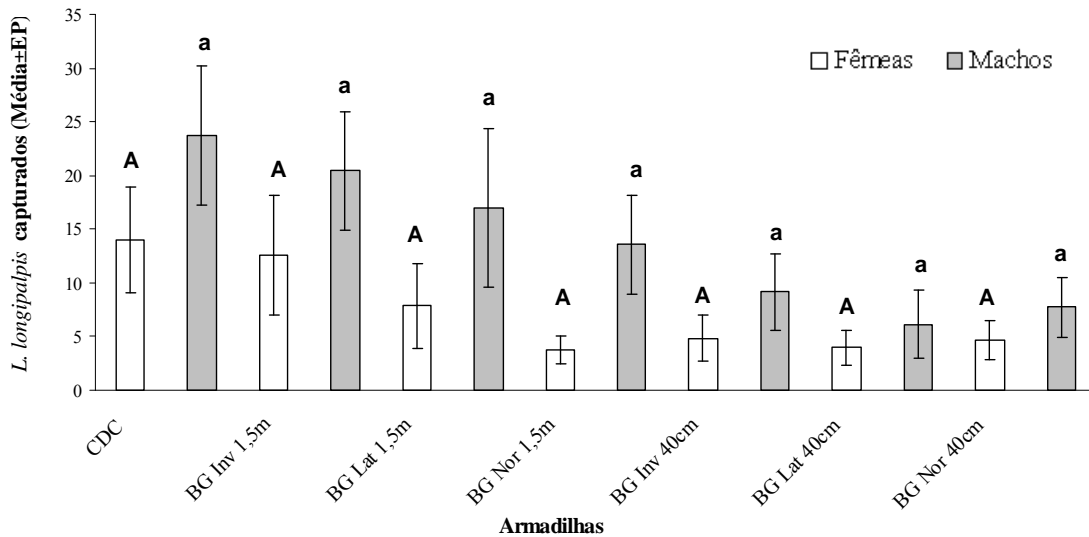


Figura 12- Média de fêmeas (A= ANOVA, $p> 0,05$) e de machos (a= Kruskal-Wallis, $p> 0,05$) de *Lutzomyia longipalpis* s.l. capturados pelas armadilhas: CDC, BG-Sentinelada invertida a 1,5 m do solo (BGS Inv 1,5m), BGS de lado a 1,5 m do solo (BGS Lat 1,5m), BGS normal a 1,5 m do solo (BGS Lat 1,5m), BGS invertida a 40 cm do solo (BGS Inv 40cm), BGS de lado a 40 cm do solo (BGS Lat 40cm), BGS normal no solo (BGS Nor 40cm) em Barcarena, PA ($n= 1$). (Todas as armadilhas foram instaladas com luz incandescente, as alturas referem-se a abertura de sucção das armadilhas em relação ao solo).

5. Discussão

Todas das espécies encontradas no presente estudo já foram registradas no Estado do Pará, porém não existe fauna descrita para o município de Barcarena. No presente estudo, foram capturadas, além da espécie *L. longipalpis s.l.*, envolvida na epidemiologia da LVA, as espécies *L. flaviscutellata*, *L. antunesi* e *L. gomezi* sugeridas como transmissoras de espécies de *Leishmania*, causadoras de LTA (RANGEL & LAINSON, 2009). Atualmente é sabido que existem mais de 100 espécies de flebotomíneos já relatadas para o Estado do Pará (RYAN, 1986; AGUIAR & MEDEIROS, 2003). Durante os experimentos realizados no município, observou-se que a fauna de flebotomíneos foi diversificada (20 espécies) quando comparada até mesmo a outros Estados como Alagoas (nove espécies) (ANDRADE FILHO & BRAZIL, 2009) ou para Estados como Sergipe, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Rio Grande do Sul ou Santa Catarina (menos de 16 espécies cada) (AGUIAR & MEDEIROS, 2003).

O levantamento de fauna de flebotomíneos, bem como o monitoramento de espécies transmissoras de leishmânias é feito através do uso de armadilhas. A armadilha CDC é o método preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil e amplamente utilizado, pois ela pode ser instalada no intra ou peridomicílio e em área de mata sendo descritas como padrão para captura de alguns culicídeos e flebotomíneos (ALEXANDER & MAROLI, 2003). Portanto, acredita-se que para modificar ou mesmo criar uma armadilha deve-se partir do método de funcionamento da CDC (ex. fonte luminosa). No presente trabalho, o grande número de flebotomíneos coletados pela CDC sugeriu que, além da luz, a altura da armadilha poderia ser uma variável diretamente proporcional ao número de flebotomíneos capturados.

Já foi demonstrado que a posição da armadilha CDC interfere na captura de flebotomíneos (ORSHAN *et al.*, 2006). Recentemente, foi observado que essa armadilha, quando invertida (com a abertura de sucção voltada para baixo) e a 40 cm do solo apresenta bons resultados na captura de flebotomíneos no Velho Mundo (FAIMAN *et al.*, 2009). No presente trabalho a posição invertida da BGS (**Fig. 5B** e **6C**) também foi eficiente na captura de flebotomíneos, incluindo a espécie *L. longipalpis s.l.*, porém a altura de 1,5 m mostrou ser melhor na captura da espécie quando a 40 cm do solo, altura esta descrita para o uso da BGS na captura de culicídeos, como *A. aegypti* (KRÖCKEL *et al.*, 2006; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2006, 2007) e *A. albopictus* (FELTNER & FERRAU, 2008; MEERAUS *et al.*, 2008). Foi também observado que a BGS invertida a 40cm do solo, capturou mais *L. longipalpis s.l.* que a a BGS na posição normal, também a 40cm do solo, mostrando novamente que a

inversão da armadilha seria uma modificação importante para uma captura de flebotomíneos mais produtiva. Esta maior captura poderia estar relacionada com o comportamento de vôo de *L. longipalpis s.l.*

DE JONG (1967) salientou que a atratividade de uma armadilha luminosa pode estar ligada ao comportamento de um inseto, ou seja, a intensidade e a posição da luz na armadilha poderiam aumentar a seletividade na captura, tornando-se um fator importante para o desenho de protótipos. Essas variáveis podem ser resultantes de uma tendência que os flebotomíneos possuem de voar verticalmente e em saltos (MUTERO *et al.*, 1991), o que, conseqüentemente, poderia aumentar as chances de o inseto ser capturado, quando a abertura de uma armadilha é voltada para baixo a uma altura que evidencia o foco de luz, como na CDC (FAIMAN *et al.*, 2009) ou, como demonstrado, na BGS. A instalação da armadilha BGS no solo não é, quando comparada a CDC, a melhor forma de se usar a armadilha para capturar flebotomíneos. Resultados semelhantes com a BGS invertida foram observados na captura de *Anopheles darlingi*, principal vetor de malária no Brasil (GAMA, 2009). Os resultados do presente trabalho demonstraram que as adaptações na BGS não superaram a eficiência da armadilha CDC, nem mesmo quando a fonte de atração foi a luz UV, a qual parece ser menos seletiva quanto a atração de insetos noturnos.

A adaptação da luz incandescente na BGS ou na sua variante T-Trap, nitidamente permitiu com que as mesmas apresentassem uma eficiência na captura dos insetos, quando comparadas à CDC, pois quando a BGS estava sem a luz a captura de flebotomíneos foi reduzida. Sabe-se que flebotomíneos são atraídos por luz artificial emitidas por armadilhas (SUDIA & CHAMBERLAIN, 1962 *apud* MELLOR *et al.* 1996). Através de eletrorretinograma, MELLOR *et al.* (1996) demonstraram que *L. longipalpis s.l.* apresenta uma região de resposta à luz ultravioleta (UV - até 340nm). No entanto, o presente trabalho mostrou que tanto a CDC como a BGS, iscadas com luz UV, não foram mais atrativas que a luz incandescente. Para *L. longipalpis s.l.*, a sensibilidade espectral é similar a de *Ae. aegypti*, com máxima na região de 360 a 490 nm, entre luz UV e azul-verde-amarela e a espécie pode distinguir cores (MELLOR & HAMILTON, 2003). Isso teria importantes implicações no desenho de armadilhas para insetos noturnos incluindo cores, posições, fontes luminosas e até mesmo atraentes sintéticos. ANDRADE *et al.* (2008), demonstraram que armadilhas do tipo CDC iscadas com BGL poderiam funcionar na atratividade de flebotomíneos, potencializando a captura de espécies antropofílicas, como *L. intermedia* e *L. longipalpis s.l.*. No entanto, a CDC não permite um fluxo desses semioquímicos, assim como a T-Trap. Considerando-se *L.*

longipalpis s.l. abundante na área e uma espécie coletada em grande número em CDCs, pode-se sugerir que o BGL, não exerceu atração sobre a espécie. Isso pode ser devido a taxa de evaporação, à combinação ou mesmo à concentração dos compostos (ácido láctico, ácido capróico e amônia) que compõe o atraente sintético. Resultados semelhantes foram observados para a espécie *A. darlingi*, em campo, onde o BGL iscado na armadilha BGS não potencializou a captura da espécie (GAMA, 2009). De qualquer forma foi possível ainda concluir que a fonte luminosa (luz incandescente), aliada a altura das armadilhas interferiu de forma positiva na captura de flebotomíneos na BGS, estando esta iscada ou não com o BGL.

O uso do delineamento do Quadrado Latino é útil na remoção dos efeitos como o tempo e o local de realização do trabalho, quando comparados tratamentos (DAMON & HARVEY, 1987), ainda que se realize poucas repetições. No experimento 4 fica clara a aplicação desse “design”, onde foi possível observar que existe uma similaridade na captura de *L. longipalpis s.l.* pela armadilha BGS de acordo com as alturas (40cm e 1,5m) e nas posições da abertura de sucção (normal, invertida e lateral).

Segundo DE JONG (1967), machos de insetos são mais atraídos por recursos luminosos que fêmeas podendo explicar a relação entre os sexos (M/F= 2) de *L. longipalpis s.l.* A altura da abertura de sucção da BGS (1,5m), claramente interfere na captura dessa espécie de flebotomíneo, quando comparada com sua abertura a 40 cm e ainda foi possível notar que a inversão da armadilha é uma variável importante para aumentar a captura de *L. longipalpis s.l.*, quer a armadilha esteja ao nível do solo ou acima deste. As adaptações nas armadilhas BGSs que mais se destacaram foram a posição invertida e 1,5m de altura do solo, capturando 231 espécimes, com captura de *L. longipalpis s.l.* bem próxima a apresentada ao controle CDC (264 espécimes).

Conclui-se no presente trabalho que de fato a armadilha CDC luminosa mostrou-se o melhor método de captura de flebotomíneos quando comparada à BGS. Pela primeira vez testou-se a BGS na captura de flebotomíneos e os resultados sugerem que são necessárias adaptações na BGS tais como: altura de instalação (1,5m), posição da abertura de sucção (voltada para baixo) e adaptação de luz incandescente para se fazer desta armadilha uma nova ferramenta para captura de flebotomíneos, principalmente *L. longipalpis s.l.*

Capítulo IV

**Leishtrap: uma nova armadilha para a captura de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae:
Phlebotominae)**

Resumo

ANDRADE, Andrey José de. **Leishtrap: uma nova armadilha para a captura de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)**

A captura de flebotomíneos é realizada utilizando principalmente armadilhas luminosas do tipo CDC e adaptações desta como, a HP que são utilizadas pelo Ministério da Saúde (MS) do Brasil no Programa Nacional de Controle e Vigilância das Leishmanioses. Essas armadilhas apresentam problemas operacionais como, transporte e manutenção, além de ter elevado custo por utilizar pilhas ou baterias como fonte de energia. Visando amenizar as dificuldades e limitações de armadilhas luminosas como, a CDC ou a HP, no presente trabalho objetivou desenvolver uma armadilha que dispense o uso de energia para a captura de flebotomíneos observando as respostas das espécies *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani*. Cinco experimentos foram realizados em campo usando o delineamento de quadrado latino. Quando comparadas a armadilha CDC com cartões adesivos coloridos (branca, azul, preta e prata) com luz incandescente (LI) em diferentes alturas do solo (0,4; 1,0 e 1,5 m.) foi observado que a CDC capturou significativamente mais *L. longipalpis s.l.* que os cartões adesivos e que a cor branca (1,5m) capturou mais flebotomíneos que as demais cores. O segundo experimento avaliou a luz química como substituto da luz produzida por baterias. A luz química verde (LVe) apresentou maior intensidade luminosa (Lux) que as cores, azul, vermelha, laranja e amarela e em campo demonstrou-se que a CDC com LVe, vermelha ou azul obtiveram o mesmo desempenho que CDC luminosa na captura de flebotomíneos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) e que cinco unidades a LVe poderiam substituir a LI da CDC para captura de *L. longipalpis s.l.* (Mann-Whitney, $p > 0,05$). O terceiro experimento avaliou a luz química em associação com armadilhas adesivas, aqui denominadas Leishtrap. Protótipos (P) de cartão adesivo branco (P1, P2 e P3) contendo LVe foram avaliados. O feromônio sexual sintético (9-metilgermacreno-B) foi acrescentado somente no P1 e os resultados demonstraram que composto nas concentrações (1,5 e 2mg) aumentava a captura de fêmeas de *L. longipalpis s.l.* (ANOVA, $p > 0,05$). No P2 a captura de machos (Teste t, $p > 0,05$) e fêmeas (Mann-Whitney, $p > 0,05$) da espécie não foi diferente quando comparada a CDC e o mesmo resultado foi observado no P3 para machos (Teste t, $p > 0,05$) e fêmeas (Mann-Whitney, $p > 0,05$), tanto para *L. longipalpis s.l.* Para *L. whitmani* também não foi observada diferença entre o P2 e a CDC. Os protótipos da Leishtrap se mostraram eficazes na captura dessas espécies e poderiam substituir a CDC na captura da espécie, após contrapor os custos e benefícios das mesmas.

1. Introdução

O método de captura de flebotomíneos, preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, é a armadilha luminosa CDC (SUDIA & CHAMBERLAIN, 1962) a qual apresenta bons resultados para conhecimento de fauna e é utilizada como método de monitoramento de espécies vetoras, onde haja registros de casos de leishmanioses, tegumentar ou visceral (MS, 2007). Para seu funcionamento a armadilha luminosa CDC requer o uso de pilhas tipo “D” (1,5 volts) ou baterias de 6 volts ou, ainda, energia elétrica. Entretanto, em caso da falta de uma fonte de energia (pilha fraca ou baterias descarregadas), as armadilhas elétricas perdem a capacidade de reter os flebotomíneos capturados. Esse efeito é observado devido à ausência de funcionamento da ventoinha, uma barreira mecânica comum neste tipo de armadilha. A ausência dessa barreira permite que os insetos capturados escapem, fazendo com que a eficiência da armadilha seja reduzida. Outra armadilha que vem sendo utilizada no Brasil para a captura de flebotomíneos é a HP (PUGEDO *et al.*, 2005), a qual funciona da mesma forma que a CDC.

Assim como a CDC ou a HP, outras armadilhas como a Falcão (FALCÃO, 1981) e a New Jersey (MULHERN, 1942) apresentam as mesmas limitações operacionais, tornando-as armadilhas de alto custo, principalmente para sua utilização em regiões mais carentes. No entanto, essas armadilhas apresentam a vantagem de permanecerem, quando em perfeito funcionamento, 12 horas em campo e podendo ser instaladas tanto no intra como no peridomicílio, bem como em área de mata (MAROLI *et al.*, 1997). Outros tipos de armadilhas como a de Shannon (SHANNON, 1939), Malaise (MALAISE, 1937), Damasceno (DAMASCENO, 1955) e a de Disney (DISNEY, 1966) são empregadas, principalmente, para pesquisas científicas. Não utilizam fontes de energia, por isso necessitam de um monitoramento constante (Shannon e Damasceno) ou podem ser muito específicas, pois utilizam iscas animais para capturas de fêmeas ingurgitadas (Disney) ou são raramente utilizadas por serem generalistas e oferecerem resultados a longo prazo (Malaise) e não serem utilizadas em intra e peridomicílios (SHERLOCK & PESSÔA, 1964; MAROLI *et al.*, 1997; VILELA *et al.*, 2003).

Uma forma econômica de se capturar flebotomíneos são as armadilhas adesivas que são confeccionadas utilizando folhas do tipo A4 brancas untadas com óleo de rícimo. Estas são fixadas com uma haste de madeira e instaladas próximas aos troncos de árvores onde se suspeita encontrar flebotomíneos ou em forma de varal próximas a anexos domiciliares (p.ex.

galinheiro, chiqueiro) ou no interior de residências (MAROLI *et al.*, 1997). Porém é um método de captura que requer um estudo prévio do local a ser investigado para se determinar o número e a distribuição dessas armadilhas, padronizando uma metodologia com maior rendimento nas capturas para estudos de densidades e variações estacionais de diferentes espécies de flebotomíneos.

Apesar da utilização dessas armadilhas para investigação de fauna ou monitoramento de espécies vetoras, desde a década de 70, a Organização Mundial de Saúde ressalta que novas ferramentas são necessárias e urgentes para a captura e controle de flebotomíneos, principalmente, *Lutzomyia longipalpis s.l.* (Lutz & Neiva, 1912), a qual é considerada a principal transmissora de *Leishmania infantum chagasi* Nicolle, 1808 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) na região Neotropical, agente etiológico da leishmaniose visceral (LAINSON & RANGEL, 2005). Alguns avanços têm sido observados na busca de atraentes (caimônios e feromônio sexual), a serem iscados em armadilhas, através de testes em laboratório e em campo, não visando a substituição da fonte luminosa das armadilhas, mas buscando torná-las mais específicas e eficientes (ANDRADE *et al.*, 2008; BRAY *et al.*, 2009). Estudos com flebotomíneos abordando a atração visual por fontes luminosas e através de feromônios trazem também novas perspectivas de armadilhas para a captura do vetor (MELLOR *et al.*, 1996; HAMILTON *et al.*, 1999) sugerindo até mesmo o uso de feromônios sexuais sintéticos como uma possível ferramenta para o controle de *L. longipalpis s.l.* (BRAY *et al.*, 2010).

Dentre os flebotomíneos neotropicais, *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) destaca-se por sua notável capacidade de ocupar diferentes nichos ecológicos com diferentes aspectos fisiogeográficos e climáticos. Além de sua comprovada antropofilia, é uma espécie dotada de grande plasticidade alimentar na maior parte do Brasil. Mesmo já se mostrando adaptada ao ambiente domiciliar, a espécie tem sido encontrada em áreas de florestas, especialmente na Região Norte do Brasil, mantendo ainda hábitos silvestres (READY *et al.*, 1986; LAINSON, 1988). Atualmente, pode ser considerada como a mais importante espécie envolvida na epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Brasil (COSTA *et al.*, 2007). Essa espécie está associada à transmissão de duas leishmânias dermatóricas: *Leishmania braziliensis* Vianna, 1912 e *L. shawi* Lainson, Braga, Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira, 1989 (RANGEL *et al.*, 1996; LAINSON & SHAW, 1998).

O monitoramento de flebotomíneos ainda hoje não é uma realidade no Brasil e no mundo. Embora se utilize de armadilhas com elevada eficiência, muitas vezes o custo no

mercado, a operacionalidade e a pouca especificidade limitam seus usos em regiões mais carentes. Portanto, nota-se que há necessidade de desenvolver novas ferramentas de captura de vetores de leishmanioses, visando amenizar as dificuldades e limitações de armadilhas luminosas como, a CDC ou a HP. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma armadilha que dispense o uso de energia (pilhas ou baterias) para a captura de flebotomíneos visando, principalmente, observar as respostas das espécies *L. longipalpis s.l.* e *L. whitmani*, principais transmissoras de leishmânias no Brasil.

2. Material e Métodos

2.1. Áreas de estudo

- **Pará:** uma primeira parte dos testes (Experimento 1) foi realizada no município de Barcarena (**Fig. 1**) (ver **Capítulo III, item 3.1**) para *L. longipalpis s.l.*

- **Minas Gerais:** os experimentos 2, 3, 4, 5 e 6 foram realizados na borda do Parque Grande Sertão Veredas, localizado no município de Chapada Gaúcha (15°18'21''S e 45°37'04''W), região norte do Estado de Minas Gerais (**Fig. 2**). O município possui uma área de 3.214,698 Km² e população estimada em 10.995 habitantes (IBGE, 2009). O clima é do tipo semi-úmido, com quatro a cinco meses secos, com temperatura média anual de 20°C e pluviosidade de 1.250 a 1.500mm anuais. Pertence ao bioma cerrado com uma vasta área de veredas (IBAMA, 2009). Devido a prévia observação da fauna no local, quatro residências distintas foram escolhidas para o trabalho as quais distanciavam, aproximadamente, 100 metros entre elas na parte peri-urbana do município, para os testes da armadilha com *L. longipalpis s.l.*

- **Bahia:** o experimento 7 foi realizado do município de Ilhéus (**Fig. 3**), o qual possui uma área de 1.712 km² (14°47'S e 39°2'W) com clima tropical quente e úmido, com um elevado índice pluviométrico (1.500 a 2.000mm), temperatura média oscilando entre 19° e 28°C e umidade relativa anual de 87,3%. A vegetação é densa, típica de Floresta Ombrófila Densa, como expansão da Mata Atlântica.

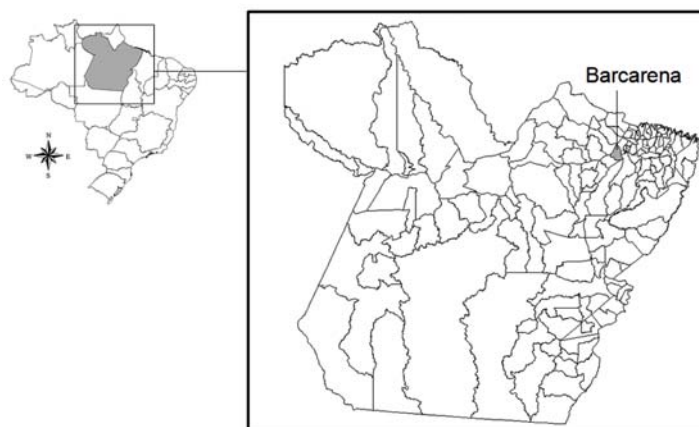


Figura 1- Município de Barcarena ($01^{\circ}30'21''S$, $48^{\circ}37'33''W$), localizado no Estado do Pará. (Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas – IBGE, 2009).

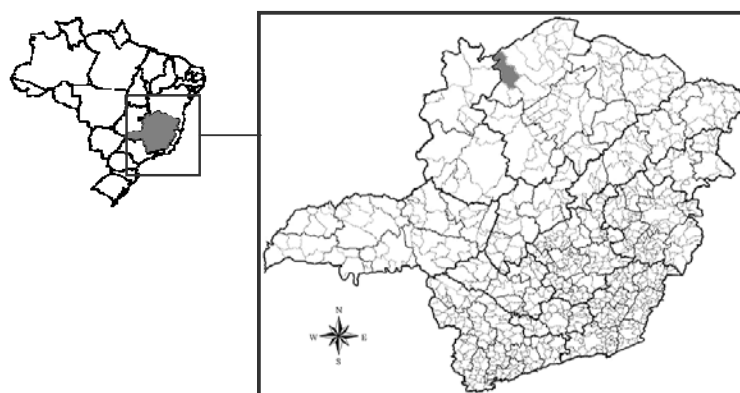


Figura 2- Município de Chapada Gaúcha ($15^{\circ}18'21''S$ e $45^{\circ}37'04''W$), localizado no norte do Estado de Minas Gerais. (Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas – IBGE, 2009).

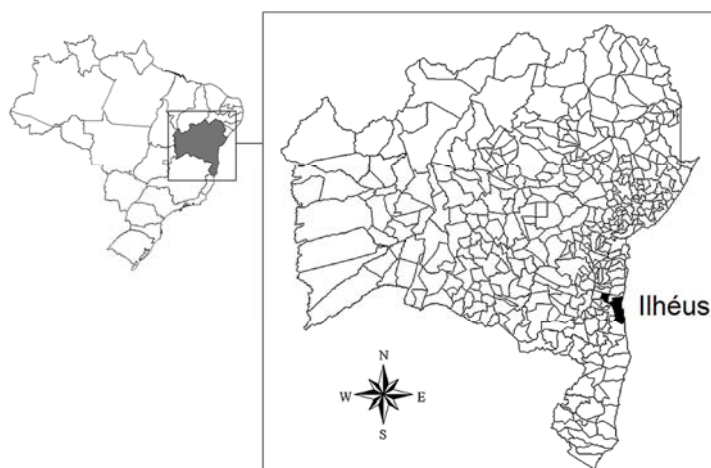


Figura 3- Município de Ilhéus ($14^{\circ}47'S$ e $39^{\circ}2'W$), localizado no Estado da Bahia. (Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas – IBGE, 2009).

Neste experimento, os testes com a armadilha Leishtrap foram realizados em duas localidades: Fazenda Cipó 1° (14°02'S e 39°15'W) localizada a 72 Km de Ilhéus, próxima ao município de Buerarema (Localidade I); e Fazenda Gonsalo (14°50'S e 39°10'W) localizada a 21 Km de Ilhéus, próxima ao povoado de Japu, pertencente ao município de Ilhéus (Localidade II), avaliada para *L. whitmani*.

2.2. Delineamento experimental

Todos os experimentos de campo, descritos abaixo, foram realizados seguindo o delineamento do Quadrado Latino, com diferentes números de repetições. Para os testes com as diferentes fontes luminosas ou tipos de armadilhas foi utilizada como controle a armadilha HP, a qual será referida neste trabalho como CDC modificada, por se tratar de uma adaptação desta última (PUGEDO *et al.*, 2005).

EXPERIMENTO 1. Avaliar em campo, as respostas visuais de machos e fêmeas de flebotomíneos a cartões adesivos com diferentes cores: Foram realizados testes para avaliar diferentes cores de cartões adesivos (azul, preto, prata e branco em ambos os lados). Os cartões foram confeccionados utilizando papel cartão (16,0 x 22,0 cm) nos quais foi passada cola entomológica (Biocontrole[®], São Paulo, Brasil) distribuída em uma fina camada nas duas faces dos cartões com o auxílio de uma espátula. Na parte superior dos cartões foi adaptada uma fonte luminosa (luz incandescente, 3 watts), a qual permanecia ligada entre 18:00 e 6:00h, conectada a uma bateria de 6 volts (Newmax FNC 6100, Dong Ho Electric Ltda., Coréia do Sul) (**Fig. 4A**). Os cartões foram dispostos a uma distância de 2m no entorno dos galinheiros, nas alturas de 0,4; 1,0 e 1,5 m seguindo o delineamento de quadrado latino 4x4, totalizando três repetições, durante 12 noites (**Fig. 4B**).

Para isso foram escolhidos três galinheiros (gA, gB e gC), após um estudo prévio que mostrou a presença de *L. longipalpis s.l.* neste anexos domiciliares. Na primeira noite foram instalados nos galinheiros cartões nas quatro cores (1) azul; (2) preto; (3) prata; (4) branco ambos com a adaptação da luz incandescente nas alturas de 40 cm (gA), 1m (gB) e 1,5m (gC) (**Fig. 4B**). Na segunda noite, alternou-se as alturas dos cartões, onde no gA passava a ser de 1 m, no gB de 1,5 m e no gC de 40 cm. Além da altura, foi realizado um rodízio entre os cartões

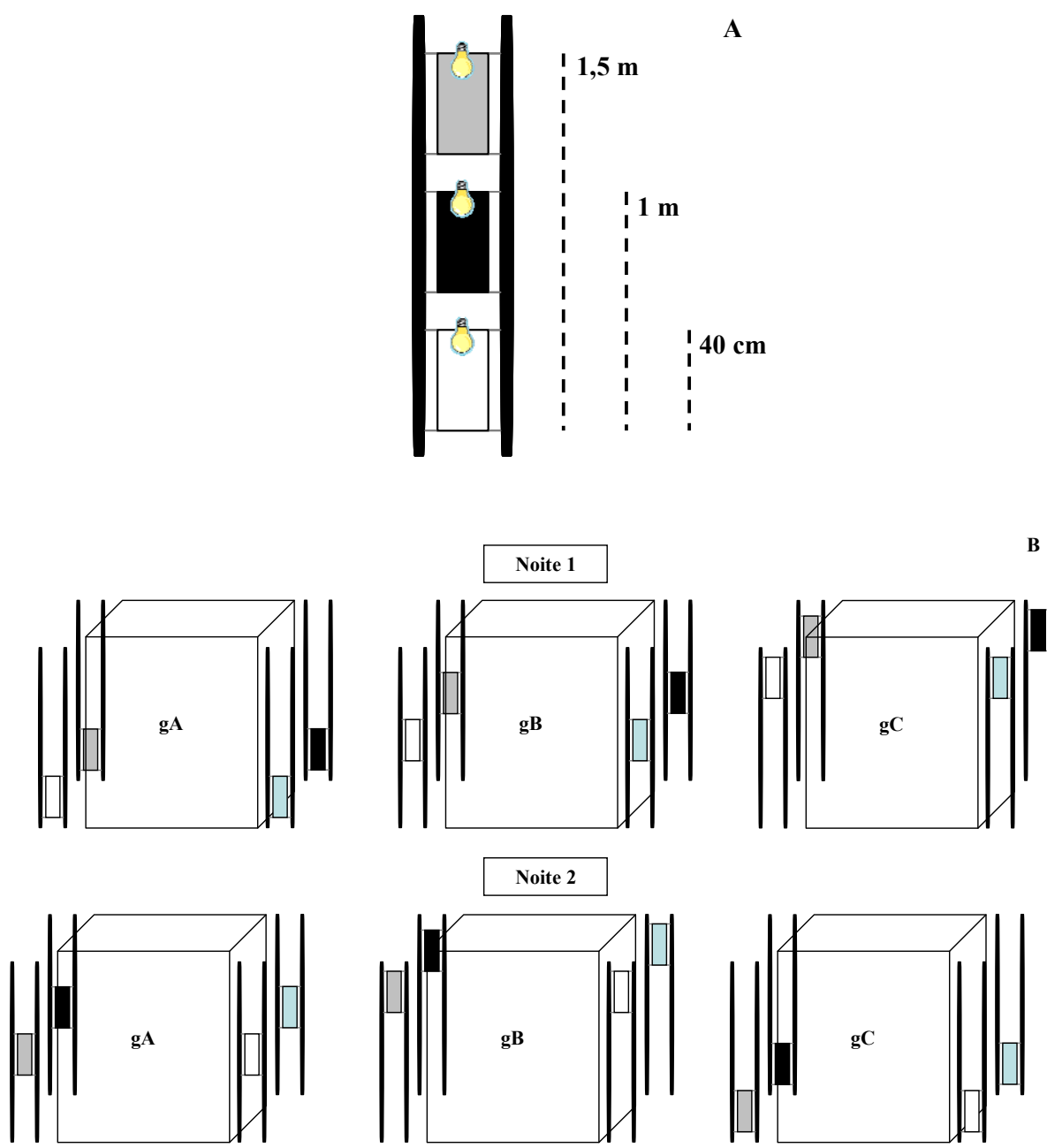


Figura 4: Esquema ilustrando a disposição dos cartões adesivos com cola (azul, preto, prata e branco) em três galinheiros (gA, gB e gC): **A-** cartões com cola nas três alturas com adaptação de luz incandescente; **B-** disposição dos cartões no entorno dos galinheiros (Barcarena, PA).

nos três galinheiros amostrados. Ao final do experimento (12 noites) os cartões nas diferentes cores passavam por todas as posições e todas as alturas em cada um dos galinheiros (**Fig. 4B**). Durante todas as noites uma armadilha CDC modificada (controle) foi instalada a uma distância aproximada de 5m dos locais dos testes (gA, gB e gC).

EXPERIMENTO 2: *Avaliar o tempo de duração e a intensidade das luzes químicas:*

As luzes químicas produzidas por pulseiras de neon tipo Lightsticks de 20 cm de comprimento (Bindi Web Bazar Ltda., Rio de Janeiro, RJ) de cinco cores: verde, vermelha, amarelo, laranja e azul (**Fig. 5**) foram utilizadas no experimento. Inicialmente foi avaliada a durabilidade da luz emitida e da intensidade luminosa (Lux) para as cinco cores utilizando um Luxômetro (LX-101, Lutron Electronic, Coopersburg, EUA). Como controle foram medidas a intensidade luminosa de lâmpada de 3 watts usadas nas armadilhas CDC. As luzes químicas foram colocadas no interior de uma caixa de papelão (10,5 x 7,0 x 3,5 cm), perfurada na tampa, onde a pulseira testada era acondicionada dentro desta, após ser fechada e somente o Luxômetro era inserido, impedindo desta forma a entrada de luz externa (**Fig. 6**). A medida do Lux foi avaliada também em diferentes distâncias (3, 30 e 100 cm) das fontes luminosas para todas as cores e para a CDC, em uma sala fechada e isenta de entrada de luz.

EXPERIMENTO 3: *Avaliar a capacidade das luzes químicas em atrair flebotomíneos em campo:* Para a realização dos experimentos foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CDC modificadas instaladas no interior de galinheiros a uma altura aproximada de 1,5 m entre 17:00 e 9:00 horas do dia seguinte, seguindo o delineamento do Quadrado Latino 4x4, totalizando quatro repetições. A armadilha CDC contendo luz incandescente foi usada como controle e as outras três, foram modificadas retirando-se a fonte luminosa e colocando três luzes químicas no mesmo local de fixação da lâmpada. Os tratamentos foram: CDC luz incandescente; CDC luz química verde; CDC luz química azul; e CDC luz química vermelha (**Figs. 7A e B**).

EXPERIMENTO 4. *Comparar a CDC com luz incandescente e CDC com luz química verde:* Após a avaliação em laboratório da durabilidade e intensidade luminosa das luzes químicas e em campo a comparação entre as cores verde, azul e vermelha em relação à luz incandescente na CDC modificada, durante três noites, comparou-se o efeito da luz

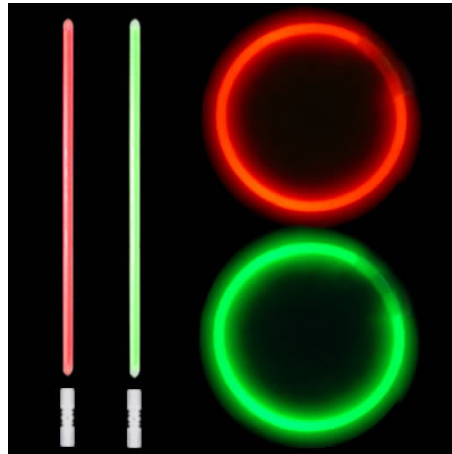


Figura 5- Pulseiras de Neon (= luzes químicas) do tipo Lightsticks (20 cm comprimento).



Figura 6- Procedimentos para medida da intensidade luminosa das pulseiras de Neon: **A-** caixa perfurada na tampa; **B-** pulseira de neon (= luz química) no interior da caixa de papelão (10,5 x 7,0 x 3,5 cm); **C-** Luxômetro para medida de intensidade luminosa.

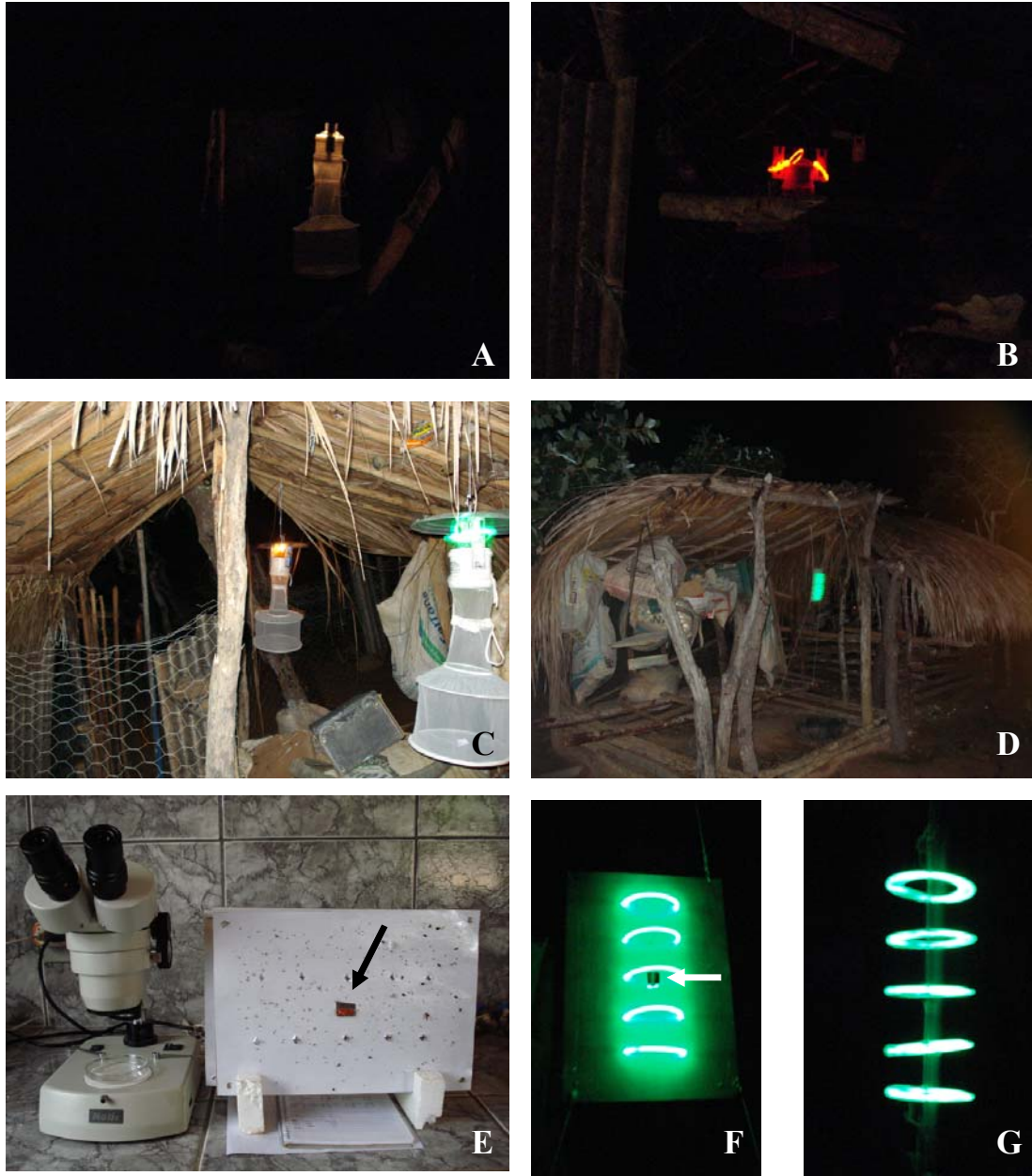


Figura 7- Testes de campo com o protótipo P1 da Leishtrap. **A)** CDC com luz incandescente; **B)** CDC com luz química vermelha (3 unidades); **C)** CDC com luz incandescente e luz química verde (5 unidades); **D)** vista do P1 instalado no interior de galinheiro; **E)** cartão adesivo do P1 (a seta preta aponta o septo de borracha com o feromônio sexual 9-metilgermacreno); **F)** vista frontal do P1 (seta branca aponta o septo de borracha); **G)** vista lateral do P1.

incandescente produzida por duas pilhas (tipo D - 1,5 volts) com a luz química verde, porém com cinco unidades (**Fig. 7C**).

EXPERIMENTO 5. Comparar a CDC (luz incandescente) com protótipos da nova armadilha (P1) da Leishtrap: Os protótipos (P1) da nova armadilha, denominados aqui como Leishtrap, foram confeccionados utilizando papel cartão nas medidas de 21,0 x 30,0 cm nos quais foi passada cola entomológica para capturar os insetos atraídos (ver Experimento 1). Como fontes de luz foram utilizadas cinco unidades de luzes químicas verdes distribuídas equidistantes na parte central do cartão formando cinco anéis luminosos, sendo cada metade do anel visualizada nas duas faces do cartão (**Figs. 7D, F e G**).

Além das luzes foram acrescentadas duas concentrações do feromônio sintético de machos de *L. longipalpis s.l.* (9-metilgermacreno-B) diluído Diclorometano. Após a diluição o feromônio foi colocado em um septo de borracha, para evaporação em campo por três dias. As concentrações utilizadas nas armadilhas foram de 2,0 mg/50 μ l e 1,5 mg/50 μ l. O experimento seguiu o delineamento do Quadrado Latino 4x4: (1) armadilha CDC; (2) cartão + luzes + septo; (3) cartão + luzes + septo 2,0 mg/50 μ l de feromônio; (4) cartão + luzes + septo 1,5 mg/50 μ l de feromônio (**Figs. 7E e F**).

A partir do P1 um novo protótipo de armadilha Leishtrap foi desenvolvido consistindo em um suporte bidimensional branco em forma de “U” (**Fig. 8A**), que segura um cartão branco (**Fig. 8A**) com cola dupla-face. De cada uma das duas extremidades laterais do “U” foram adaptados cinco encaixes (**Fig. 8B e C**) de onde partem cinco hastes paralelas que se encaixam na extremidade oposta. Nestas hastes são colocadas cinco luzes químicas na cor verde (**Fig. 8A**). Foi adicionado um anteparo superior que tampa o “U” formando um quadro (**Fig. 8A**), e também um poste central que fixa o eixo do quadro no chão, elevando-o a uma altura de um 1,5m do solo

EXPERIMENTO 6. Comparar a eficiência de captura de *Lutzomyia longipalpis s.l.* entre a armadilha CDC e a Leishtrap: Neste experimento foi utilizada uma unidade da Leishtrap, aqui denominada de P2, após os testes com a P1 (ver experimento 5). O suporte para o cartão foi confeccionado com resina e cartões adesivos, nas dimensões 20 x 30cm (Ascend Global Ind., São Paulo, SP, Brasil). Nestes testes o poste central não foi utilizado e as armadilhas foram instaladas utilizando barbante, a 1,5m do solo. O feromônio 9-metil-germacreno-B não foi utilizado para os testes com o novo protótipo.

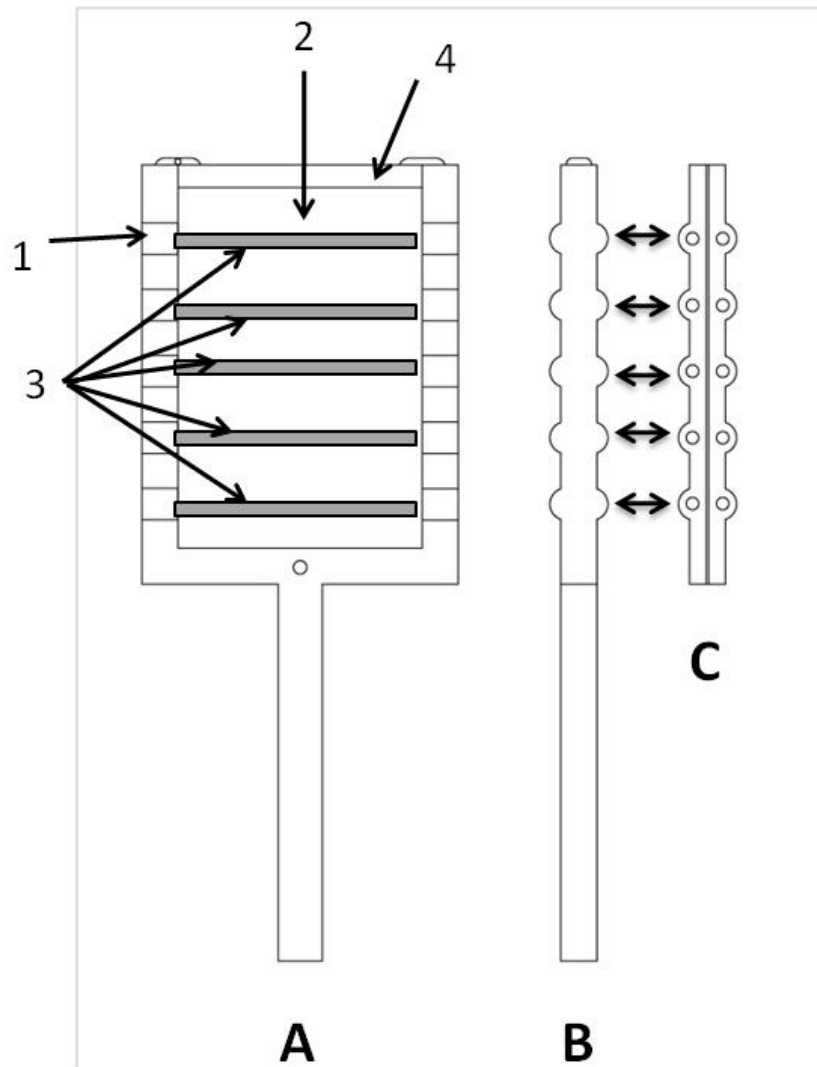


Figura 8- Esquema da Leishtrap: (A1) suporte bidimensional branco em forma de “U” que fixa (A2) um cartão adesivo branco dupla-face e (A3) luz química formado por tubos cor verde; (A4) é o anteparo superior para fechar e fixar o cartão e funciona como uma tampa para o “U” (A1) formando um quadro. Cinco ou mais encaixes de cada uma das duas extremidades laterais do “U” (B e C).

Teste 1. comparação da taxa de captura de uma CDC e uma Leishtrap (P2)

Estes testes foram realizados no período de 6 a 18 de dezembro de 2008. Comparou-se a captura da espécie *L. longipalpis s.l.* entre uma armadilha CDC modificada (luz incandescente) e um protótipo (P2), instalados dentro de cinco galinheiros, totalizando 30 repetições (Fig. 9). Em um mesmo galinheiro foram instaladas as duas armadilhas distantes, aproximadamente, 2m entre elas. Nos protótipos foram afixadas 10 luzes químicas na cor verde, sendo cinco em cada lado da armadilha (Fig. 9D e E).

Teste 2. comparação da taxa de captura de uma CDC e duas unidades da Leishtrap (P3)

Este experimento foi realizado no período de 18 a 28 de dezembro de 2008. Como no teste anterior foi comparada a taxa de captura da CDC modificada, porém com dois protótipos (duas unidades da mesma armadilha - P3), instaladas em três galinheiros, totalizando 18 repetições (Fig. 10). Nos protótipos foram afixadas 10 pulseiras neon verde, sendo cinco em cada lado da armadilha, como no teste 1, porém totalizando 20 luzes (dois protótipos) (Fig. 10).

EXPERIMENTO 7. Avaliar os protótipos da armadilha Leishtrap (P2 e P3) para a captura de *Lutzomyia whitmani*: o trabalho foi realizado nas duas localidades (Fazenda Cipó 1ª e Fazenda Gonsalo) entre os dias 30/03 a 14/04/2010. O armadilhamento na Localidade I foi feito em seis pontos e na Localidade II em três pontos. Em cada ponto de instalação de uma Leishtrap, a uma distância de aproximadamente 1m instalava-se uma CDC, as quais tinham suas posições alternadas na noite seguinte, seguindo o delineamento de Quadrado Latino. A captura de flebotomíneos foi avaliada comparando-se uma e duas unidades (Fig. 11) da Leishtrap com a CDC. Para cada unidade da armadilha foram realizadas seis repetições durante 12 noites com um esforço amostral de 30 armadilhas ao longo de todo o experimento. As duas unidades da Leishtrap foram avaliadas com duas repetições durante quatro noites, com um esforço amostral de seis armadilhas.

2.3. Remoção, triagem e identificação dos flebotomíneos

Os flebotomíneos atraídos pelos protótipos confeccionados com o cartão foram removidos pingando-se uma gota de solvente (hexano) e retirados com o auxílio de um pincel ou a agulha de seringa. Durante o processo, alguns exemplares foram danificados, portanto

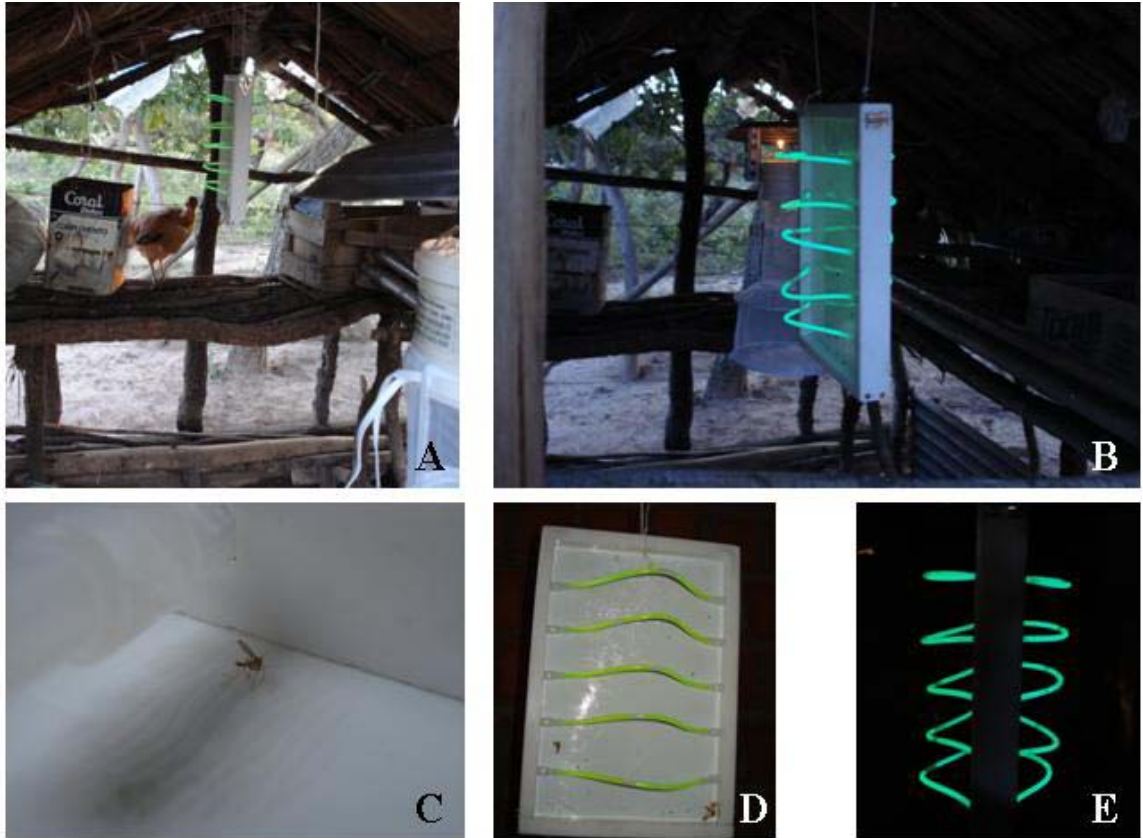


Figura 9- Testes realizados em Chapada Gaúcha (MG) usando um protótipo da armadilha Leishtrap (P2): **A e B)** CDC com luz incandescente e P2 (10 pulseiras); **C)** cartão adesivo do P2 com um flebotomíneo; **D)** vista frontal (de um dos lados) do P2; **E)** vista lateral do P2.



Figura 10- Testes realizados em Chapada Gaúcha (MG) usando dois protótipos da armadilha Leishtrap (P3) no interior de galinheiros.



Figura 11- Testes realizados em Ilhéus (BA) usando os protótipos P2 e P3 da armadilha Leishtrap em peridomicílio para captura de *Lutzomyia whitmani*.

priorizou-se a identificação da espécie *L. longipalpis s.l.*, por se tratar da espécie alvo deste trabalho. Em relação ao trabalho realizado na Bahia, todas as espécies de flebotomíneos puderam ser identificadas, pois os flebotomíneos foram removidos da armadilha utilizando Xilol (**Fig. 12**). Porém assim como nos testes realizados em Minas Gerais, somente as respostas obtidas para *L. whitmani* foram consideradas no trabalho.

Os flebotomíneos capturados durante os experimentos foram acondicionados em tubos de ensaio contendo álcool 70% e posteriormente levados para Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, para a confecção de lâminas utilizando Bálsamo do Canadá para machos e Berlese para fêmeas. Para a identificação das espécies foi utilizada a proposta taxonômica de YOUNG & DUNCAN (1994).



Figura 12- Método de remoção dos flebotomíneos da armadilha Leishtrap utilizando uma gota de Xilol e um estilete.

2.4. Análise dos dados

Para análise dos dados foram utilizados testes paramétricos (ANOVA e Teste-t) quando esses seguiam distribuição normal. Caso a distribuição fosse não-paramétrica foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, para mais de duas ou apenas duas amostras, respectivamente. Todos os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico BioEstat (v. 5.0) (AYRES *et al.*, 2005).

3. Resultados

3.1. Avaliação, em campo, da resposta visual de machos e fêmeas de flebotomíneos a cartões adesivos com diferentes cores

Foi capturado um total de 132 flebotomíneos distribuídos em 11 espécies (**Tab. 1**). As três espécies mais abundantes foram *Lutzomyia longipalpis s.l.* (32%), *L. sordellii* (26%) e *L. antunesi* (17%). As outras nove espécies capturadas somaram 132 espécimes (25% do total), sendo que setes destas não foram atraídas pelas cores ou pelas luzes adaptadas nos cartões. O cartão branco a 1,5 m capturou maior número de indivíduos (8), seguido pelos de cores azul (5), preto (4) e prata (2), porém devido à baixa densidade de insetos ou mesmo a pouca eficiência dos cartões os dados não foram conclusivos. A CDC modificada utilizada como controle durante todas as noites capturou 112 flebotomíneos (85% do total).

3.2. Avaliação do tempo de duração da luzes químicas (do tipo *Lightsticks*)

A cor de maior duração foi a verde com oito horas de luminosidade, a de menor duração foi a pulseira azul, com apenas três horas. As outras cores obtiveram resultados próximos, com uma média de quatro/cinco horas. A luz incandescente durou em média 12 horas (alimentada por quatro pilhas tipo “D”).

Utilizando apenas uma pulseira, obtiveram-se as seguintes medidas de Lux: luz verde (15Lux), luz vermelha (4Lux), luz amarela (4Lux), luz laranja (3Lux), luz azul (3Lux). Esses valores correspondem às médias de cada cor, em um total de 10 repetições/cor. Para a luz incandescente foi observado 60Lux de intensidade. As medidas foram conferidas, também, com o decorrer do tempo e verificou-se uma redução brusca na intensidade luminosa depois

de 30 minutos de exposição ao Luxômetro. Esta redução foi por volta de 80% na intensidade, para todas as cores. A partir da distância de 30cm, não houve registro de Lux (a marcação no aparelho foi zero). Para a luz incandescente, na distância de 30cm foi conferida uma medição de 20Lux e na distância de 100cm, não tinha mais registro no Luxômetro.

3.3. Comparação da CDC com luz incandescente e CDC com luz química

Foi capturado o total de 2.544 flebotomíneos (Tab. 2), sendo 1.602 (55%) identificados como a espécie *L. longipalpis s.l.* (Tab. 3). A maior captura de espécimes de flebotomíneos foi observada na armadilha utilizando luz química verde (64%), em relação ao controle (luz incandescente, 20%) ou às demais cores, as quais somaram 12% do total. Este resultado foi obtido devido a uma grande concentração de flebotomíneos na casa 4, durante uma das noites (Tab. 2), o que permitiu observar que a luz verde poderia substituir a luz incandescente, estando a população em alta ou baixa densidade.

Tabela 1- Espécies de flebotomíneos capturados pelos cartões adesivos com diferentes cores (azul, branco, prata e preto) a 40 cm, 1 m e 1,5 m e pela CDC (controle) em Barcarena, PA (27/02 a 11/03/2007).

Espécies	Cartões												CDC	Total
	Azul			Branco			Prata			Preto				
	40 cm	1 m	1,5 m	40 cm	1 m	1,5 m	40 cm	1 m	1,5 m	40 cm	1 m	1,5 m		
<i>Lutzomyia longipalpis s.l.</i>	1	2	2	0	0	5	0	0	1	0	0	1	29	41
<i>L. sordellii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2	30	35
<i>L. antunesi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	23
<i>L. gomezi</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	11	13
<i>L. trinidadensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9
<i>L. davisii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
<i>L. pusilla</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3
<i>L. brachipyga</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. dasypodogeton</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. paraensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>L. tuberculata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	1	2	2	0	2	6	0	0	2	1	1	3	112	132

Tabela 2- Número de flebotomíneos capturados por armadilha e por casa em Chapada Gaúcha, MG (4 repetições) (06/12-26/12/2007).

Armadilha CDC	Casa				Total
	1	2	3	4	
Luz incandescente	194	74	89	143	500
Luz verde	43	20	77	1.478	1.618
Luz azul	54	0	36	221	311
Luz vermelha	13	6	4	92	115
Total	304	100	206	1.934	2.544

Tabela 3- Número de indivíduos da espécie *Lutzomyia longipalpis* s.l. (machos e fêmeas) capturados pela armadilha CDC contendo diferentes cores de luzes neon (luz química) em Chapada Gaúcha, MG (06/12-26/12/2007).

Armadilha CDC	<i>Lutzomyia longipalpis</i>		Relação (fêmea/macho)	Total
	♀	♂		
Luz verde	618	232	2,66	850
Luz azul	133	86	1,55	219
Luz vermelha	44	62	0,71	106
Luz incandescente	328	99	3,31	427
Total	1.123	479	2,34	1.602

Quando avaliado somente para a espécie *L. longipalpis* s.l., a armadilha CDC com a luz verde apresentou maior captura da espécie (850 espécimes), porém este número não manteve uma periodicidade, sendo elevado somente em uma noite de captura. A maior relação de captura entre os sexos (fêmeas/ machos) foi com a armadilha CDC controle, com uma proporção de 3,31, seguida pela luz verde (2,66); luz azul (1,55), vermelha (0,71). Todas as cores possibilitaram maior captura de machos que fêmeas, exceto a vermelha. Não foi observada diferença significativa entre as CDCs com as diferentes cores das luzes químicas, para machos ou para fêmeas da espécie *L. longipalpis* s.l. (ANOVA, $p > 0,05$) (**Fig. 13**).

3.4. Comparação da CDC com luz incandescente e CDC com luz química verde

Os resultados deste experimento mostraram que a comparação da CDC com luz incandescente e CDC com luz química verde (cinco unidades) permitiram uma captura de 283 e 222 flebotomíneos, respectivamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$) (**Fig. 14**), confirmando novamente a eficiência da luz verde.

3.5. Comparação da CDC com luz incandescente com protótipos da nova armadilha (P1)

Foi capturado um total de 532 flebotômíneos da espécie *L. longipalpis s.l.* sendo 238 na CDC, 116 no P1 [1,5], 92 no P1 controle e 86 no P1 [2,0] (Tab. 4). Quando comparados os protótipos (P1), os septos de borracha com o feromônio sintético não potencializaram a captura de *L. longipalpis s.l.* em relação ao cartão controle (cartão com o septo sem atraente) e o mesmo foi observado quando comparados com a CDC (ANOVA, $p > 0,05$) (Fig. 15). No entanto, foi observado que a luz química verde continuou sendo atrativa para flebotômíneos.

O feromônio sintético do macho na concentração de 1,5 mg/50 μ l acrescido no cartão possibilitou maior captura de fêmeas que o cartão controle, porém o mesmo não foi observado para a concentração de 2 mg/50 μ l. Não foi observada maior captura de flebotômíneos quando comparados o cartão que continha feromônio em relação ao cartão controle (com luz e sem feromônio). Nos tratamentos não foi observada diferença significativa entre as fêmeas (ANOVA, $p > 0,05$) ou mesmo entre os machos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) (Tab. 4; Fig. 16).

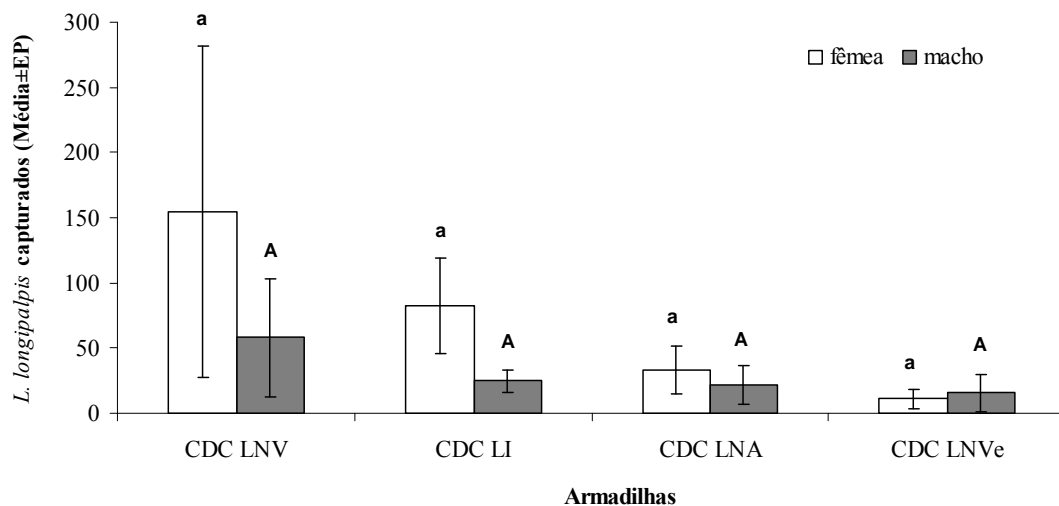


Figura 13- Média de captura de *Lutzomyia longipalpis s.l.* por armadilha CDC com diferentes fontes luminosas (3 unidades): (LNV= luz neon verde. LI= luz incandescente; LNA= luz neon azul; LNVe= luz neon vermelha) (Letras iguais indicam ausência de diferença significativa., ANOVA, $p > 0,05$).

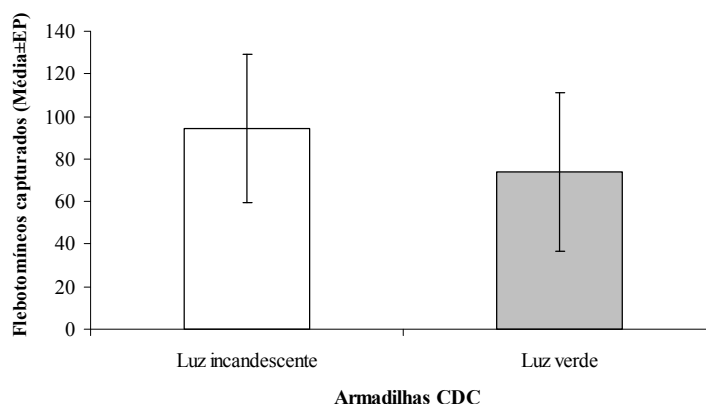


Figura 14- Comparação entre o efeito da luz incandescente produzida por pilha (1,5 volts) e a luz química verde (5 unidades) na captura de flebotomíneos (Mann-Whitney, $p > 0,05$) (Chapada Gaúcha, Minas Gerais – 28/02-01/03/2008).

Tabela 4- Número de *Lutzomyia longipalpis s.l.* capturados pela armadilha CDC e os protótipos P1 [2,0] (cartão+luzes+septo 2,0 mg/50 μ l de feromônio sexual); P1 [1] (cartão+luzes+septo 1,5 mg/50 μ l de feromônio sexual); P1 controle (cartão+luzes+septo) em Chapada Gaúcha, MG (27/02-01/03/2008). (Feromônio sintético: 9-metil-germacreno-B).

Sexos	Tratamentos								Total
	CDC		P1 [2,0]		P1 [1,5]		P1- controle		
	M	F	M	F	M	F	M	F	
<i>L. longipalpis s.l.</i>	15	55	2	0	21	49	37	59	238
	7	4	8	9	24	32	1	1	86
	29	32	13	14	6	3	1	18	116
	21	21	6	5	20	17	2	0	92
Total	72	112	29	28	71	101	41	78	532

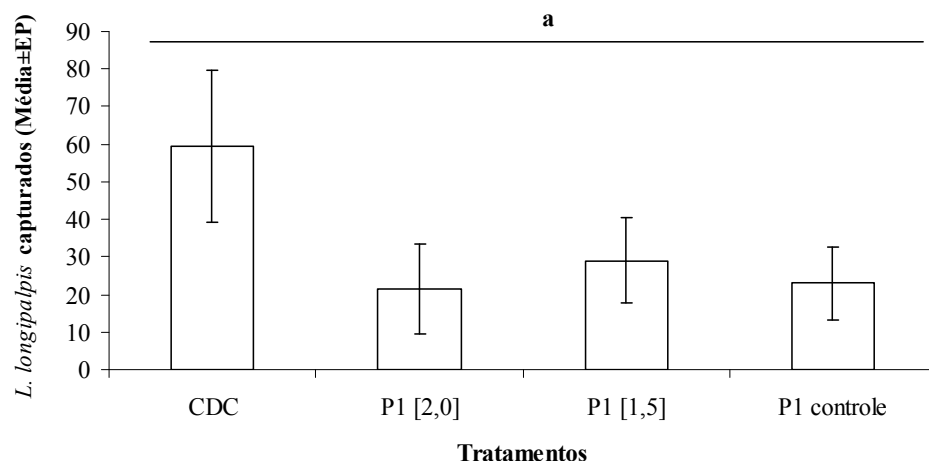


Figura 15- Média de captura de *Lutzomyia longipalpis s.l.* nas armadilhas CDC e o P1 (cartões+luz verde, com ou sem feromônios). O símbolo [] representa a concentração de 2,0 mg/50µl e 1,5 mg/50µl do feromônio sintético 9-metil-germacreno B no P1. (ANOVA, $p > 0,05$).

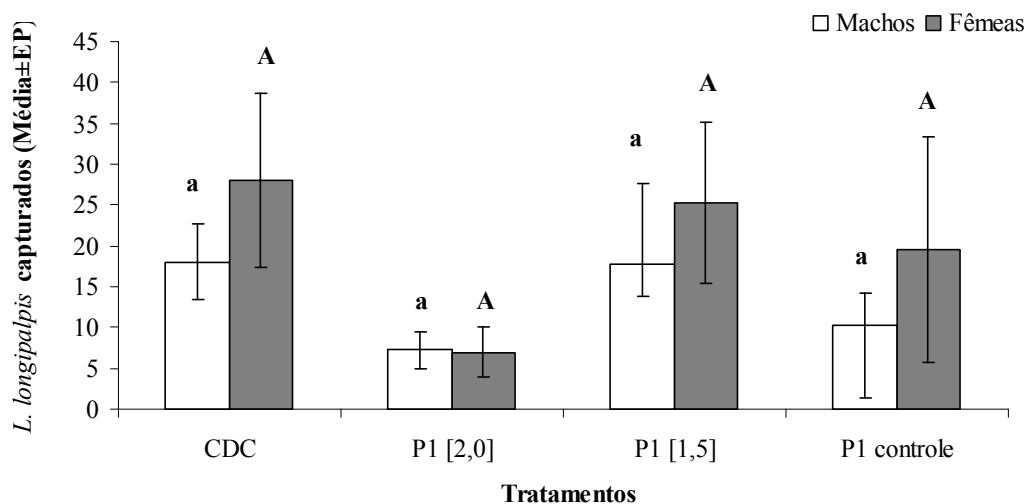


Figura 16- Média de machos e fêmeas de *Lutzomyia longipalpis s.l.* capturados por tratamento. O símbolo [] representa a concentração de 2,0 mg/50µl e 1,5 mg/50µl do feromônio sintético 9-metil-germacreno B no P1. (Letras iguais indicam ausência de diferença estatística; Machos= Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Fêmeas= ANOVA, $p > 0,05$).

3.6. Comparação da eficiência de captura da espécie entre a armadilha CDC e uma Leishtrap

Teste 1: comparação da taxa de captura de uma CDC e uma Leishtrap (P2)

Durante o experimento foram capturados 684 flebotomíneos, sendo que na CDC e no P2 foram encontrados 584 e 100 flebotomíneos, respectivamente (Mann-Whitney, $p < 0,05$) (**Fig. 17**). A relação de captura entre a CDC e o P2 (CDC/P2) foi de 5:1 flebotomíneos, sendo que ambas capturaram mais machos que fêmeas. Na **Tabela 5** pode se comparar o número de espécimes capturados na armadilha CDC e do P2 para *L. longipalpis s.l.* Do total de flebotomíneos (684), 293 (43%) pertenciam a espécie, sendo capturados 240 indivíduos na CDC e 53 no P2. Mesmo sendo observado um número superior de *L. longipalpis s.l.* capturados pela CDC não foi observada diferença significativa quando comparada ao P2 (**Fig. 18**) (Teste t, $p > 0,05$). A média de captura se mostrou semelhante na CDC e no P2 quando comparados machos (Teste t, $p > 0,05$) e fêmeas (Mann-Whitney, $p > 0,05$) da espécie (**Fig. 19**), embora a CDC tenha capturado, nitidamente, mais indivíduos que o protótipo (**Tab. 5**).

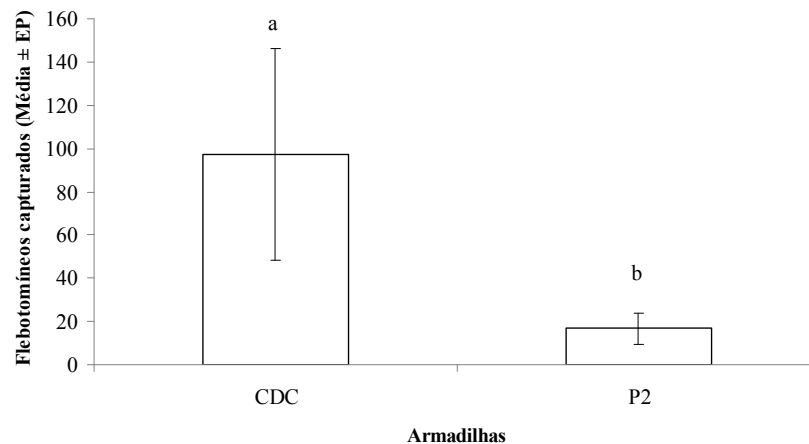


Figura 17- Média de flebotomíneos capturados nas armadilhas CDC e em uma Leishtrap (P2) (Chapada Gaúcha, MG) (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Tabela 5- Número de *Lutzomyia longipalpis s.l.* capturados na armadilha CDC e em uma Leishtrap (P2), de acordo com o sexo dos espécimes, em Chapada Gaúcha, MG (13/12-18/12/2008).

Dias	CDC		P2	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
1	3	2	1	1
2	3	1	1	2
3	0	3	0	0
4	84	44	20	5
5	14	6	6	4
6	53	27	6	7
Total	157	83	34	19

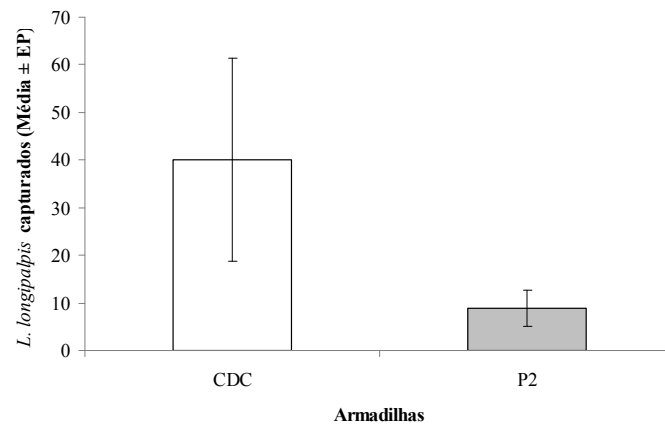


Figura 18- Média de *Lutzomyia longipalpis s.l.* capturados nas armadilhas CDC e em uma Leishtrap (P2) (Teste t, $p > 0,05$).

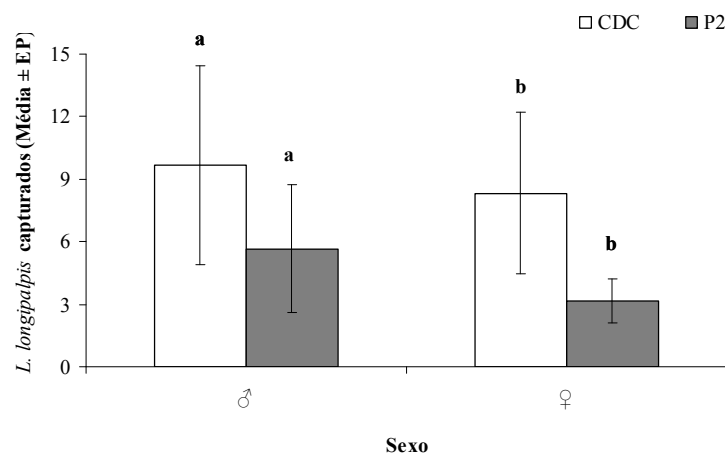


Figura 19- Média de *Lutzomyia longipalpis s.l.* (por sexo) capturados nas armadilhas CDC e em uma Leishtrap (P2) (a= Teste t, $p > 0,05$; b= Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Teste 2: comparação da taxa de captura de uma CDC e duas unidades da Leishtrap (P3)

Durante as noites de captura foi registrado um total de 2.925 flebotomíneos, sendo que na CDC e no P3 foram encontrados 2.000 e 925 flebotomíneos, respectivamente (Mann-Whitney, $p < 0,05$) (**Fig. 20**). A relação de captura entre a CDC e o P3 (CDC/P3) foi de 2:1 flebotomíneos, respectivamente, sendo que ambas capturaram mais fêmeas que machos.

A **Tabela 6** mostra o rendimento de captura da armadilha CDC e do P3 para *L. longipalpis s.l.* Do total de flebotomíneos (2.925), 1.425 (49%) pertenciam à espécie, onde foram capturados 971 indivíduos na CDC e 454 no P3. Assim como no teste anterior (teste 1) foi observado um número superior de *L. longipalpis s.l.* capturados pela CDC e também não foi observada diferença significativa quando comparada ao P3 (**Fig. 21**) (Mann-Whitney, $p > 0,05$). Não houve diferença significativa na captura entre a CDC e no P3 quando comparados machos (Teste t, $p > 0,05$) e fêmeas (Mann-Whitney, $p > 0,05$) da espécie (**Fig. 22**), embora, assim como no teste 1 a CDC tenha capturado, nitidamente, mais indivíduos que o protótipo (**Tab. 6**).

3.7. Avaliação dos protótipos da armadilha Leishtrap (P2 e P3) para a captura de *Lutzomyia whitmani*

Durante o experimento, foram capturados 5.259 flebotomíneos no total, 1.390 pela armadilha Leishtrap (P2+P3) e 3.869 pela CDC luminosa. Do total de flebotomíneos capturados, a espécie *L. whitmani* representou 89% (4.694 indivíduos), 2.565 machos e 2.084 fêmeas.

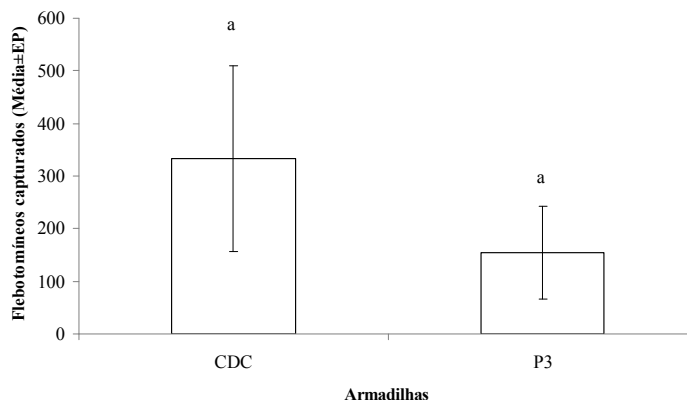


Figura 20- Média de flebotomíneos capturados nas armadilhas CDC e em duas unidades da Leishtrap (P3) (Chapada Gaúcha, MG) (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Tabela 6- Número de *Lutzomyia longipalpis s.l.* capturados na CDC e em duas unidades da Leishtrap (P3) (P3), de acordo com o sexo dos espécimes em Chapada Gaúcha, MG (19/12-25/12/2008).

Dias	CDC		P3	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
1	127	525	50	258
2	130	27	27	11
3	49	28	12	44
4	14	30	5	28
5	2	5	1	6
6	17	17	5	7
Total	339	632	100	354

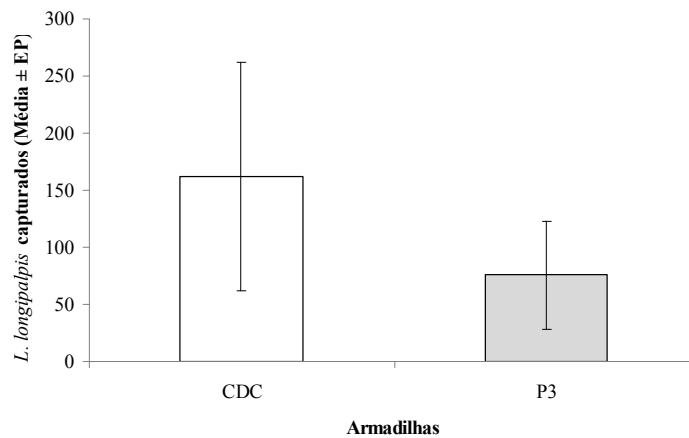


Figura 21- Média de *Lutzomyia longipalpis s.l.* capturados nas armadilhas CDC e em duas unidades da Leishtrap (P3) (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

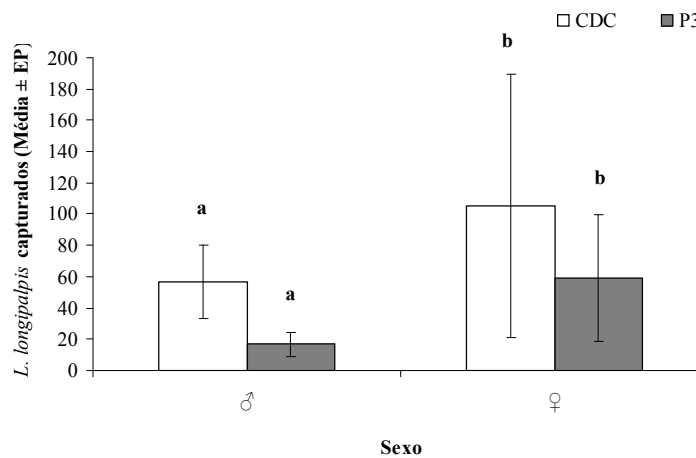


Figura 22- Média de *Lutzomyia longipalpis s.l.* (por sexo) capturados nas armadilhas CDC e em duas unidades da Leishtrap (P3) (a= Teste t, $p > 0,05$; b= Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Observou-se que ao utilizar uma unidade da Leishtrap (P2), foram capturados 791 *L. whitmani*, enquanto a CDC capturou 2.921 espécimes, obtendo a razão de 4:1 (CDC/Leishtrap). A captura de machos foi maior que a de fêmeas em ambas as armadilhas. Essa razão diminuiu para 1:1 quando se utilizou duas unidades da Leishtrap (P3), em um total de 984 indivíduos capturados, com maior captura de fêmeas que machos. A **Tabela 7** compara a taxa de captura da armadilha CDC e dos protótipos P2 e P3 para *L. whitmani*.

Não foi observada diferença significativa entre o número de exemplares de *L. whitmani* capturados entre as armadilhas CDC e Leishtrap (P2) (Teste t, $p > 0,05$) ou mesmo entre o número de machos (Teste t, $p > 0,05$) e fêmeas (Mann-Whitney, $p > 0,05$) de *L. whitmani* nas armadilhas (**Fig. 23**). Devido ao baixo número de repetições, essas análises não puderam ser feitas para o P3.

Tabela 7- Número de *Lutzomyia whitmani* capturados na CDC em relação a uma unidade (P2) e a duas unidades da Leishtrap (P3), de acordo com o sexo dos espécimes em Ilhéus, BA (30/03-14/04/2010).

Dias	Nº de pontos	CDC		Leishtrap (P2)		Total
		M	F	M	F	
30/3/2010	6*	104	22	50	2	178
31/3/2010	6*	651	87	46	16	800
1/4/2010	3**	233	105	175	31	544
10/4/2010	3**	37	11	2	9	59
6/4/2010	6*	357	757	204	148	1.466
7/4/2010	6*	297	260	71	37	665
Total		1.679	1.242	548	243	3.712

Dias	Nº de pontos	CDC		Leishtrap (P3)		Total
		M	F	M	F	
13/4/2010	3*	155	225	166	220	766
14/4/2010	3*	84	57	37	38	216
Total		239	282	203	258	982

* Localidade I- Fazenda Cipó 1º (14°02'S e 39°15'W)

** Localidade II- Fazenda Gonsalo (14°50'S e 39°10'W)

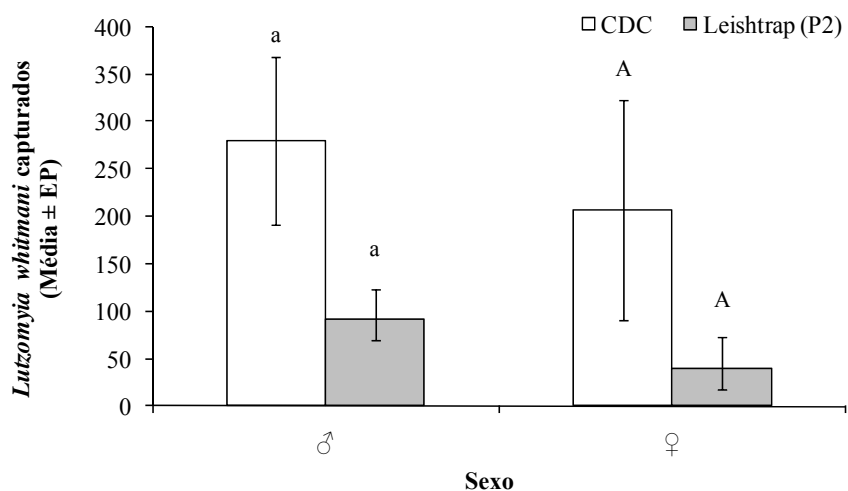


Figura 23- Média de *Lutzomyia whitmani*. (por sexo) capturados nas armadilhas CDC e em uma unidade da Leishtrap (P2) (a= Teste t, $p > 0,05$; A= Mann-Whitney, $p > 0,05$).

4. Discussão

A armadilha luminosa CDC (SUDIA & CHAMBERLAIN, 1962) é considerada uma armadilha padrão para captura de vetores de leishmanioses. Uma modificação dessa armadilha, denominada HP (PUGEDO *et al.* 2005), foi desenvolvida no Brasil e se mostrou tão eficiente quanto à CDC na captura de flebotomíneos. Ambas apresentam valor elevado no mercado e um baixo potencial de uso em grande escala, devido a pouca especificidade. Teoricamente, essas armadilhas devem funcionar durante o período noturno (escotofase) por até 12 horas. Para o seu funcionamento, utilizam-se quatro pilhas grandes/noite para girar um ventilador e manter a lâmpada incandescente funcionando. Com isso, uma grande limitação destas em larga escala é o uso de pilhas ou baterias e seu alto custo no mercado, além do transporte em grande número, risco de roubo e manutenção onerosa. Uma forma de substituir a energia empregada no ventilador da CDC ou HP (armadilha ativa) poderia ser o uso de cartão adesivo (armadilha passiva), como os descritos por MAROLI *et al.* (1997). Estes são confeccionados com um papel (geralmente branco) ou plástico untado com óleo de rícimo, onde os flebotomíneos são capturados por contato. Podem ser instaladas no interior de residências ou ao redor de anexos domiciliares para captura de flebotomíneos que vão se alimentar ou mesmo utilizadas para estudos de densidade e variações estacionais de diferentes espécies (TATCHER & HERTIG, 1966; MAROLI *et al.*, 1997). Essas armadilhas podem ser

colocadas ao nível do solo com uma estaca ou suspensas acima deste (WHEELER *et al.*, 1996; MAROLI *et al.*, 1997).

Na fase inicial do estudo, foram testados cartões adesivos de diferentes cores e alturas, com luz incandescente para a captura de *L. longipalpis s.l.* Embora, aparentemente, o cartão branco a 1,5m tenha apresentado um melhor resultado, maiores inferências, quando comparadas às cores, não puderam ser feitas devido ao baixo número de indivíduos capturados. Armadilhas com luz incandescente, de cor branca, posicionadas a 1,5m, são utilizadas e preconizadas como forma de captura de insetos noturnos (SUDIA & CHAMBERLAIN, 1962; REBÊLO, 2001; PUGEDO *et al.*, 2005) embora, para flebotomíneos, o estímulo luminoso pareça ter importância secundária para a localização de um hospedeiro (GIBSON & TORR, 1999).

A produção de luz química por pulseiras de neon, como as utilizadas no presente trabalho, surgiu como uma alternativa para substituição da luz incandescente, em um primeiro momento, para eliminar um par de pilhas da armadilha CDC, reduzindo seu custo. No entanto, não se conhecia sua intensidade luminosa e durabilidade. Em laboratório (experimento 2) demonstrou-se que a luz química verde possuía maior intensidade luminosa quando comparada às outras cores (azul, vermelha, amarela e laranja). Como demonstrado, a lâmpada incandescente da CDC (3 watts) apresentou 60 Lux enquanto a luz química verde, 15 Lux. Para alcançar a intensidade produzida para luz incandescente foram utilizadas 5 luzes químicas na CDC. Outro ponto relevante é que a luz química verde apresentou durabilidade de aproximadamente oito horas. Mesmo quando utilizada somente três unidades das luzes químicas nas diferentes cores (experimento 3), foi demonstrado que a CDC iscada com as diferentes cores não diferiu significativamente da luz incandescente, na captura de flebotomíneos ou mesmo da espécie *L. longipalpis s.l.* Uma melhor captura na CDC utilizando luzes químicas (três unidades), em relação ao controle (luz incandescente), foi devido a uma captura aproximada de 1.500 indivíduos em uma única noite por esta armadilha. Entretanto, foi possível confirmar, com estes testes que a luz verde atraía flebotomíneos, confirmando sua eficácia como possível substituta para a luz incandescente. Comparando as cores utilizadas no experimento, o resultado corrobora MELLOR *et al.* (1996), que indicaram uma atratividade de *L. longipalpis s.l.*, pela faixa de cores onde o verde está presente (520 a 546 nm). HOEL *et al.* (2007) adaptaram “light emitting-diodes” (LED) em armadilhas CDC e observaram que o LED vermelho atraiu, significativamente, mais *Phlebotomus papatasi* para a armadilha que as outras cores, incluindo a luz incandescente. A menor captura da espécie foi

feita na armadilha que continha LED verde (HOEL *et al.*, 2007). BURKETT *et al.* (2007) demonstraram que a armadilhas do tipo “stick trap” iscadas com luz química vermelha capturaram mais flebotomíneos no Iraque, quando comparada a outras cores, porém sua eficiência não foi mais que a da CDC. No presente trabalho a luz química verde possibilitou maior captura de *L. longipalpis s.l.* que a vermelha, em armadilhas do tipo CDC. Esta observação está de acordo com BURKETT *et al.* (1998) que encontraram taxas de capturas de culicídeos em ordem decrescente para luzes verde, incandescente, azul e vermelha, como no presente trabalho.

Foi demonstrado no experimento 4, que a armadilha CDC obteve maior eficiência de captura em relação ao P1 confeccionado. A CDC é uma armadilha ativa (ventilador) enquanto o cartão com cola (ou untado com óleo de rícimo) um método passivo (o inseto deve pousar no cartão para ser capturado) (MAROLI *et al.*, 1997). Estudos demonstram que a espécie *L. longipalpis s.l.* tende a ser muito abundante durante toda noite, atingindo um pico de captura na primeira metade noturna, variando entre 19:00 h e 23:00 h, dependendo da área e das condições ambientais da região (REBÊLO, 2001). Esse menor número de flebotomíneos capturados pelos cartões (P1) pode ser devido ao comportamento da espécie aliado ao seu hábito noturno, cuja durabilidade da luz química verde permitiria a atração da espécie para o cartão. BRAY *et al.* (2009) demonstraram que liberadores com a concentração de 50µg do feromônio sintético 9-metil-germacreno-B, iscados em armadilhas tipo “sticky trap”, atraíram mais machos e fêmeas de *L. longipalpis s.l.* que armadilhas controle (CDC). Os autores ainda constataram, em laboratório, uma taxa de evaporação de 0,3-1µg durante nove horas. No presente trabalho as taxas de liberação ou mesmo o liberador (septo de borracha) utilizado com o atraente poderiam não ter sido ideais para captura da espécie, sendo que também não foi calculada a taxa de evaporação do composto. No entanto, os protótipos P1 acrescidos com as taxas 1,5 mg/50µl do feromônio sexual sintético 9-metil-germacreno-B capturaram mais fêmeas da espécie *L. longipalpis s.l.* (101) que os cartões controle (78) e uma captura muito semelhante à CDC (112), oferecendo indícios de uma possível atração desse feromônio para a espécie em associação com a luz química. Entretanto, maiores inferências não puderam ser feitas, pois em Chapada Gaúcha foram encontrados três morfotipos da espécie *L. longipalpis s.l.*, possibilitando evidenciar a presença de diferentes feromônios, não somente o 9-metil-germacreno-B, como já demonstrado para outras regiões onde a espécie ocorre em simpatria (ARAKI *et al.*, 2009). Aliado a este fato, *L. longipalpis s.l.* tem sido caracterizados como um complexo de espécies (AZEVEDO *et al.*, 2000; BAUZER *et al.*, 2007) onde fêmeas de cada

população respondem, de forma distinta, aos feromônios sexuais produzidos pelos machos (JONES & HAMILTON, 1998).

Ao analisar a relação de captura de flebotomíneos entre a CDC e a armadilha Leishtrap (P2 e P3) observou-se, para *L. longipalpis s.l.*, que a razão de 5:1 (CDC/P2) do teste 1 reduziu para 2:1 (CDC/P3). Essa mesma observação foi feita para *L. whitmani*, cuja razão cai de 1:1 (CDC/P3) o que torna interessante novos experimentos comparando a CDC com mais de dois protótipos juntos. WHEELER *et al.* (1996) encontraram uma relação de captura de flebotomíneos de oito indivíduos (CDC/armadilha adesiva), taxa superior a do presente trabalho. Como demonstrado que, a captura dessas espécies de flebotomíneos, ao juntar mais de um protótipo da armadilha, torna-se positivo ou, possivelmente, o maior número de luzes químicas é diretamente proporcional a captura de flebotomíneos. Sabe-se que quanto maior a intensidade de luz e/ ou superfície de contato maior o poder de agregação dos insetos (JONG, 1967) e a eficácia de armadilhas adesivas (MAROLI *et al.*, 1997). A razão entre os sexos dos flebotomíneos nas armadilhas CDC e adesivas mostra-se maior para fêmeas indicando que elas são mais atraídas pela luz (WHEELER *et al.*, 1996) e a maior porcentagem de fêmeas de *L. longipalpis s.l.* em duas unidades da Leishtrap (78%) em relação aos machos (22%) pode ser devido à luz química, embora o mesmo não tenha sido observado com uma unidade da armadilha (P2). Essa maior porcentagem de captura de fêmeas de *L. whitmani* também foi observada utilizando duas unidades da Leishtrap e, assim como para *L. longipalpis s.l.*, o mesmo não foi observado para uma unidade.

As armadilhas Leishtrap (P2 ou P3), mostraram-se eficientes na captura dessas espécies de flebotomíneos, porém novos testes deverão ser realizados avaliando o tamanho da área adesiva do cartão, mais fontes luminosas e possivelmente diferentes cores. Entretanto, como demonstrado pelos ensaios preliminares, essas novas armadilhas poderiam substituir a CDC para pesquisas de fauna de flebotomíneos.

Nos testes 1 e 2 do experimento 6, em que foi avaliado a Leishtrap (P2 e P3) na captura de *L. longipalpis s.l.*, foi observado que embora as taxas de capturas da espécie tenham sido maiores na CDC, não houve diferença estatisticamente significativa aos do P2 ou P3. Também não houve diferença na taxa de captura de *L. whitmani* quando comparadas a de CDC e Leishtrap (P2). Mecanismos comportamentais pelos quais dípteros hematófagos localizam o hospedeiro, por meio de estímulos químicos (odor) e físicos (umidade, temperatura e visão), têm sido objetos de pesquisas (GIBSON & TORR, 1999). Trabalhos de campo com insetos que apresentam comportamento crepuscular ou noturno, visando a

resposta visual, são poucos conhecidos, embora se saiba que ambos os sexos sejam atraídos por luz artificial emitidas por armadilhas (MELLOR *et al.*, 1996). Para *L. longipalpis s.l.*, sabe-se que a espécie apresenta um pico secundário, para percepção de luz, na região azul-verde-amarela de 520 a 546 nm, o que demonstra que a espécie pode distinguir cores e intensidade. Tal fato teria importantes implicações no desenvolvimento de armadilhas luminosas.

É importante enfatizar que estes resultados foram positivos e estimuladores, uma vez que as pilhas usadas na armadilha CDC apresentam custos elevados, enquanto que a luz química (= pulseiras de neon) é de baixo custo no mercado, reduzindo assim o seu custo, problemas ambientais com descarte das baterias e o seu peso para o transporte de grande quantidade de pilhas. Ao contrário, o cartão adesivo pode ser feito com material reciclável, não poluindo, portanto, o meio ambiente. VAVRA *et al.* (1974) realizando testes para captura de mosquitos no Panamá com diferentes fontes e cores de luz adaptadas em armadilha CDC, não encontraram diferença entre atração de luz química e luz incandescente, recomendando a utilização e substituição da luz incandescente da armadilha CDC.

Os resultados obtidos no presente trabalho são promissores do ponto de vista da eficiência da Leishtrap, na sua facilidade de instalação, recolhimento e retirada dos flebotomíneos do cartão e do baixo custo para confecção. No entanto, faz-se necessário avançar as pesquisas e verificar os custos e benefícios que a Leishtrap (P2 ou P3) ofereceriam em relação a CDC, procurando esclarecer qual a melhor forma de emissão da luz química verde e qual o melhor material para confeccionar a nova armadilha.

4. Referências Bibliográficas

- ADLER, R. E.; THEODOR, O. On the *minutus* group of the genus *Phlebotomus* in Palestine. *Bull. Entomol. Res.*, v. 16, p. 399-405, 1926.
- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, V. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Ed.) *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 2003. p. 207-255.
- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M.; MARCO, T. S.; GAMBARDELLA, S. Ecology of sandflies in Serra do Mar, Itaguaí, State of Rio de Janeiro, Brasil. I- Sand fly fauna and prevalence of the species in collections sites and method of capture (Diptera: Psychodidae). *Cad. Saúde Pública*, v. 12, p. 195-206, 1996.
- ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.*, v. 17, p. 1-18, 2003.
- ALEXANDER, B.; OLIVEIRA, E. B.; HAIGH, E.; ALMEIDA, L. L. Influence of the lunar cycle on the activity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, v. 18, p. 114-118, 2002.
- ALEXANDER, B.; USMA, M. C.; CADENA, H.; QUESADA, B. L.; SOLARTE, Y.; ROA, W.; TRAVI, B. L. Evaluation of deltamethrin-impregnated bednets and curtains against phlebotominae sandflies in Valle del Cauca, Colombia. *Med. Vet. Entomol.*, v. 9, p. 279-283, 1995.
- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; DE JONGH, D. C.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L.. Química Orgânica. 2ª ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1978, 961p.
- AMÓRA, S. S. A.; BEVILAQUA, C. M. L.; FEIJÓ, F. M. C.; ALVES, N. D.; MACIEL, M. V. Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. *Neotrop. Entomol.*, v. 38, p. 303-310, 2009.
- ANDRADE, A. J.; ANDRADE, M. R.; DIAS, E. S.; PINTO, M. C.; EIRAS, A. E. Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 337-343, 2008.
- ANDRADE FILHO, J. D.; BRAZIL, R. P. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of Alagoas state, northeast of Brazil. *Neotrop. Entomol.*, v. 38, p. 688-690, 2009.
- ANDRADE FILHO, J. D.; OLIVEIRA, R. C.; FONSECA, A. R. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) Coletados com Armadilha Malaise no Centro-Oeste de Minas Gerais. *Neotrop. Entomol.*, v. 37, p. 104-106, 2008.

- ANDRADE FILHO, J. D.; VALENTE, M. B.; ANDRADE, W. A.; BRAZIL, R. P.; FALCÃO, A. L. Flebotomíneos do estado do Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, p. 323-329, 2001.
- ANTUNES, P. C. A.; COUTINHO, J. O. Notas sobre flebotomos sul-americanos. II. Descrição de *Flebotomus whitmani* n. sp. e da armadura bucal de algumas espécies. *Boletim Biológico*, v. 4, p. 448-451, 1939.
- ARAKI, A. S.; VIDOGER, F. M.; BAUZER, L. G. S. R.; FERREIRA, G. E. M; SOUZA, N. A.; ARAÚJO, I. B.; HAMILTON, J. C. G.; BRAZIL, R. P.; PEIXOTO, A. A. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 3. 2009.
- AYRES, M.; AYRES, J. R. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. *BioEstat 4.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém, Sociedade Civil Mamirauá, com CD-ROM, Campos GM, 2005, p. 367.
- AZEVEDO, A. C. R.; COSTA, S. M.; PINTO, M. C. G.; SOUZA, J. L.; CRUZ, H. C.; VIDAL, J.; RANGEL, E. F. Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 760-767, 2008.
- AZEVEDO, A. C. R.; MONTEIRO, F. A.; CABELLO, P. H.; SOUZA, N. A.; ROSA-FREITAS, M. G.; RANGEL, E. F. Studies on population of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 305-322, 2000.
- AZEVEDO, A. C. R., RANGEL E. F.; COSTA, E. M.; DAVID, J.; VASCONCELOS, A. W.; LOPES, U. G. Natural infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *braziliensis* complex in Baturité, Ceará State, Northeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 85, p. 251, 1990.
- AZEVEDO, A. C. R.; RANGEL, E. F. A study of sandfly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in the municipality of a Baturité, Ceará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 405-410, 1991.
- AZEVEDO, A. C. R.; SOUZA, N. A.; MENESES, C. R. V.; COSTA, W. A.; COSTA, S. M.; LIMA, J. B.; RANGEL, E. F. Ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in north of the State of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 459-464, 2002.
- AZEVEDO, A. C. R.; VILELA, M. L.; SOUZA, N. A.; ANDRADE-COELHO, C. A.; BARBOSA, A. F.; FIRMO, A. L. S.; RANGEL, E. F. The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, State of Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 75-79, 1996.
- BARRETTO, M. P. Observações sobre a biologia do *Phlebotomus whitmani* Antunes e Coutinho, 1939 (Diptera, Psychodidae) em condições experimentais. *Pap. Avulsos Zool.*, v.1, p. 87-100, 1941.

- BARRETTO, M. P. Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebótomos do estado de São Paulo (Diptera: Psychodidae). Tese de Livre-Docência, 1943, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 162p.
- BAUZER, L. G. S. R.; GESTO, J. S. M.; SOUZA, N. A.; WARD, R. D.; HAMILTON, J. G. C.; KYRIACOU, C. P.; PEIXOTO, A. A. Molecular Divergence in the *period* gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Mol. Biol. Evol.*, v. 19, p. 1624–1627, 2002.
- BAUZER, L. G. S. R.; SOUZA, N. A.; MAINGON, R. D. C.; PEIXOTO, A. A. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 1-12, 2007.
- BEJARANO, E. E.; PÉREZ-DORIA, A.; SIERRA, D. Descripción de una nueva especie de *Trichomyia* (Diptera: Psychodidae) de los Andes Colombianos. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* v. 68, p. 295-300, 2009a.
- BEJARANO, E. E.; PÉREZ-DORIA, A.; SIERRA, D. *Trichomyia quimbaya*, una nueva especie de Trichomyiinae (Diptera: Psychodidae) de la Cordillera Central de Colombia. *Biota Neotrop.* v. 9, p.97-100, 2009b.
- BLOMQUIST, G. J.; JACKSON, L. L. Chemistry and biochemistry of insect waxes. *Prog. lipid. Res.*, v. 17, p. 319-45, 1979.
- BLOMQUIST, G. J.; NELSON, D. R.; DE RENOBALLES, M. Chemistry, biochemistry and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, p. 227-265, 1987.
- BONGIORNO, G.; HABLUETZEL, A.; KHOURY, C.; MAROLI, M. Host preferences of phlebotominae sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop.*, v. 88, p. 109-116, 2003.
- BRANDÃO-FILHO, S. P.; CARVALHO, F. G.; BRITO, M. E. F.; ALMEIDA, F. A.; NASCIMENTO, L. A. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in Zona da Mata region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 445-449, 1994.
- BRAY, D.; ALVES, G. B.; DORVAL, M. E.; BRAZIL, R. P.; HAMILTON, J. C. G. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. *Parasites & Vectors*, v. 3, p. 16-26, 2010.
- BRAY, D. P.; BANDI, K. K.; BRAZIL, R. P.; OLIVEIRA, A. G.; HAMILTON, J. G. C. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. *J. Med. Entomol.*, v. 46, p. 428-43, 2009.
- BRAZIL, R. P.; MORTON, I. E.; WARD, R. D. Notes of the feeding habitats of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera Psychodidae) in Ceara State, Northeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 497-98, 1991.

- BURKETT, D. A.; BUTLER, J. F.; KLINE, D. L. Field evaluation of colored light-emitting diodes as attractants for woodland mosquitoes and other Diptera in north central Florida. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* v. 14, p.186–195, 1998.
- BURKETT, D. A.; KNIGHT, R.; DENNET, J. A.; SHERWOOD, V.; ROWTON, E.; COLEMAN, R. E. Impact os phlebotomine sand flies on U.S. Military Operations st Tallil Air Base, Iraq: 3. Evaluation of surveillance devices for the collection of adult sand flies. *J. Me.Entomol.* v. 44, p. 381-384, 2007
- CAMPBELL-LENDRUM, D. H.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; PINTO, M. C.; VEXENAT, A.; READY, P. A.; DAVIES, C. R. Domesticity of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) populations: field experiments indicate behavioural differences. *Bull. Entomol. Res.*, v. 90, p. 41-48, 2000.
- CAPUTO, B.; DANI, F. R.; HORNE, G. L.; PETRARCA, V.; TULLIRAZZI, S.; COLUZZI, M.; PRIESTMAN, A. A.; DELLA TORRE, A. Identification and composition of cuticular hydrocarbons of the major Afrotropical malaria vector *Anopheles gambiae s.s.* (Diptera: Culicidae): analysis of sexual dimorphism and age-related changes. *J. Mass. Spectrom.*, v. 40, p. 1595-1604, 2005.
- CARLSON, D. A.; REINERT, J. F.; BERNIER, U. R.; SUTTON, B. D.; SEAWRIGHT, J. A. Analysis of the cuticular hydrocarbons among species of the *Anopheles quadrimaculatus* complex (Diptera: Culicidae). *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, v. 13 (Supplement), p. 103-111, 1997
- CARLSON, D. A.; SERVICE, M. W. Differentiation between species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae) by analysis of cuticular hydrocarbons. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 73, p. 589-592, 1979.
- CARLSON, D. A.; SERVICE, M. W. Identification of mosquitoes of *Anopheles gambiae* species complex A and B by analysis of cuticular components. *Science*, v. 207, 1089-1091, 1980.
- CARLSON, D. A.; WALSH, J. F. Identification of two West African black flies (Diptera: Simuliidae) of the *Simulium damnosum* species complex by analysis of cuticular paraffins. *Acta Tropica*, v. 38, p. 235-239, 1981.
- CARVALHO, G. M. A.; ANDRADE-FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L.; ROCHA LIMAS, A. C. V. M.; GONTIJO, C. M. F. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v. 8, p. 407-414, 2008.
- CARVALHO, G. M. L.; FALCÃO, A. L.; ANDRADE-FILHO, J. D. Taxonomic revision of phlebotominae sand fly species in the series *davisi* and *panamensis* of the subgenus *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 129-136, 2006.
- CHEN, C. S. M. S.; MARCH, R. B.; CHANEY, J. D. Cuticular hydrocarbon patterns in *Culex quinquefasciatus* as influenced by age, sex and geography. *Bull. Soc. Vec. Ecol.*, v. 15, p. 129-139, 1990.

- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.
- CORTE, A. A.; NOZAWA, M. R.; FERREIRA, M. C.; PIGNATTI, M. G.; RANGEL, O.; LACERRA, S. S. Aspectos eco-epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas. *Cad. Saúde Pública*, v. 12, p. 465-472, 1996.
- COSTA, S. M.; CHENICHEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J. C.; LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil - Mini Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 149-53, 2007.
- CRESCENTE, J. A.; SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. A cross-sectional on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Aazonian region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 103, p. 1250-1256, 2009.
- DAMON, R. A.; HARVEY, W. R. Experimental design, ANOVA, and regression. New York: Harper and Row, 1987. 320p.
- DANTAS-TORRES, F Canine leishmaniosis in South America. *Parasit. Vect.*, v. 2 (Supl. 1), p.S1, 2009.
- DAVIES, C. R.; LANE, R. R.; VILLASECA, P.; PYKE, S.; CAMPOS, P.; LLANOS-CUENTAS, E. A. The relation between CDC light-trap and human-bait catches of endophagic sandflies (Diptera: Psychodidae) in the peruvian Andes. *Med. Vet. Entomol.*, Oxford, v. 9, p. 241-248, 1995.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Sobre a biologia do “*Phlebotomus longipalpis*” transmissor da leishmaniose visceral, em uma zona endêmica do Estado do Ceará, I, Distribuição, predominância e variação sazonal. *Rev. Brasil. Biol.*, v. 15, p. 83-95, 1995.
- DIAS, E. S.; BARATA, R. A.; FORTES-DIAS, C. L.; BRAZIL, R. P.; MIRANDA, J. C., BRANDÃO-FILHO, S. B. Morphometric and phenetic studies of five geographical populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil. *J. Med. Entomol.*, v. 36, p. 846-850, 1999.
- DIAS-LIMA, A.; BERMUDEZ, E. C.; MEDEIROS, J. F. E.; SHERLOCK, I. A. Estratificação vertical da fauna de flebotomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta de área primária de terra firme da Amazônia Central, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 18, p. 823-832, 2002.
- DIAS-LIMA, A. G.; GUEDES, M. L. S.; SHERLOCK, I. A. Horizontal stratification of the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in a transitional vegetation between caatinga and tropical rain forest, State Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 733-737, 2003.
- DIAS-SVERSUTTI, A. C.; SCODRO, R. B. L.; REINHOLD-CASTRO, K. R.; NEITZKE, H. C.; TEODORO, U. Estudo preliminar da preferência alimentar de *Nyssomyia neivai*

- (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em área rural do Paraná. *Neotrop. Entomol.*, v. 36, p. 253-59, 2007.
- DORVAL, M. E.; ALVES, T. P.; OLIVEIRA, A. G.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. B.; CUNHA R. V. Modification of Disney trap for capture of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 877-878, 2007.
- DUJARDIN, J. P.; TORREZ, E. M.; LE PONT, F.; HERVAS, D.; SOSSA, D. Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Med. Vet. Entomol.*, v. 11, p. 394-400, 1997.
- DUTRA E SILVA, J. G.; WERNECK, G. L.; PIRES E CRUZ, M. S.; COSTA, C. H. N.; MENDONÇA, I. L. Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 23, p. 1715-20, 2007.
- EIRAS, A. E. Mediadores químicos entre hospedeiros e insetos de doenças médico-veterinárias. In: VILELA, E. F.; DELLA-LÚCIA, T. M. C. (Eds.), *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. Ribeirão Preto: Editora Holos. 2001. cap. 12, p. 99-112.
- EIRAS, A. E.; JEPSON, P. C. The behavioural responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to carbon dioxide plumes. In: Niemeyer, H. M. (Ed.) *Techniques in Plant-Insect Interactions and Biopesticides*. Santiago: Proceedings of an IFS Workshop in Chemical Ecology. 1996. p. 185-189.
- FAIMAN, R.; CUÑO, R.; WARBURG, A. Comparative efficacy of three suction traps for collecting phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in open habitats. *J. Vector Ecol.*, v. 34, p. 114-118, 2009.
- FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of Phlebotominae sandflies. *Med. Vet. Entomol.*, v. 18, p. 71-80, 2004.
- FELTNER, H.; FERRAO, P. Evaluating efficacy of the BG Lure attractant using three mosquito trap designs in the city of Alexandria, Virginia. - Presentation at 33rd Annual Conference of the Mid-Atlantic Mosquito Control Association, 2008
- FERREIRA, A. L.; SESSA, P. A.; VAREJÃO, J. B. M.; FALQUETO, A. Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in a endemic region of american cutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 1061-1067, 2001.
- FORATTINI, O. *Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose*. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo. 1973. 658 p.
- FORATTINI, O. Notas sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peridomiciliares no estado de São Paulo. *Arq. Fac. Hig. Saúde Pública Univ. São Paulo*, v. 8, p. 157-168, 1960.

- GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In Rangel, E. F.; Lainson, R.(Eds.) *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 2003a, p. 23-51.
- GALATI, E. A. B. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: Rangel, E. F.; Lainson, R.(Eds.), *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 2003b, p. 53-175.
- GALATI, E. A. B. Phylogenetic Systematic of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. In: II International Symposium on Phlebotominae sandflies, 1995, Mérida. Boletín de la dirección de malariología y saneamiento ambiental. Maracay: Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental Dr. Arnaldo Gabaldon, 1995. v. 35. p. 133-142.
- GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ESPÍNDOLA, M. A.; ROCHA, H. C.; GONÇALVES-ANDRADE, R. M.; NAUFEL, G. Attractiveness of black Shanon trap for phlebotomines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 941-647, 2001.
- GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; BOGGIANI, P. C.; DORVAL, M. E. C.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; OSHIRO, E. T.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in forested areas of the Serra da Bodoquena, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 175-193, 2006.
- GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; CRISTALDO, G.; ESPÍNDOLA, M. A.; ROCHA, H. C.; GARCIA, W. B. Estudos de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar, no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 30, p. 115-28, 1996.
- GAMA, R. A. Periodicidade de hematofagia de *Anopheles darlingi*, em Porto Velho (RO), e modificação da armadilha BG-Sentinel para a captura de anofelinos, visando a substituição da atração humana, Tese de Doutorado, 2009, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 172p.
- GEBRE-MICHAEL, T.; LANE, R. P.; PHILLIPS, A.; MILIGAN, P.; MOLYNEUX, D. H. Contrast in the cuticular hydrocarbons of sympatric *Phlebotomus* (*Synphlebotomus*) females (Diptera: Phlebotominae). *Bull. Entomol. Res.*, v. 84, p. 225-231, 1994.
- GEIER, M.; BOSH, O. J.; BOECKH, J. Ammonia as an attractive of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Chem. Senses*, Oxford, v. 24, p. 647-653, 1999.
- GIBBS, A. G. Water-proffing properties of cuticular lipids. *Amer. Zool.*, v. 38, p. 471-482, 1998.
- GIBSON, G.; TORR, S. J. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Med. Vet. Entomol.*, v. 13, p. 2-23, 1999.
- GIL, L. H. S.; BASANO, S. A.; SOUZA, A. A.; SILVA, M. G. S.; BARATA, I.; ISHIKAWA, E. A.; CAMARGO, L. M. A.; SHAW, J. J. Recent observations on the sand fly (Diptera, Psychodidae) fauna of the State of Rondônia, western Amazônia, Brazil: the

- importance of *Psychodopygus davisi* as a vector zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 751-755, 2003.
- GOMES, A. C.; GALATI, E. A. B. Flebotomíneos de Londrina, Paraná (Brasil) e observações ecológicas sobre algumas espécies. *Rev. Saúde Pública*, v. 11, p. 284-287, 1977.
- GOMES, A. C.; RABELLO, E. X.; GALATI, E. A. B. Flebotomíneos encontrados em galinheiros experimentais nos estados de São Paulo e Minas Gerais (Brasil) e algumas observações ecológicas. *Rev. Saúde Pública*, v. 12, p. 403-407, 1978.
- GULIAS-GOMES, C. C.; TRIGO, J. R.; EIRAS, A. E. Sex pheromone of the American warble fly, *Dermatobia hominis*: the role of cuticular hydrocarbons. *J. Chem. Ecol.*, v. 34, p. 636-646, 2008.
- HADLEY, N. F. The arthropod cuticle. *Sci. am.*, v. 254, p. 104-120, 1986.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RIAN, P. D. 2001. Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Version. 1.37. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 01.03.2010.
- HAMILTON, J. G. C.; BRAZIL, R. P.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; DAVIES, C. R.; KELLY, D. W.; PESSOA, F. A. C.; QUEIROZ, R. G. Distribution of pupative male sex pheromones among *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 96, p. 83-92, 2002.
- HAMILTON, J. G. C.; DAWSON, G. W.; PICKETT, J. A. 3-methyl- α -himachalene: proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil. *J. Chem. Ecol.*, v. 22, p. 2331-2340, 1996a.
- HAMILTON, J. G. C.; DAWSON, G. W.; PICKETT, J. A. 9-methylgermacrene-B: proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. *J. Chem. Ecol.*, v. 22, p. 1477-1491, 1996b.
- HAMILTON, J. G. C.; IBBOTSON, H. C.; HOOPER, A. M.; MORI, K.; PICKETT, J. A.; SANO, S. 9-methylgermacrene-B confirmed by synthesis as the sex pheromone of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and the absolute stereochemistry defined as 9S. *Chem. Commun.*, v. 23, p. 2335-2336, 1999.
- HAMILTON, J. G. C.; MAINGON, R. D. C.; ALEXANDER, R.; WARD, R. D.; BRAZIL, R. P. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia* sandflies from six regions in Brazil. *Med. Vet. Ent.*, v. 19, p. 480-488, 2005.
- HAMILTON, J. G. C.; RAMSOONDAR, T. M. C. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. *Med. Vet. Entomol.*, Oxford, v. 8, p. 375-380, 1994.
- HAMILTON, J. G. C.; WARD, R. D. Gas-chromatographic analysis of *Lutzomyia longipalpis* tergal pheromone gland extract. *Parassitologia*, v. 33 (Suppl. 1), p. 283-289, 1991.

- HOCH, A.; RYAN, L.; VEXENAT, J. A.; ROSA, A. C.; BARRETO, A. C. Isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis* and other trypanosomatids from Phlebotomine in a cucucutaneous leishmaniasis endemic area, Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81, p. 63, 1986.
- HOPPE, K. L.; DILLWITH, J. W.; WRIGHT, R. E.; SZUMLAS, D. E. Identification of horse flies (Diptera: Tabanidae) by analysis of cuticular hydrocarbons. *J. Med. Entomol.*, v. 27, p. 480-486, 1990.
- HORNE, G. L.; PRIESTMAN, A. A. The chemical characterization of the epicuticular hydrocarbons of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, v. 92, p. 287-294, 2002.
- HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 27, p. 149-172, 1982.
- HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 50, p. 371-393, 2005.
- HUGO, L. E.; KAY, B. H.; EAGLESHAN, G. K.; HOLLING, N.; RYAN, P. A. Investigation of cuticular hydrocarbons for determining the age and survivorship of Australian mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 74, p. 462-474, 2006.
- IBAMA- Instituto Brasileiro de Meio Ambiente. <http://www.ibama.gov.br>. Acesso em maio 2009.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em maio/ 2009.
- ISHIKAWA, E. A. Y.; READY, P. D.; SOUZA, A. A.; DAY, J. C.; RANGEL; E. F.; DAVIES, C. R.; SHAW, J. J. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 339-345, 1999.
- JACKSON, L. L.; BLOMQUIST, G. J. Insect waxes. In KOLATTUKUDY, P. E. (Ed.) *Chemistry and biochemistry of natural waxes* Amsterdam, Elsevier, 1969. p. 201-233.
- JONES, T. M.; HAMILTON, J. G. C. A role pheromones in mate choice in a lekking sandfly. *Anim. Behav.*, v. 56, p. 891-898, 1998.
- JONG, D. L. Some problems connected with the use of light traps. *Entomophaga*, v. 3, p. 25-32, 1967.
- JUÁREZ, M. P.; CARLSON, D. A.; SCHETTINO, P. M. S.; MIJAILOVSKY, S.; ROJAS, G. Cuticular hydrocarbons of Chagas disease vectors in Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 819-827, 2002.
- JUSTINIANO, S. C. B.; CHAGAS, A. C.; PESSOA, F. A. C.; QUEIROZ, R. G. Biologia comparada de duas populações de *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) da

- Amazônia Central, Brasil, sob condições de laboratório. *Braz. J. Biol.*, v. 64, p. 227-235, 2004.
- KAMHAWI, S.; MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R.; MILLIGAN, P. J. M.; PHILLIPS, A.; WILKES, T. J.; KILLICK-KENDRICK, M. Two populations of *Phlebotomus ariasi* in the Cérvenes focus of leishmaniasis in the south of France revealed by analysis of cuticular hydrocarbons. *Med. Vet. Ent.*, v. 1, p. 97-102 1987.
- KELLY, D. W.; DYE, C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Anim. Behav.*, v. 53, p. 721-731, 1997.
- KITTAYAPONG, P.; CLARK, J. M.; EDMAN, J. D.; LAVINE, B. K.; MARION, J. R.; BROOKS, M. Survey of the *Anopheles maculatus* complex (Diptera: Culicidae) in peninsular Malaysia by analysis of cuticular lipids. *J. Med. Entomol.*, v. 30, p. 969-974, 1993.
- KOVATS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. In: Giddings, J. C.; Keller, R. A. (Ed.), *Advances in Chromatography* Marcel Dekker, Inc., New York, 1965, v. 1, p. 229-247.
- KRÖECKEL, U.; ROSE, A.; EIRAS, A. E.; GEIER, M. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparasion of trap catches with human landing rates in an urban environment. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, v. 22, p. 229-238, 2006.
- KRUGER, E. L.; PAPPAS, C. D. Geographic variation of cuticular hydrocarbons among fourteen populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, v. 30, p. 544-548, 1993.
- KRUGER, E. L.; PAPPAS, C. D.; HOWARD, R. W. Cuticular hydrocarbon geographic variation among seven North American populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, v. 28, p. 859-864, 1991.
- LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, v. 321, p. 389-404, 1988.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 811-827, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. In: Cox, F. E. G.; Kreier, J. P.; Wakelin, D. (Ed.) *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. London, ASM Press, 2005. p. 313-49.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI Isolation and identification of *Leishmania* species from sand flies, wild mammals and man in north Pará state, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 35, p. 530-536, 1981.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; WARD, R. D.; READY, P. D.; NAIFF, R. D. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcintus*), and

- observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 73, p. 239-42, 1979.
- LANE, R. Recent advances in phlebotomine sand flies. *Insect Science and its Applications*. v. 7, p. 225-230, 1986.
- LANE, R. P.; READY, P. D. Multivariate discrimination between *Lutzomyia wellcomei*, a vector of mucocutaneous leishmaniasis, and *Lu. complexus* (Diptera: Phlebotominae). *Ann Trop. Med. Parasitol.*, v. 79, p. 469-472, 1985.
- LANE, R. P.; SOUZA BERNADES, D. Histology and ultrastructure of pheromone secreting glands in males of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 84: 53-61, 1990.
- LANE R.; WARD, R. D. The morphology and possible function of abdominal patches in males of the two forms of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Cah ORSTOM Ser. Ent. Med. Parasit.* v. 22, p. 245-249, 1984.
- LEWIS, D. J. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Entomol.* v. 45, p. 121-209, 1982.
- LOCKEY, K. H. The adult cuticular hydrocarbons of *Tenebrio molitor* L. *Tenebrio obscurus* F. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insect Biochem.*, v. 8, p. 237-250, 1978.
- LOCKEY, K. H. Insect cuticular hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 65, p. 457-462, 1980.
- LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: Origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 98, p. 151-163, 1988.
- LOCKEY, K. H. Insect hydrocarbon classes: implications for chemotaxonomy. *Insect Biochem.*, v. 1, p. 91-97, 1991.
- LUZ, E.; MEMBRIVE, E. A.; CASTRO, E. A.; DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as vector of *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraná state, southern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 94, p. 623-31, 2000.
- MACIEL-DE-FREITAS, R.; CODEÇO, C. T.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 4, p. 359-665, 2007.
- MACIEL-DE-FREITAS, R.; EIRAS, A. E.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 321-325, 2006.
- MAHAMAT, H.; HASSANALI, A. Cuticular hydrocarbon composition analysis for taxonomic differentiation of phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae) in Kenya. *J. Med. Entomol.*, v. 35, p. 778-781, 1998.

- MANGABEIRA, O. E. Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. *Rev. Bras. Malarial. D. Trop.*, v. 12, p. 3-26, 1969.
- MARGONARI, C. S.; DIAS-FORTES, C. L.; DIAS, E. S. Genetic variability in geographical populations of *Lutzomyia whitmani* elucidated by RAPD-PCR. *J. Med. Entomol.*, v. 41, p. 187-192, 2004.
- MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; ARIAS, J. Métodos de captura, conservacion y montaje de los flebotomos (Diptera: Psychodidae). OPS/OMS/HCP/HCT/95/97, Washington. 1997, 72 p.
- MARTINS, A. V.; WILLIAMS, P.; FALCÃO, A. L. *American sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae)*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 1978. 195p.
- MASSAFERA, R.; SILVA, A. M.; CARVALHO, A. P.; SANTOS, D. R.; GALATI, E. A. B., TEODORO, U. Fauna de flebotomíneos do município de Bandeirantes, no estado do Paraná. *Rev. Saúde Pública*, v. 39, p. 571-577, 2005.
- MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M. V.; DIAS, M.; MARTINS, A. V.; MAGALHÃES, P. A.; FALCÃO, A. R.; MELO M. N.; FALCÃO, A. L. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 73, p. 123-137, 1979.
- MEERAUS, W. H.; ARMISTEAD, J. S.; ARIAS, J. R. Field comparison of novel and gold standard traps for collecting *Aedes albopictus* in Northern Virginia. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, v. 24, p. 244-248, 2008.
- MELLOR, H. E.; HAMILTON, J. G. C. Navigation of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) under dusk or starlight conditions. *Bull. Entomol. Res.*, Farnham Royal, v. 93, p. 315-322, 2003.
- MELLOR, H. E.; HAMILTON, J. G. C.; ANDERSON, M. Spectral sensitivity in the eyes of male and female *Lutzomyia longipalpis* sandflies. *Med. Vet. Entomol.*, v. 10, p. 371-374, 1996.
- MILLEST, A. L. Identification of members of the *Simulium ochraceum* species complex in the three onchocerciasis foci in Mexico. *Med. Vet. Entomol.*, v. 6, p. 23-28, 1992.
- MILLIGAN, P. J. M.; PHILLIPS, A.; BROOMFIELD, G.; MOLYNEUX, D. H.; TOURE, Y. T.; COLUZZI, M. A study of the use of gas chromatography of cuticular hydrocarbons for identifying members of the *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) complex. *Bull. Entomol. Res.*, v. 83, p. 613-624, 1993.
- MILLIGAN, P. J. M.; PHILLIPS, A.; MOLYNEUX, D. H.; SUBBARAO, S. K.; WHITE, G. B. Differentiation of *Anopheles culicifacies* Giles (Diptera: Culicidae) sibling species by analysis of cuticular components. *Bull. Entomol. Res.*, v. 76, p. 529-537, 1986.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, FUNASA, MS, 62p., 2000.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Leishmaniose visceral (calazar)* - Distribuição de casos confirmados, por Federada. Brasil, 1980–2005 http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/visceral_2006.pdf. Accessed in 10/XI/2007.
- MISSAWA, N. A.; DIAS, E. S. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Várzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 913-918, 2007.
- MISSAWA, N. A.; MACIEL, G. B. M. L. List of species in the genus *Lutzomyia* França 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) from the State of Mato Grosso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 40, p. 11-14, 2008.
- MISSAWA, N. A.; MACIEL, G. B. M. L.; RODRIGUES, H. Distribuição geográfica de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) no Estado do Mato Grosso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 41, p. 369-373, 2008.
- MOLINEUX, D. H.; PHILLIPS, A. Cuticular hydrocarbons as tools in vector ecology. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOCIETY FOR VECTOR ECOLOGY, 1988, Europa, p. 15, 1988.
- MONTOYA-LERMA, J. Autogeny in the tropical sand fly *Lutzomyia lichyi* (Diptera: Psychodidae) from Colombia. *J. Med. Entomol.*, Lanham, v. 29, p. 698-699, 1992.
- MORENO, J.; RUBIO-PALIS, Y.; PÉREZ, E.; SÁNCHEZ, V.; PÁEZ, E. Evaluación de três métodos de captura de anofelinos em un área endémica de malaria del estado Bolívar, Venezuela. *Entomotropica*, v. 14, p. 157-165, 2002.
- MUNIZ, L. H. G.; ROSSI, R. M.; NEITZKE, H. C.; MONTEIRO, W. M.; TEODORO, U. Estudos dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. *Rev. de Saúde Pública*, v. 40, p. 1087-1093, 2004.
- MUNSTERMANN, L. E. Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. In: Marquardt, W. C.; Black, W. C.; Freier, J.; Hagedorn, H.; Hemingway, J.; Higgs, S.; James, A. A.; Kondratieff, B. (Eds.) *Biology of Disease Vectors*, 2004, 2nd Edition, Elsevier Science, San Diego, California, p. 141-151.
- MUTERO, C. M.; MUTINGA, M. J.; BIRLEY, M. H.; AMIMO, F. A.; MUNYINYI, D. M. Description and performance of an updrat trap for sandflies. *Trop. Med. Parasitol.*, v. 42, p. 407-412, 1991.
- NASCIMENTO, J. C.; PAIVA, B. R.; MALAFRONTA, R. S.; FERNADES, W. D.; GALATI, E. A. B. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in visceral-leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v. 49, p. 119-122, 2007.
- NELSON, D. R.; CARLSON, D. A. Cuticular hydrocarbons of the tsetse flies *Glossina morsitans morsitans*, *G. austeni* and *G. pallidipes*. *Insect. Biochem.*, v. 16, p. 403-416, 1986

- NIGAN, Y.; WARD, R. D. The effects of male sandfly pheromone and host factors as attractants for female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Physiol. Entomol.*, v. 16, p. 305-312, 1991.
- NUNES, V. L. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; NOGUCHI, R. C.; ARÃO, L. B.; HANS FILHO, G.; ESPÍNDOLA, M. A.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; SERAFINI, L. N.; SANTOS, D. Estudo epidemiológico sobre leishmaniose tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul – Estudos na população humana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 28, p.185-193, 1995.
- ODORIZZI, R. M. F. N.; GALATI, E. A. B. Flebotomíneos de várzea do rio Aguapeí, região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 41, p. 645-652, 2007.
- OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE-FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. *Cad. Saúde Pública*, v. 19, p. 933-944, 2003.
- OLIVEIRA, A. G.; MARASSÁ, A. M.; GONSALES, C. A.; DORVAL, M. E. C.; FERNANDES, C. E.; OLIVEIRA, G. R.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. B. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic área of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Tropica*, v. 107, p. 238-41, 2008.
- OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, p. 540-543, 2006.
- ORSHAN, L.; SZEKELY, D.; SCHNUR, H.; WILAMOWSKI, A.; GALER, Y.; BITTON, S.; SCHLEIN, Y. Attempts to control sandflies by insecticide-sprayed strips along the periphery of a village. *J. Vector Ecol.*, v. 31, p. 113-117, 2006.
- PACHECO, A. S.; SILVA, A. S. L.; MEDEIROS, C. G.; OLIVEIRA, C. D. C.; SOUZA, E. F.; AMARANTE, E. S.; LOPES, J. A. S.; PACHECO, J. J.; SILVA, M. A. M.; MOREIRA, M. G. P.; ROCHA, N. A.; COUTO, S. J. M.; FREITAS, Z. *Estatística Municipal de Barcarena-PA*. Governo do Estado do Pará. Secretaria Especial de Gestão, Secretaria Executiva de Estado e Planejamento, Orçamento e Finanças (SEPOF). Belém-PA, 2007.
- PAPPAS, C. D.; BRICKER, B. J.; CHRISTEN, J. A.; RUMBAUGH, S. A. Cuticular hydrocarbons of *Aedes hendersoni* Cockerell and *A. triseriatus* (Say). *J. Chem. Ecol.*, v. 20, p. 1121-1136, 1994.
- PASSOS, V. M. A.; FALCÃO, A. L.; MARZOCHI, A. W.; GONTIJO, C. M. F.; DIAS, E. S.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O.; GUERRA, H. L.; KATZ, N. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 88, p. 103-110, 1993.

- PASSOS, V. M. A.; SILVA, R. E.; FALCÃO, A. L. Fauna flebotomínica de municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 24 (Suppl. 11), p. 107.
- PÉREZ, J. E.; VILLASECA, A.; LLANOS-CUENTA, A.; CAMPOS, M.; GUERRA, H. Técnicas para coletar “titiras” (*Lutzomyia* spp., Diptera: Psychodidae) em ambientes altoandinos peruanos. *Rev. Peru. Ent.*, v. 30, p. 77-80, 1988.
- PESSÔA, S. B.; BARRETO, M. P. Infecção natural e experimental dos flebótomos pela *Leishmania braziliensis* no estado de São Paulo. *Hospital*, v. 20, p. 25-35, 1941.
- PESSÔA, S. B.; BARRETO, M. P. *Leishmaniose Tegumentar Americana* Monografia Ministério Educação e Saúde Rio de Janeiro, 1944.
- PETERSON, A. T.; SHAW, J. J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Int. J. Parasit.*, v. 33, p. 919-931, 2003.
- PHILLIPS, A.; LE PONT, F.; DESJEUX, P.; BROOMFIELD, G.; MOLYNEAUX, D. H. Separation of *Psychodopygus carrerai carrerai* and *P. yucumensis* (Diptera: Psychodidae) by gas chromatography of cuticular hydrocarbons. *Acta Tropica*, v. 47, p. 45-149, 1990a.
- PHILLIPS, A.; MILLIGAN, P.; MAROLI, M.; LANE, R. P.; KAMHAWI, S.; ROOMFIELD, G.; MOLYNEUX, D. H. Intraspecific variation in the cuticular hydrocarbons of the sandfly *Phlebotomus perfiliewi* from Italy. *Med. Vet. Ent.*, v. 4, p. 451-457, 1990b.
- PHILLIPS, A.; MILLIGAN, P. J. M. Cuticular hydrocarbons distinguish sibling species of vectors. *Parasitol Today*, v. 2, p. 180-181, 1986.
- PHILLIPS, A.; MILLIGAN, P. J. M.; BROOMFIELD, G.; MOLYNEUX, D. H. Identification of medically important Diptera by analysis of cuticular hydrocarbons. In Service, M. W. (Ed.) *Biosystematics of Hematophagous Insects*, Systematics Association, Clarendon Press, Oxford, 1988. v. 37, p. 39-59.
- PHILLIPS, A.; SABATI, A.; MILLIGAN, P. J. M.; BOCCOLINI, D.; BROOMFIELD, G.; MOLYNEUX, D. H. The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae): comparison of the cuticular hydrocarbon profiles determined in adults of five palaeartic species. *Bull. Entomol. Res.*, v. 80, p. 459-464, 1990c.
- PHILLIPS, A.; WALSH, F.; CARMS, R.; MOLYNEUX, D. H.; MILLIGAN, P.; IBRAHIM, G. Identification of adults of the *Simulium damnosum* complex using hydrocarbon analysis. *Trop. Med. Parasitol.*, v. 36, p. 97-101, 1985.
- PHILLIPS, A.; CROSSKEY, R.; SHELLEY, A.; BROOMFIELD, G.; MOLYNEUX, H. Cuticular hydrocarbon analysis of museum Simuliidae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, p. 844, 1986.
- PIELOU, E. C. *The Interpretation of Ecological Data*. John Willey and Sons, New York, 1984, 263p.

- PINTO, M. C.; CAMPBELL-LENDRUM, D. H.; LOZOVEI, A. L., TEODORO, U.; DAVIES, C. R. Phlebotominae sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med. Vet. Entomol.*, v. 15, p. 132-139, 2001.
- POLERSTOCK, A. R.; EIGENBRODE, S. D.; KLOWDEN, M. J. Mating alters the cuticular hydrocarbons of female *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, v. 39, p. 545-552, 2002.
- PUGEDO, H.; BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J. C.; SILVA, J. C.; DIAS, E. S. HP: um modelo apropriado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, p. 70-72, 2005.
- QUATE, L. W.; ALEXANDER, J. B. Synopsis of New World *Nemopalpus* (Diptera: Psychodidae: Bruchomyiinae) with description of four new species. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, v. 93, p. 185-193, 2000.
- QUEIROZ, R. G.; VASCONCELOS, I. A.; PESSOA, F. A.; DE SOUZA, R. N.; DAVID, J. R. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in northeastern Brazil: incrimination of *L. whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 50, p. 693-698, 1994.
- QUINNELL, R. J.; DYE, C.; SHAW, J. J. Host preferences of the phlebotominae sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med. Vet. Entomol.*, v. 6, p. 195-200, 1992.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R.; SOUZA, A. A.; READY, P.; AZEVEDO, A. C. R. Variation between geographical populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 43-50, 1996.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 937-954, 2009.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In: Rangel, E. F., Lainson, R. (Ed.) *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 291-309.
- RANGEL, E. F.; SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E. D.; BARBOSA, A. F. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 79, p. 395-396, 1984.
- READY, P. D.; DAY, J. C.; SOUZA, A. A.; RANGEL, E. F.; DAVIES, C. R. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bull. Entomol. Res.*, v. 87, p. 187-195, 1997.
- READY, P. D.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; WARD, R. D. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward & Fraiha (Diptera: Psychodidae) the major vector to man of *Leishmania*

- braziliensis guyanensis* in north-eastern Amazonian Brazil. *Bull. Entomol. Res.*, v. 76, p. 21-40, 1986.
- READY, P. D.; RANGEL, E. F. Caracteres isoenzimáticos e moleculares: espécies crípticas. In: Rangel, E. F.; Lainson, R. (Ed.). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003, p. 185-206.
- READY, P. D.; SOUZA, A. A.; REBÊLO, J. M.; DAY, J. C.; SILVEIRA, F. T.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; DAVIES, C. R.; COSTA, J. M. L. Phylogenetic species and domesticity of *Lutzomyia whitmani* at the south-east boundary of Amazonian Brazil. *Bull. Entomol. Res.*, v. 87, p. 187-195.
- REBÊLO, J. M. M. Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 17, p. 221-227, 2001.
- REBÊLO, J. M. M.; ARAÚJO, J. A. C.; CARVALHO, M. L.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S.; OLIVEIRA, S. T. Flebotomos (Diptera, Psychodidae) da Ilha de São Luís, Zona do Golfão Maranhense, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 32, p. 247-253, 1999.
- REBÊLO, J. M. M.; OLIVEIRA, S. T.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S.; COSTA, J. M. L.; FERREIRA, L. A.; SILVA, A. R. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 33, p. 11-19, 2000.
- REBOLLAR-TELLEZ, E. A.; HAMILTON, J. G. C.; WARD, R. D. Responses of female *Lutzomyia longipalpis* to host odour kairomones from human skin. *Physiol. Entomol.*, Oxford, v. 24, p. 220-226, 1999.
- ROSA-FREITAS, M. G.; BROOMFIELD, G.; PRIESTMAN, A.; MILLIGAN, P. J. M.; MOMEN, H.; MOLINEUAX, D. H. Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, v. 8, p. 357-366, 1992.
- RYAN, L. *Flebotomos do Estado do Pará, Brasil (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)*. Documento Técnico nº 1, Instituto Evandro Chagas, Ministério da Saúde, 1986, 154p.
- RYAN, L.; PHILLIPS, A.; MILLIGAN, P.; LAINSON, R.; MOLYNEUX, D. H.; SHAW, J. J. Separation of *Psychodopygus wellcomei* and *P. complexus* (Diptera: Psychodidae) by cuticular hydrocarbon analysis. *Acta Tropica*. v. 73, p.85-89, 1986.
- RYAN, L.; VEXENAT, A.; MARSDEN, P. D.; LAINSON, R. The importance of rapid diagnoses of new cases of cutaneous leishmaniasis in pinpointing the sand fly vector. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, v. 84, p. 786, 1990.
- SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITA, R. A.; MALACO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, v. 12, p. 315-317, 1998.

- SANTOS, T. G.; GAIA, M. C. M.; BRAZIL, R. P. Attraction of sand flies (Diptera: Psychodidae) light traps in rural areas of Minas Gerais. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, v.19, p. 74-78, 2003.
- SERVICE, M. W. New tools for old taxonomic problems in bloodsucking insects. In: SERVICE, M. W (Ed.). *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Clarendon Press, Oxford. 1988. p. 325-345.
- SHANNON, R. Methods for collecting and feeding mosquitosin jungle yellow fever studies. *Am. J. Trop. Med.* v. 19, p. 131-140, 1939.
- SHAW, J. J. How climatic and environmental variations affect the eco-epidemiology of the leishmaniasis and their control. In: III WORKSHOP DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR DE INSETOS VETORES DE DOENÇAS TROPICAIS - ENTOMOL 3. Pernambuco, Brasil; 2008. p. 13-17.
- SHAW, J. J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 541-547, 2007.
- SHAW, J.J.; ISHIKAWA, E. A. Y.; LAINSON, R.; BRAGA, R. R.; SILVEIRA, F. T. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, De Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira in Pará State, Brazil. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 66, p. 243-246, 1991.
- SHAW, J.J.; ROSA, A. T.; SOUZA, A.; CRUZ, A. C. Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In Rangel, E. F.; Lainson, R.(Ed.) *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 2003, p. 337-351.
- SHERLOCK, I. A importância dos flebotomíneos. In Rangel, E. F.; Lainson, R.(Ed.) *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 2003, p. 15-21.
- SHERLOCK, I. A.; MAIA, H.; DIAS-LIMA, A. G. Resultados preliminares de um projeto sobre a ecologia dos flebotomíneos vetores de leishmaniose tegumentar no Estado da Bahia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 29, p. 207-214, 1996.
- SHERLOCK, I. A.; PESSÔA, S. B. Métodos práticos para a captura de flebótomos. *Rev. Bras. Biol.*, v. 24, p. 331-340, 1964.
- SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITA, R. A.; MALACO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, v. 12, p. 315-317, 1998.
- SILVA, A. M.; CAMARGO, N. J.; SANTOS, D. R.; MASSAFERA, R.; FERREIRA, A. C.; POSTAI, C.; CRISTÓVÃO, E. C.; KONOLSAISEN, J. F.; JR. BISSETO, A.; PERINAZO, R.; TEODORO, U.; GALATI, E. A. B. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. *Neotrop. Entomol.*, v. 37, p. 209-225, 2008.

- SILVA, O. S.; BLAZIUS, R. D.; ROMÃO, P. R. T. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) coletados em galinheiro no Rio Grande do Sul, Brasil. *Entomol. Vect.*, v. 11, p. 283-289, 2004.
- SILVA, O. S.; GRÜNEWALD, J. Natural haematophagy of males *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae). *Méd. Vet. Entomol.*, v. 13, p. 465-466, 1999.
- SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) a review. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v. 75, p. 303-330, 2003.
- SOUZA, C. F.; BORGES, M. A. Z., ANDRADE, A. J. Contribution to the knowledge of the phlebotomine sand flies fauna (Diptera: Psychodidae) of Timóteo municipality, Minas Gerais, Brazil. *Neotrop. Entomol.* v. 38, p. 267-231, 2009a.
- SOUZA, C. M.; FORTES-DIAS, C. L.; LINARDI, P. M.; DIAS, E. S. Phenetic studies in randomly polymorphic DNA-polymerase chain reaction-variability of four geographical populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37, p. 148-153, 2004.
- SOUZA, N. A.; ANDRADE-COELHO, C. A.; PEIXOTO, A. A.; RANGEL, E. F. Nocturnal activity rhythms of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of american cutaneous leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Entomol.*, v. 42, p. 986-992, 2005.
- SOUZA, N. A.; ANDRADE-COELHO, C. A.; VILELA, M. L.; PEIXOTO, A. A.; RANGEL, E. F. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in área of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 759-765, 2002.
- SOUZA, N. A.; VILELA, M. L.; ANDRADE-COELHO, C. A.; RANGEL, E. F. The Phlebotominae sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of two Atlantic Rain Forest Reservs in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 319-324, 2001.
- STEIB, B. M.; GEIER, M.; BECKH, J. The effect of lactic acid on odour-related host preference of yellow fever mosquitoes. *Chem. Senses*, v. 26, p. 523-528, 2001.
- SUDIA, W.A.; CHAMBERLAIN, R.W. Battery-operated light trap: an improved model. *Mosq. News*, v. 22, n. 2, p. 126-129, 1962.
- TANIGUCHI, H. H.; TOLEZANO, J. E.; CORRÊA, F. M. A.; MORAES, R. H. P.; MARASSÁ, A. M. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. I. Composição da fauna flebotomínica no Município de São Roque, região de Sorocaba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 51, p. 23-30, 1991.
- THATCHER, V. E.; HERTIG, M. Field studies on the feeding habits on diurnal shelters of some *Phlebotomus* sand flies (Diptera: Psychodidae) in Panama. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, v. 59, p. 46-52, 1966.
- TEODORO, U.; ALBERTONB, D.; KÜHL, J. B.; SANTOS, E. S.; SANTOS, D. R.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Ecology

- of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* in an urban área in Brazil. *Rev. Saúde Pública*, v. 37, p. 651-656, 2003.
- TEODORO, U.; KÜHL, J. B.; RODRIGUES, M.; SANTOS, E. S.; SANTOS, D. R.; MARÓSTICA, L. M. F. Flebotomíneos coletados em matas remanescentes e abrigos de animais silvestres de zoológico no perímetro urbano de Maringá, Sul do Brasil. Estudo preliminar. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 31, p. 517-522, 1998.
- TEODORO, U.; LA SALVIA FILHO, V.; LIMA, E. M.; SPINOSA, R. P.; BARBOSA, O. C.; FERREIRA, E. M. C.; LONARDONI, M. V. C. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no Norte do estado do Paraná, sul do Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 27, p. 242-249, 1993.
- TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; DIAS, A. C.; ABBAS, M.; ALBERTON, D.; SANTOS, D. R. Light and hems as attraction factors of *Nissomyia whitmani* in a rural area, Southern Brazil. *Cad. Saúde Pública*, v. 41, p. 383-388, 2007.
- TRAVI, B. L.; MONTOYA, J.; SOLARTE, Y.; LOZANO, L.; JARAMILHA, C. Leishmaniasis in Colombia. I. Studies on the phlebotominae fauna associated with endemic foci in the Pacific Coast region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Mclean, v. 39, p. 261-266, 1998.
- VAVRA, R. W.; CARESTIA, R. R.; FROMMHR, R. L.; GERBERG, E. I. Field evaluation of alternative light sources as mosquito attractants in the Panama Canal Zone. *Moq. news*, v. 34, p. 382-384, 1974.
- VEXENAT, J. A.; BARRETO, A. C.; CUBA-CUBA, C. A.; MARSDEN, P. D. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em ma região endêmica do Estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81, p. 293-302, 1986a.
- VEXENAT, J. A.; BARRETO, A. C.; ROSA, A. C. O. C. Experimental infection of *Lutzomyia whitmani* in dogs infected with *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81, p. 125-126, 1986b.
- VILELA, M. L.; CARVALHO, B. M.; RANGEL, E. Studies on the vectors os leishmaniases in the state of Tocantins, Brazil: Porto Nacional municipality, transmission ares of American visceral leishmaniasis. In: 6TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHLEBOTOMINE SANDFLIES – ISOPS 6. Lima, Peru; 2008. p. 103.
- VILELA, M. L.; RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Métodos de coleta e preservação de flebotomíneos. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Ed.) *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003. cap. 8, p. 353-367.
- VIVERO, R. J.; BEJARANO, E. E.; PÉREZ-DORIA, A.; FLÓREZ, F.; ESTRADA, L. G.; TORRES, C.; MUSKUS, C. Nuevos registros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), con el hallazgo de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), en los alrededores de la Ciudad de Sincelejo, Colombia. *Biota Neotrop.* v. 9, p. 277-280, 2009.

- WALSH, J. E.; MOLINEUX, D. H.; BIRLEY, M. H. Deforestation: effects oh vector-borne disease. *Parassitol.* v 106, p. 55-75, 1993.
- WARD, R. D.; MORTON, I. E.; LANCASTER, V.; SMITH, P.; SWIFT, A. Bioassays as an indicator of pheromone communication in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). In: HART, D.T. (Ed.), *Leishmaniasis: the current status and new strategies for control* New York, Plenum Press, 1989. p. 235-245.
- WARD, R. D.; RIBEIRO, A. L.; READY, P. D.; MURTAGH, A. 1983. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v. 78, p. 269-280.
- WHEELER, A. S.; FELICIANGELI, M. D.; WARD, R. D.; MAINGON, R. D. C. Comparison of sticky-traps and CDC light-traps for sampling phlebotomine sandflies entering houses in Venezuela. *Med. Vet. Entomol.* v. 10, p. 295-299, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION *Report of the Scientific Working Group Meeting on insect vectors and human health.* Scientific Working Group, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2003. 73p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION *Scientific working group on leishmaniasis: report of the first meeting.* Unpublished document TDR/LEISH-SWG (1)/77.3, Geneva, 1977.
- XIMENES, M. F. F.M.; SOUZA, M. F.; CASTELLÓN, E. G. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of Visceral. Leishmaniasis in State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, n. 4, p. 427-432, 1999.
- YOUNG D 1979 *A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae).* Institute of Food and Agricultural Sciences; Agricultural Experiment Stations, Gainesville. Technical Bulletin 806, 266 p.
- YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. *Guide to the Identification and Geographic Distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae).* American Entomological Institute, 1994. 881p.