INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA
COORDENAÇÃO DE BIODIVERSIDADE

ARMADILHA BG-MALÁRIA: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA E DA ADIÇÃO DE SUOR HUMANO NA CAPTURA DE ANOFELINOS, COM ÊNFASE EM *Anopheles darlingi* Root, 1926 (DIPTERA, CULICIDAE)

LEANDRO BARROS LEAL

Manaus, Amazonas

Março, 2014

LEANDRO BARROS LEAL

ARMADILHA BG-MALÁRIA: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA E DA ADIÇÃO DE SUOR HUMANO NA CAPTURA DE ANOFELINOS, COM ÊNFASE EM *Anopheles darlingi* Root, 1926 (DIPTERA, CULICIDAE)

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-orientadora: Dr[a] Ivoneide Maria da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia.

Manaus, Amazonas

Março, 2014

BANCA EXAMINADORA

Dissertação defendida em 31/03/2014

Felipe Arley Costa Pessoa

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Ricardo Augusto Passos

Fundação de Vigilância em Saúde – FVS

Iléa Brandão Rodrigues

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia– INPA

Eloy Guillermo C. Bermudéz

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia– INPA

L433 Leal, Leandro Barros

Armadilha BG-Malária: avaliação do efeito da temperatura e da adição de suor humano na captura de anofelinos, com ênfase em *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae) / Leandro Barros Leal. --- Manaus: [s.n], 2014.

xii, 76 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.

Orientador : Wanderli Pedro Tadei.

Coorientador : Ivoneide Maria da Silva.

Área de concentração : Entomologia.

1. Malária. 2. Anofelinos. 3. *Anopheles darlingi*. I. Título.

CDD 616.9362

Sinopse:

Utilizou-se a armadilha BG-Malária para verificar as taxas de atratividade para anofelinos em diferentes temperaturas internas e modalidades de suor humano, em áreas periurbanas de Manaus, Amazonas.

Palavras Chave: BG-Malária, *Anopheles darlingi*, odor humano, temperatura.

Dedico à minha mãe, que mesmo distante,

sempre se manteve ao meu lado

Agradecimentos

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Programa de Pós Graduação em Entomologia pela oportunidade a mim oferecida, bem como ao CNPq pelo auxílio financeiro;

Ao professor Dr. Wanderli Pedro Tadei, pela orientação, pela confiança em mim depositada, por toda a sua ajuda e esforço ao nosso trabalho, e acima de tudo, por ter se tornado um grande amigo;

À professora Dr[a] Ivoneide Maria da Silva, da Universidade Federal do Pará, pela co-orientação, pelas sugestões, colaborações e ajuda no trabalho de campo e redação desta dissertação;

Ao Laboratório de Ecologia Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e ao Laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal do Pará (UFPA) por terem cedido as armadilhas para a realização dos experimentos;

Ao MSc Bruno Morales por todo o seu conhecimento e pela ajuda nas análises estatísticas dos dados;

Aos técnicos do Laboratório de Malária e Dengue pela ajuda durante as coletas em campo, e em especial, ao Senhor Valnir, do setor de transporte do INPA, que nunca mediu esforços para que as coletas ocorressem normalmente;

Aos amigos de Pós Graduação da turma de entomologia 2012: Jeane, Patrik, Diego, Karine, Antônio, Márlon e Rafael pela inestimável amizade e por serem parte da minha nova família formada aqui em Manaus;

Aos colegas de Laboratório, Juliana, André, Rochelly, Rejane, Waléria, Érica, Alex e Muana pela ajuda em todos os momentos que precisei, e que se tornaram pessoas muito queridas, das quais sentirei muitas saudades, em qualquer lugar que eu esteja;

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Entomologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA);

Agradeço ainda à todas as outras pessoas que passaram por minha vida durante o período de realização deste Mestrado em Entomologia. Cada um me fez crescer à sua maneira, seja com conhecimentos acerca de mosquitos, insetos, conhecimentos cotidianos e com sua experiência de vida.

“Muda que quando a gente muda, o mundo muda com a gente.

A gente muda o mundo na mudança da mente.”

Gabriel, o pensador

Resumo

A malária é um dos maiores problemas de saúde pública. O agente patológico causador dessa doença é transmitido por mosquitos do gênero *Anopheles* spp. Os mosquitos utilizam principalmente sinais químicos e físicos para encontrar recursos sanguíneos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da temperatura e da adição do suor humano na captura de mosquitos do gênero *Anopheles*, com ênfase em *A. darlingi*, pela armadilha BG-Malária. Armadilhas contendo CO_2 foram utilizadas para comparar a atratividade de diferentes modalidades de suor e de diferentes temperaturas. Nos experimentos com temperatura foram utilizadas lâmpadas para aquecimento com potências distintas, e os quatro tratamentos avaliados foram: (1) Apenas CO_2 (controle–sem lâmpada); (2) CO_2+lâmpada 15V; (3) CO_2+ lâmpada 40V; (4) CO_2+ lâmpada 60V. Nos experimentos com suor, foram avaliados 11 tratamentos: 1-Apenas CO_2; 2-Meia limpa; 3-Camisa limpa; 4–Suor fresco do pé feminino; 5-Suor incubado do pé feminino; 6-Suor fresco do tronco feminino; 7-Suor incubado do tronco feminino; 8-Suor fresco do pé masculino; 9-Suor incubado do pé masculino; 10-Suor fresco do tronco masculino; 11-Suor incubado do tronco masculino. Para a coleta do suor, foram utilizadas meias e camisas brancas, que foram utilizadas por voluntários do sexo masculino e feminino. Ambos os experimentos foram submetidos a um delineamento experimental do tipo quadrado latino, que foi repetido três vezes. Ao longo de todo o estudo foram coletados 20.775 mosquitos, dos quais os anofelinos compreenderam 64,11% (13.320 indivíduos), enquanto 35,89% (7.455 indivíduos) foram culicíneos. Os 13.320 anofelinos coletados nos três sítios de amostragem ao longo de 45 noites pertenceram a nove espécies. *A. darlingi* foi a espécie predominante em ambos os experimentos, representando 80,77% do total de anofelinos coletados. No experimento com temperatura, foram estabelecidas três temperaturas distintas aproximadamente constantes. Houve congruência entre a voltagem das lâmpadas e a temperatura média alcançada por cada uma delas: 24.9 ºC na armadilha sem lâmpada, 26.6 ºC na lâmpada de 15V, 29.7 ºC na lâmpada de 40V e 31.6 ºC na lâmpada de 60V. Os quatro tratamentos avaliados capturaram juntos um total de 4.643 anofelinos, distribuídos em nove espécies, dentre as quais *A. darlingi* foi predominante, com 4.431 (95.4%) espécimes. Tanto para anofelinos em geral, quanto para *A. darlingi*, em cada um dos três quadrados latino realizados, não houve diferença significativa na média de mosquitos capturados pelos quatro tratamentos. No entanto, houve diferença significativa entre os pontos de coleta do segundo quadrado latino. No experimento com suor humano foi capturado um total de 8.677 anofelinos, representados por oito espécies distribuídas em todos os tratamentos, dentre as quais *A. darlingi* foi mais abundante, sendo representado por 6.328 (72,9%) espécimes. Tanto para anofelinos em geral, quanto para *A. darlingi*, não houve diferença significativa na média de mosquitos capturados pelos tratamentos, em cada um dos três quadrados latino realizados, porém o suor incubado do tronco (seja masculino ou feminino) sempre capturou mais mosquitos. Contudo, houve diferenças na média de mosquitos capturados em cada ponto de coleta.

Palavras chave: BG-Malária; Anofelinos; *Anopheles darlingi*; armadilhas, Amazônia

Abstract

Malaria is one of the biggest public health problems. The pathologic agent that causes this disease is transmitted by mosquitoes of the genus *Anopheles*, which use mostly chemical and physical signals to find blood resources. Therefore, this study's goal was to assess the effect of temperature and human sweat on capturing *Anopheles* mosquitoes, especially *A. darlingi*, using a BG-Malaria trap. Traps with CO_2 were used in order to compare the attractiveness of different temperature and sweat treatments. In the experiments evaluating temperature, it was used heat light bulbs of different powers. Four treatments were evaluated: (1) CO_2 only (control-without light bulb); (2) CO_2 + 15V light bulb; (3) CO_2 + 40V light bulb; (4) CO_2 + 60V light bulb. In order to assess the effect of sweat, eleven treatments were conducted: (1) CO_2 only; (2) clean socks; (3) clean shirt; (4) fresh sweat from female foot; (5) incubated sweat from female foot; (6) fresh sweat from female trunk; (7) incubated sweat from female trunk; (8) fresh sweat from male foot; (9) incubated sweat from male foot; (10) fresh sweat from male trunk; (11) incubated sweat from male trunk. White socks and shirts were worn by male and female volunteers in order to collect sweat. Both experiments, with temperature and sweat, underwent a Latin square experimental design, repeated for three times. During the study, 20,775 mosquitoes were collected. Anophelines represented 64.11% (13,320 individuals) of the sample, while culicines accounted for 35.89% (7,455 individuals). The 13,320 anophelines were collected in three sampling sites during 45 nights, and belong to nine species. *A. darlingi* was the predominant species in both experiments, accounting for 80.77% of all anophelines collected. In the temperature experiment, the three established temperatures were kept nearly constant. There was congruence between the light bulb voltage and the average temperature reached by them: 24.9 ^{o}C in the trap without light bulb; 26.6 ^{o}C in the 15V light bulb; 29.7 ^{o}C in the 40V, and 31.6 ^{o}C in the 60V bulb. Together, the four treatments have captured 4,643 anophelines, distributed in nine species. Among them, *A. darlingi* was the prevalent species, with 4,431 (95.4%) specimens. According to the results of the three Latin squares performed, for both anophelines in general and *A. darlingi* alone, there was no significant difference in the mean of captured mosquitoes among the four treatments. Conversely, there was a significant difference among the sampling sites in the second Latin square. In the human sweat experiment, 8,677 anophelines were captured, represented by eight species present in all treatments. Among them, *A. darling* was the most abundant one, with 6,328 (72.9%) specimens. Similarly to the temperature treatment, there was no significant difference in the mean of captured mosquitoes among the sweat treatments, for both anophelines in general and *A. darlingi*. Nevertheless, the incubated sweat from both male and female trunk always captured more mosquitoes. Additionally, there was a difference in the mean of captured mosquitoes among the sampling sites.

Keywords: BG-Malaria; Anophelines; *Anopheles darlingi*; Traps; Amazon

Sumário

1. Introdução 1
1.1. Malária 1
1.2. Anofelinos 2
1.3. Influência da temperatura na atração de mosquitos 5
1.4. Utilização sinais químicos para localização de hospedeiro vertebrado 6
1.4.1. Dióxido de carbono 8
1.4.2. Ácido lático 8
1.4.3. Amônia 9
1.4.4. Octenol 9
1.5. Suor e micro flora da pele 9
1.6. Medidas de controle e monitoramento de anofelinos 10
1.6.1. Armadilhas para captura de anofelinos adultos 13
1.6.2. Armadilha BG-malária 14
2. Justificativa 15
3. Objetivos 16
3.1. Geral: 16
3.2. Específicos: 16
4. Material e Métodos 17
4.1. Locais de coleta 17
4.2. Desenho experimental 19
4.3. Avaliação da temperatura na coleta de anofelinos 20
4.4. Avaliação da adição do suor humano na taxa de captura de anofelinos pela BG-Malária 22
4.5. Análise dos dados 26
5. Resultados 27
5.1. Abundância de exemplares da família Culicidae 27
5.2. Avaliação do efeito da temperatura para a coleta de anofelinos 28
5.3. Efeito da adição do suor humano na taxa de captura de anofelinos pela BG-Malária 37
6. Discussão 57
6.1. Avaliação da adição da temperatura na armadilha para a coleta de anofelinos 57
6.2. Efeito da adição do suor humano na taxa de captura de anofelinos pela BG-Malária 58
7. Conclusões 61
8. Referências 62
ANEXO 1 75

Lista de Figuras

Figura 1. Armadilhas para captura de mosquitos. A) BG-Sentinel. Fonte: trampamosquito.com/ingles/mas-info/BG-sentinel.php. B) BG-Malária. Fonte: L.G.S. Soares. Setas amarelas e vermelhas indicam, respectivamente, a entrada e saída de ar na armadilha.....14

Figura 2. Mapa de Manaus com a localização das áreas de coleta durante os meses de Maio, Junho, Agosto e Setembro de 2013. Em destaque com círculo vermelho, estão situadas as localidades onde foram realizadas as coletas. Fonte: Google Mapa.....18

Figura 3. Armadilha BG-Malária instalada em campo para coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus nos meses de Maio, Junho, Agosto e Setembro de 2013.....19

Figura 4. Lâmpadas com diferentes potências para aquecimento das armadilhas durante coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus nos meses de Maio e Junho de 2014. Fonte: L.B. Leal.....20

Figura 5. Aquecimento da armadilha BG-Malária utilizada coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus nos meses de Maio e Junho de 2014. A) Diagrama do sistema de aquecimento. Fonte: adaptado de Krockel et al., 2006. B) Armadilha aquecida. Fonte: L.B. Leal.....21

Figura 6. Ilustração representando o percurso que cada armadilha, e seu respectivo tratamento, percorreram até o término do Quadrado Latino 4x4, durante coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus nos meses de Maio e Junho de 2014.....21

Figura 7. Roupas brancas para a coleta do suor utilizadas em campo para coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus nos meses de Agosto e Setembro de 2014. (A) Camisa; (B) Meias.....22

Figura 8. Camisas (A) e meias (B) anexadas no interior das armadilhas para coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus nos meses de Agosto e Setembro de 2014. Setas vermelhas indicam o compartimento da armadilha no qual as roupas foram presas.....24

Figura 9. Ilustração representando o trajeto que cada armadilha, e seu respectivo atrativo, percorreram até o término do Quadrado Latino 11x11, em coletas realizadas na área periurbana de Manaus nos meses de Agosto e Setembro de 2014.....25

Figura 10. Temperatura média alcançada nas armadilhas contendo lâmpadas aquecedoras e na armadilha sem lâmpada, em coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus, nos meses de Maio e Junho de 2014.....29

Figura 11. Média e erro padrão do número de anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados com quatro temperaturas avaliadas no primeiro quadrado latino durante os meses de Maio e Junho de 2014, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus..... 32

Figura 12. Média e erro padrão do número de anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados nos quatro pontos de coleta do primeiro quadrado latino, durante os meses de Maio e Junho de 2014, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus 32

Figura 13. Média e erro padrão do número de anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados com quatro temperaturas avaliadas no segundo quadrado latino, durante os meses de Maio e Junho de 2014, realizado no Sítio Barnabé, Manaus..... 34

Figura 14. Média e erro padrão do número de anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados nos quatro pontos de coleta do segundo quadrado latino, durante os meses de Maio e Junho de 2014, realizado no Sítio Barnabé, Manaus. Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey). Letras maiúsculas indicam diferenças na abundância de anofelinos em geral, enquanto letras minúsculas indicam diferença na abundância de *A. darlingi*.....34

Figura 15. Média e erro padrão de anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados com quatro temperaturas avaliadas no terceiro quadrado latino, durante os meses de Maio e Junho de 2014, realizado no Sítio Barnabé, Manaus.....36

Figura 16. Média e erro padrão de anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados nos quatro pontos de coleta do terceiro quadrado latino, durante os meses de Maio e Junho de 2014, realizado no Sítio Barnabé, Manaus 37

Figura 17. Média e erro padrão de anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados nos 11 tratamentos avaliados no primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Barnabé, Manaus.....44

Figura 18. Média e erro padrão de anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados nos 11 pontos de coletas do primeiro quadrado latino, no Sítio Barnabé, Manaus. Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey). Letras maiúsculas indicam diferenças na abundância de anofelinos em geral, enquanto letras minúsculas indicam diferença na abundância de *A. darlingi*.....44

Figura 19. Média e erro padrão do anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados nos 11 tratamentos avaliados no segundo quadrado latino, realizado no Sítio Raifran, Manaus.....50

Figura 20. Média e erro padrão de anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados nos 11 pontos de coletas do segundo quadrado latino, realizado no Sítio Raifran, Manaus. Diferentes letras em cima da barra indicam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey). Letras maiúsculas indicam diferenças na abundância de anofelinos em geral, enquanto letras minúsculas indicam diferença na abundância de *A. darlingi*.....50

Figura 21. Média e erro padrão do anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados nos 11 tratamentos avaliados no terceiro quadrado latino, realizado no Sítio Raifran, Manaus.....56

Figura 22. Média e erro padrão de anofelinos, e de *A. darlingi*, capturados nos 11 pontos de coletas do terceiro quadrado latino, realizado no Sítio Raifran, Manaus. Diferentes letras em cima da barra indicam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey). Letras maiúsculas indicam diferenças na abundância de anofelinos em geral, enquanto letras minúsculas indicam diferença na abundância de *A. darlingi*.....56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Abundância e porcentagem de culicídeos capturados na armadilha BG-Malária, em experimento com temperatura e suor, realizados durante os meses de Maio, Junho, Agosto e Setembro de 2014, na zona Leste de Manaus, Amazonas.....27

Tabela 2. Temperaturas obtidas durante o desenvolvimento das amostragens em cada uma das quatro armadilhas utilizadas.....28

Tabela 3. Abundância de anofelinos capturados nos experimentos com temperatura e suor humano, realizados na cidade de Manaus.....30

Tabela 4. Total de anofelinos capturados em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus.....30

Tabela 5. Total de anofelinos capturados em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus.....31

Tabela 6. Total de *A. darlingi* capturados em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus.....31

Tabela 7. Total de *A. darlingi* capturados em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus.....31

Tabela 8. Total de anofelinos capturados em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o segundo quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....33

Tabela 9. Total de anofelinos capturados em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o segundo quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....33

Tabela 10. Total de *A. darlingi* capturados em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o segundo quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....33

Tabela 11. Total de *A. darlingi* capturados em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o segundo quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....34

Tabela 12. Total de anofelinos capturados em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....35

Tabela 13. Total de anofelinos capturados em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....35

Tabela 14. Total de *A. darlingi* capturados em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....36

Tabela 15. Total de *A. darlingi* capturados em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....36

Tabela 16. Abundância e porcentagem de anofelinos capturados na armadilha BG-Malária, em experimento com 11 tratamentos realizado durante os meses de Maio e Junho de 2014, na zona Leste de Manaus, Amazonas.....38

Tabela 17. Total de anofelinos capturados em cada tratamento avaliado no experimento com suor, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....40

Tabela 18. Total de anofelinos capturados em cada ponto de amostragem no experimento com suor, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....41

Tabela 19. Total de *A. darlingi* capturados em cada tratamento avaliado no experimento com suor, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....42

Tabela 20. Total de *A. darlingi* capturados em cada ponto de amostragem no experimento com suor, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Barnabé, Manaus.....43

Tabela 21. Total de anofelinos capturados em cada tratamento avaliado no experimento com suor, durante o segundo quadrado latino, realizado no Raifran, Manaus.....46

Tabela 22. Total de anofelinos capturados em cada ponto de amostragem no experimento com suor, durante o segundo quadrado latino, realizado no Raifran, Manaus.....47

Tabela 23. Total de *A. darlingi* capturados em cada tratamento avaliado no experimento com suor, durante o segundo quadrado latino, realizado no Raifran, Manaus.....48

Tabela 24. Total de *A. darlingi* capturados em cada ponto de amostragem no experimento com suor, durante o segundo quadrado latino, realizado no Raifran, Manaus.....49

Tabela 25. Total de anofelinos capturados em cada tratamento avaliado no experimento com suor, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Raifran, Manaus.....52

Tabela 26. Total de anofelinos capturados em cada ponto de amostragem no experimento com suor, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Raifran, Manaus.....53

Tabela 27. Total de *A. darlingi* capturados em cada tratamento avaliado no experimento com suor, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Raifran, Manaus.....54

Tabela 28. Total de *A. darlingi* capturados em cada ponto de amostragem no experimento com suor, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Raifran, Manaus.....55

1. Introdução

1.1. Malária

A malária é uma das doenças mais antigas conhecidas pelo homem. Os seus sintomas clássicos são descritos desde a era pré-cristã, quando foram relatados pela primeira vez por Hipócrates, o "pai da medicina". Em 1880, Charles Laveran observou organismos em movimento no sangue de uma pessoa doente, mas a ratificação de que a malária era uma hemoparasitose foi feita por Gerhardt em 1884 (Braga e Fontes, 2005).

Apesar de ser uma doença milenar, a malária humana permanece como um dos principais problemas de saúde pública do mundo com transmissão elevada em muitas regiões do planeta (WHO, 2012). A cada ano, a doença afeta mais de 300 milhões de pessoas e mata aproximadamente 1 milhão, com 90% dos casos registrados no continente africano (WHO, 2013).

No Brasil, muitos progressos foram obtidos na luta contra a doença, nas últimas décadas, no entanto, o número de casos registrados anualmente ainda é elevado. O Brasil é responsável por cerca de 60% dos casos de malária registrados nas Américas, devido a maior parte do bioma amazônico situar-se em seu território. A Amazônia apresenta condições favoráveis ao ciclo de transmissão do patógeno: altas umidades relativas do ar e temperatura elevada (Braga e Fontes, 2005; Oliveira-Ferreira *et al*., 2010). Os registros de casos estão praticamente restritos à Amazônia, onde ocorrem mais de 99% dos casos registrados no território nacional, conforme dados de 2010 e 2011 (Brasil, 2012).

Na região Norte do Brasil, entre janeiro e novembro de 2013, foram notificados 166.864 casos de malária, sendo o estado do Amazonas responsável por 73.996 (44,34%) dos registros na região (Ministério da Saúde, 2014).

Esse volume de notificações para malária ocorre, principalmente, em decorrência da ocupação intensa e desordenada, em áreas urbanas e rurais, que submete as pessoas a um contato mais frequente com o vetor do agente patogênico, e aumenta a possibilidade de contrair o protozoário causador da doença nessas áreas de risco (Tadei *et al*. 1998, 2007).

Em humanos, a malária é uma parasitose causada por cinco diferentes espécies de patógenos do gênero *Plasmodium* Machiafava e Celli, *Plasmodium falciparum* Welch, *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti, *Plasmodium malariae* Feletti e Grassi, e *Plasmodium ovale* Stephens (Ministério da Saúde, 2012). A infecção em humanos por uma quinta espécie de *Plasmodium* foi descrita recentemente – *Plasmodium knowlesi* Sinton e Mulligan (Bronner

et al., 2009). A maioria dos casos de malária grave e de óbitos é causada por *P. falciparum*, porém no Brasil, a elevada morbidade está relacionada ao *P. vivax*, para o qual existem relatos cada vez mais frequentes de infecções graves (Alexandre *et al.*, 2010).

Apesar dos esforços, ainda não existe vacina para combater a malária. Diante dessa realidade, o Ministério da Saúde do Brasil, bem como a Organização Mundial de Saúde, assinalam como medidas para o enfrentamento dessa enfermidade a detecção precoce dos doentes, o tratamento das pessoas infectadas, amplo monitoramento e controle seletivo dos vetores (Ministério da Saúde, 2012; WHO 2012). Essas medidas visam interromper a transmissão do protozoário para humanos.

1.2. Anofelinos

Os mosquitos apresentam papel importante na transmissão de agentes patogênicos e causam impacto sobre o bem estar humano, por meio de suas picadas em busca de alimentação sanguínea (Schmied *et al*., 2008). A maioria dos mosquitos requer sangue de vertebrados para iniciar e completar seu ciclo reprodutivo, forçando-os a entrar em contato frequente com seus hospedeiros, o que os tornam excelentes vetores de agentes etiológicos causadores de doenças (Shiao *et al*., 2008). A hematofagia é praticada apenas pelas fêmeas dos mosquitos, pois o sangue é fundamental para o desenvolvimento dos ovários e maturação dos óvulos (Godfray, 2013).

Os mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles* Meigen estão envolvidos na transmissão de protozoários do gênero *Plasmodium* para o homem. *Anopheles* são insetos da ordem Diptera, familia Culicidae, subfamília Anophelinae. São holometábolos com fase de ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adulto, com as três primeiras fases no ambiente aquático e o adulto terrestre alado (Triplehorn e Johnson, 2011; Rafael *et al*, 2012).

Após os pesquisadores italianos Grassi, Bastianelli e Bignami descreverem, no final do século XIX, o desenvolvimento completo das três espécies de plasmódios humanos em anofelinos, esses mosquitos passaram a ser alvos de intensos estudos sobre sua biologia e ecologia, objetivando implementar medias de controle (Braga e Fontes, 2005).

Atualmente, sabe-se que os anofelinos alimentam-se do sangue de vários animais, desde aves até mamíferos, e alguns vetores são bastante específicos quanto à preferência pela fonte sanguínea (Lyimo e Ferguson, 2009). O grau de antropofilia dos *Anopheles* é fundamental para a manutenção da doença, pois os plasmódios causadores da malária humana tem no mosquito o hospedeiro definitivo (Lyimo *et al*., 2013),

Dentre os 40 gêneros descritos para a família Culicidae, os mosquitos do gênero *Anopheles* são os únicos capazes de transmitir o patógeno da malária para humanos (Harbach, 2004). Os anofelinos adultos tem atividade hematofágica noturna: picam durante toda a noite, mas apresentam picos de atividades nos crepúsculos vespertino e matutino (Tadei *et al*., 1983, 1998).

Os anofelinos são diferenciados dos outros mosquitos por apresentarem palpos tão longos quanto a probóscide em ambos os sexos (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Apesar de ocorrerem em países de clima temperado, a maior parte das espécies são registradas em países de clima tropical e subtropical, e não vivem em altitudes acima de 2000-2500 m (Choumet, 2012).

Atualmente são descritas cerca de 460 espécies do gênero *Anopheles* distribuídas em todo o mundo, inseridas em sete subgêneros – *Nyssorhynchus* Blanchard, *Kerteszia* Theobald, *Stethomyia* Theobald, *Lophopodomyia* Antunes, *Anopheles, Baimaia* Harbach, Rattanarithikul e Harrison e *Cellia* Theobald –, dentre os quais menos de 100 são capazes de transmitir o protozoário causador da malária humana (Choumet, 2012). No Brasil são registradas 54 espécies desse gênero distribuídas em cinco subgêneros (apenas *Baimaia* e *Cellia* não ocorrem em território nacional), e 33 ocorrem na região amazônica (Tadei *et al*., 1998).

Apenas os subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* possuem espécies capazes de transmitir o patógeno no Brasil (Deane, 1986). Em território nacional, os principais anofelinos vetores da malária são *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root, ocorrendo principalmente no interior do país; *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *aquasalis* Curry, com distribuição no litoral brasileiro e em áreas com algum teor de salinidade; *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* l.s. Lynch-Arribalzaga, amplamente distribuído; *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* Dyar e Knab e *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator* Dyar e Knab, com ocorrências na Mata Atlântica (Deane, 1986; Tadei *et al*., 1998; Forattini, 2002; WHO, 2012; Ministério da Saúde, 2012).

No concernente à Amazônia, todos os anofelinos encontrados infectados com plasmódios humanos estão incluídos no subgênero *Nyssorhynchus*. Estudos sobre a biologia e ecologia de anofelinos realizados na Amazônia por Deane *et al.* (1948), Deane (1986 e 1988) e Tadei *et al*. (1983, 1993, 1998), utilizando a técnica de detecção tradicional de plasmódios (dissecação das glândulas salivares e estômago) ratificaram as espécies *A. darlingi*, *A. aquasalis* e *A. albitarsis* como vetores de plasmódios, bem como assinalaram a infecção para *Anopheles oswaldoi* (Peryassu, 1922), *Anopheles nuneztovari* Galaldon, 1940, e *Anopheles triannulatus* (Neiva e Pinto, 1922).

Com o desenvolvimento e melhoramento das técnicas moleculares, tais como os testes de Radioimunoensaio (IRMA), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) e Reação em cadeia da Polimerase (PCR), o número de espécies encontradas infectadas naturalmente com *Plasmdodium* causadores de malária humana mais que dobrou: *Anopheles galvoi* Causey, Deane e Deane, *Anopheles deaneorum* Rosa-Freitas, *Anopheles braziliensis* Chagas, *Anopheles mediopunctatus* Lutz, *Anopheles marajoara* Galvão e Amaral, *Anopheles mattogrossesis* Lutz e Neiva, *Anopheles peryassui* Dyar e Knab e *Anopheles strodei* Root, no entanto, não há registros de surtos de malária provocados por alguma dessas espécies e o *A. darlingi* continua sendo considerado o principal vetor de plasmódios humanos causadores de malária na Amazônia (Tadei *et al*., 1998, Tadei e Dutary-Thatcher, 2000).

A utilização das técnicas moleculares também possibilitou a identificação de complexos de espécies, ou seja, espécies tão semelhantes morfologicamente que só podem ser distinguidas por análises moleculares. Esse é o caso dos complexos *A. triannulatus*, *A. albitarsis*, *A. nuneztovari* e *A. oswaldoi* (Rosa-Freitas *et al*., 1998; Sinka *et al*., 2010; Moreno *et al*., 2013; Ruiz-Lopez *et al*., 2013). O papel das espécies que compõe esses complexos na transmissão de plasmódios humanos ainda precisa ser melhor avaliado para compreender a relação entre o plasmódio e a potencial espécie vetora.

A. darlingi é considerado o principal vetor de malária humana no Brasil. É encontrado nas regiões tropicais e subtropicais nas Américas Central e do Sul, desde o Sul do México até o Norte da Argentina (Sinka *et al*. 2012). No Brasil, esse mosquito é encontrado em todo interior, com exceção das áreas mais secas do Nordeste, do extremo Sul do país e nas altitudes mais elevadas. Apresenta preferência por áreas com grandes rios e próximas de florestas (Deane, 1986).

Esta espécie se alimenta preferencialmente em humanos, apresenta alta suscetibilidade aos protozoários do gênero *Plasmodium*, com alta eficiência na transmissão (Tadei *et al*., 1998). O registro de sua ocorrência está frequentemente associado com a presença da doença, mesmo quando em baixa densidade populacional (Deane, 1986, 1989). É frequente no peridomicílio, mas é bastante encontrado no interior das habitações, onde costuma repousar nas paredes (Tadei *et al*., 2007).

As larvas de *A. darlingi* desenvolvem-se em uma diversidade de criadouros com diferentes características, com preferência por grandes coleções de água (represas, remansos de rios) parcialmente ensolaradas, mas sempre relativamente claras e com pouca matéria

orgânica, colonizando a margem do criadouro junto vegetação (Tadei *et al*., 1983; Martins-Campos *et al*., 2010).

Nos últimos anos tem sido observada uma forte tendência de adaptação de *A. darlingi* a tanques de piscicultura, os quais proporcionam criadouros residuais estáveis durante o período seco e um ambiente durante todo o ano para o desenvolvimento dos imaturos dessa espécie (Tadei e Rodrigues, 2003; Rodrigues *et al*., 2008).

Esse mosquito pode picar tanto fora quanto no interior das habitações ao longo de toda a noite. Vários trabalhos demonstram maior abundância de *A. darlingi* no peridomicílio, no entanto, dentre os anofelinos que adentram às residências, essa espécie é predominante (Tadei *et al.*, 1983, 1998, 2007; Gama, 2009).

A. darlingi apresenta padrão contínuo de atividade durante toda a noite, com pico de atividade bimodal, ou seja, nos crepúsculos vespertinos e matutinos, geralmente este último com menor intensidade (Tadei *et al*., 1988,1993).

A forte associação desse vetor com o homem envolve a localização do hospedeiro, alimentação e repouso, que desencadeiam respostas únicas e permitem ao mosquito encontrar uma espécie de hospedeiro particular por meio de estímulos distintos, tais como respostas olfatórias. físicas e visuais, dentre outras (Gibson e Torr, 1999; Torr *et al*., 2008).

O grande contato desse vetor com os hospedeiros humanos dentro e ao redor das habitações evidencia a necessidade de uma intervenção que seja efetiva contra o *A. darlingi*, para reduzir potenciais riscos aos humanos.

1.3. Influência da temperatura na atração de mosquitos

Os órgãos sensoriais dos insetos são especializados em detectar diversos tipos de estímulos emitidos por seus hospedeiros, que podem ser estímulos térmicos, químicos mecânicos e visuais (Cabrini e Andrade, 2006).

Com o intuito de simular um hospedeiro mais próximo do real, a armadilha proposta para análise nesse estudo, apresenta coloração mais atrativa para anofelinos, mas outros estímulos serão também adicionados, com a intenção de torná-la mais eficiente (Gama, 2009).

A adição de sinais físicos como temperatura e cor às armadilhas existentes promovem a eficiência para atrair mosquitos, considerando que atuam sinergicamente quando combinados a outros componentes atrativos como o odor humano, facilitando a busca de um hospedeiro (Eiras e Jepson, 1994; Okumu *et al*., 2010a). Diferentes temperaturas emanadas do

corpo de um hospedeiro pode determinar, inclusive, a preferência do mosquito por uma fonte de repasto sanguíneo (Mukabana *et al*., 2002).

Segundo Gillies (1980) e Takken (1991), os mosquitos são sensíveis a sinais físicos como calor, que desempenha papel crucial na orientação, aproximação e indução de uma reposta de pouso nas proximidades de hospedeiros vertebrados.

De acordo com Cabrini e Andrade (2006), admite-se que entre 1 e 2 metros o calor e a umidade atuem juntamente com os odores para potencializar a orientação do mosquito ao hospedeiro.

Algumas armadilhas obtêm CO_2 a partir da combustão de propano (C3H8), o que produz calor e vapor de água na armadilha (Kline, 2002; Hoel *et al*., 2009). No entanto, não foram encontrados na literatura avaliação de diferentes temperaturas para atração de *A. darlingi*.

1.4. Utilização sinais químicos para localização de hospedeiro vertebrado

Várias substâncias químicas são incriminadas de desencadearem atividade comportamental em insetos, podendo causar respostas positivas (atrativas) ou negativas (repulsivas) (Eiras e Mafra-Neto, 2001). Quando essas substâncias químicas medeiam a comunicação entre indivíduos de espécies diferentes, chamam-se aleloquímicos. A classe de aleloquímicos que provoca uma resposta benéfica ao receptor, em detrimento ao emissor do odor, chama-se cairomônio (Vilela e Della Lúcia, 2001).

Fêmeas de mosquitos orientam-se principalmente por meio de sinais bioquímicos para encontrar recursos essenciais, tais como hospedeiros adequados para repasto sanguíneo, sítios de oviposição, e parceiros para acasalamento (Takken, 1991; Zwiebel e Takken, 2004; krockel *et al*., 2006; Okumu *et al*., 2010; Verhulst *et al*., 2011), pois essas informações são usadas para orientação e pouso nas vizinhanças imediatas da fonte emissora (Takken e Knols, 1999; Braks *et al*., 2001; Olanga *et al*., 2010).

O hábito hematófago das fêmeas de mosquitos estabeleceu uma forte dependência da presença do hospedeiro para sua reprodução, de modo que esses insetos se especializaram em detectar os cairomônios derivados do ar expirado ou de voláteis emanados da pele dos hospedeiros. Interpretar as informações químicas disponibilizadas por estes de forma eficiente é fundamental para o sucesso reprodutivo desses insetos, visto que as proteínas do sangue do hospedeiro são necessárias para o desenvolvimento dos ovos e para o ciclo reprodutivo (Meijerink *et al*., 2000).

Os voláteis emanados dos hospedeiros são percebidos por contato direto ou por dispersão no ambiente (formando plumas de odor carregadas pelo vento), momento em que entram em contato com receptores olfatórios situados nas sensilas das antenas e palpos dos mosquitos (Meijerink *et al*., 2000). Esses estímulos são captados pelos receptores, transportados para o sistema nervoso central, processados, e traduzidos em respostas comportamentais que o mosquito apresenta diante de um estímulo. Utilizando esses órgãos sensoriais, os mosquitos podem selecionar pessoas mais atrativas através de químicos presentes na respiração, suor e outras emanações da pele, bem como preferir determinadas regiões do corpo de um mesmo hospedeiro (Mukabana *et al*. 2002).

Por meio de métodos eletrofisiológicos foram identificadas diversas substâncias que estimulam o sistema sensorial dos insetos, porém a detecção do composto químico não garante que uma resposta efetiva será desencadeada (Smallegange e Takken, 2010), revelando a necessidade de testes posteriores em condições de laboratório, semicampo e campo. Os dois últimos ambientes tem a vantagem de submeter os estudos realizados a condições naturais de temperatura, umidade, vento, e presença de odores competitivos, onde o papel crucial do estímulo à longa distância não é artificialmente negado, tal como acontece em testes de laboratório (Smallegange e Takken, 2010).

Algumas dessas substâncias ainda podem ser repelentes, e esse efeito pode ser dependente da dosagem liberada (Smallegange e Takken, 2010). Dessa forma, é aceito que nem todos os compostos químicos formariam uma mistura responsável pela atratividade de mosquitos (Zwiebel e Takken, 2004).

Estudos de odor humano já possibilitaram identificar mais de 300 compostos emanados da pele, e que estão relacionados, principalmente, com regiões cuja densidade de glândulas secretoras é elevada (Cabrini e Andrade, 2004). Em relação aos anofelinos, a maior parte dos estudos empregando esses compostos atraentes foram desenvolvidos com *Anopheles gambiae* Giles, 1926, reconhecidamente antropófilo e principal vetor da malária no continente africano (Mukabana *et al*., 2004; Smallegange e Takken, 2010).

Em *A. gambiae*, dezenas de substâncias provenientes do corpo humano, pertencentes há várias classes químicas, já desencadearam respostas comportamentais (Smallegange e Takken, 2010). Dentre os atrativos químicos liberados pela pele e pela respiração humana para os quais essa espécie apresentou respostas comportamentais, os principais são o dióxido de carbono (CO_2), ácido lático, amônia e octenol (Takken e Knols, 1999; Braks *et al*., 2001),

os quais podem apresentar efeitos sinérgicos quando combinados, gerando misturas mais atrativas (Takken *et al*., 1997).

1.4.1. Dióxido de carbono

Conforme observado na revisão realizada por Smallegange e Takken (2010), sobre a resposta comportamental de mosquitos a estímulos químicos, o dióxido de carbono (CO_2), principal constituinte do ar exalado durante a respiração, é produzido em grandes quantidades e atua como atraente para várias espécies de mosquitos, tendo função na ativação e orientação dos insetos hematófagos (Knols, 1996).

O CO_2 apresenta uma atratividade limitada, visto que é um composto generalista para muitas espécies e, assim, apenas revela a presença de um potencial hospedeiro, ou seja, parece apresentar menor importância para mosquitos antropófilos visto que não é um sinal óbvio para a diferenciação entre possíveis hospedeiros (Mboera e Takken, 1997; Braks *et al*. 1999). Por ser produzido por todos os animais, o dióxido de carbono pode não levar um determinado inseto ao seu hospedeiro apropriado (Mohr *et al*., 2011). Portanto, é assumido que outras substâncias importantes na orientação de mosquitos antropófilos emanam da pele humana e atuam junto com o CO_2, as quais seriam responsáveis por respostas seletivas dos mosquitos a odores específicos (Knols, 1996; Verhulst *et al*, 2011; Smallegange *et al*., 2013).

Assim, admite-se que o CO_2 é um estímulo para guiar os mosquitos a longas distâncias, porém a curtas distâncias outros estímulos estariam envolvidos e determinariam a especificidade do inseto para seu hospedeiro, o que é corroborado pelo fato de que microrganismos da pele humana cultivados *in vitro* produzem substâncias atrativas para *A. gambiae*, mesmo na ausência de CO_2 (Verhulst *et al*., 2009).

1.4.2. Ácido lático

O ácido lático é um composto pouco volátil presente na respiração e sobre a pele, e tem sido mencionado como importante atrativo para mosquitos do gênero *Aedes* Meigen, 1818, principalmente quando usado sinergisticamente com outros compostos que emanam da pele humana (Geier *et al*., 1999; Bernier *et al*., 2007). Por estar presente em maiores quantidades na pele humana que em outros animais tem sido estudado com mais frequência, porém respostas comportamentais de anofelinos a esse composto têm sido pouco relatadas, quase sempre revelando que sozinho esse composto é pouco atrativo, ou apresentando

sinergismo quando combinado com ácidos carbocílicos (Braks *et al*., 2001, Meijerink *et al*., 2001; Smallegange *et al*., 2005; Gama *et al*, 2009).

1.4.3. Amônia

Amônia é reconhecida como um atraente para os mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *A. gambiae* (Braks *et al*., 2001), sendo um composto amplamente encontrado em associação com animais, primariamente como um componente da urina, mas também em fezes, suor e outros produtos corporais (Richards *et al*., 1975). A maior parte dos estudos relatam atração de mosquitos para a amônia, porém pode não ser atrativa quando utilizada em altas concentrações (Smallegange *at al*., 2005, Okumu *et al*., 2010b).

1.4.4. Octenol

O Octenol é um composto encontrado no suor humano (Cork e Park, 1996) e em emanações da pele bovina. Foi a primeira substância química para a qual os mosquitos foram atraídos à distância em campo (Kline *et al*., 1990) e sua atração não é espécie especifica. Poucas espécies respondem ao octenol sozinho, mas muitas espécies, incluindo diversos anofelinos, respondem a combinação de Octenol+CO_2 (Takken e Knols, 1999, Laporta e Sallum, 2011, Ritchie *et al*., 2013).

1.5. Suor e micro flora da pele

O odor humano origina-se predominantemente das peculiaridades das glândulas da pele (glândulas sebáceas, apócrinas e écrinas) e da ação da microbiota sobre suas secreções (Braks *et al*., 1999, Braks *et al*., 2001), que definem o grau de atratividade emitido pelo hospedeiro (Takken e Knols, 1999; Smallegange *et al*., 2011).

A microflora da pele converte compostos não voláteis em compostos voláteis com odores humanos característicos, que podem determinar a preferência dos mosquitos tanto por determinadas concentrações específicas quanto por determinadas regiões corporais (Braks *et al*., 1999; Braks *et al*., 2001; Verhulst *et al*., 2011).

Dependendo da densidade e composição bacteriana local, regiões corporais distintas mostram diferenças qualitativas e quantitativas na produção de compostos orgânicos voláteis, o que tem efeito sobre a seleção do local de picadas pelo mosquito (Cabrini e Andrade, 2006, Costello *et al*., 2009; Smallegange *et al*., 2011). Por sua vez, a distribuição desses

microrganismos sobre o corpo ocorre de acordo com as características da pele, em cada região corporal (Costello *et al*., 2009; Smallegange *et al*., 2013).

No suor humano estão, provavelmente, os principais fatores que determinam a preferência de mosquitos antropófilos por algum hospedeiro (Curran *et al*., 2005; Smallegange *et al*., 2011). A variação na composição do suor causa atratividade diferencial para mosquitos, dentro e entre indivíduos, bem como entre humanos e outros animais (Smallegange *et al*., 2011).

Já se suspeitava do suor humano como atraente para mosquitos antropófilos, mas a primeira evidência a favor desse fato foi o trabalho de Braks *et al*. (1997), que demonstraram, por meio de olfatômetro de dupla escolha, a atratividade de amostras de suor fresco para *A. gambiae*. Trabalhos posteriores, no entanto, mostraram resultados conflitantes e relataram que a incubação do suor resultava em uma fonte de voláteis altamente atrativos (Braks e Takken 1999; Braks *et al*., 2001; Smallegange *et al*., 2010).

Os estudos demonstram que a incubação do suor é acompanhada por uma mudança distinta no pH, de ácido para alcalino, o que é observado como o resultado da decomposição microbiana dos componentes da amônia no suor (Braks e takken, 1999, Smallegange *et al*., 2010). Braks *et al*. (2000) observaram que a incubação do suor, depois de removidas as bactérias, não era acompanhada por esta mudança no valor do pH, salientado ainda mais a importância desses micro-organismos no processo de incubação, e mudança de pH do suor, por meio de sua ação sobre os componentes do mesmo.

Odores corporais têm sido usados com sucesso para atrair mosquitos (Qiu *et al*., 2006). A maneira como respondem a tais odores é de grande interesse para o desenvolvimento de dispositivos eficientes para captura de mosquitos (Schmied *et al*., 2008).

Dessa forma, odores que atraem ou repelem mosquitos podem ser a base das novas tecnologias para o futuro combate aos vetores de patógenos (Mabaso *et al*., 2004), visto que esses sinais medeiam importantes interações entre vetores e homem, que estão associados com a transmissão de doenças (Zwiebel e Takken, 2004; Pickett *et al*., 2010, Laporta e Sallum, 2011).

1.6. Medidas de controle e monitoramento de anofelinos

Controlar o vetor ainda é a forma mais eficiente de combater a malária e devem ser executadas ações para atingir as formas imaturas e os alados (Godfray, 2013). Muitos programas de vigilância utilizam a abundância dos estágios imaturos do mosquito para guiar

quando e onde as operações de controle devem ser implementadas, no entanto, embora essas informações possam ser úteis, elas não preveem consistentemente a abundância de mosquitos adultos (Tun-Lin *et al*. 1996). Na Amazônia (onde atualmente ocorrem 99% da malária no Brasil) o controle de imaturos pode não ser viável nos períodos chuvosos, quando o número de criadouros é abundante, inacessíveis ou efêmeros (Walker e Linch, 2007).

Os principais métodos para o controle do mosquito alado são intradomiciliares, tais como pulverização residual de inseticidas e mosquiteiros impregnados com inseticidas (Okumu *et al*., 2010a; WHO, 2013). No entanto, esses métodos podem selecionar resistência fisiológica e características comportamentais nas populações de mosquitos (Pates e Curtis, 2005; Gaton *et al*., 2013), poluírem o ambiente (Walker, 2000), bem como atingir apenas aqueles mosquitos que entram ou tentam entrar nas casas (Okumu *et al*., 2010b).

Um exemplo de alteração comportamental por uso de inseticidas foi observado em *A. darlingi*, que usualmente penetra nas residências e repousa nas paredes após o repasto sanguíneo. Após um longo período borrifando as paredes com DDT, constatou-se que essa espécie adentrava nas casas e já não repousava nas paredes (Tadei, 1987). A partir das décadas de 1960 e 1970 novos inseticidas foram desenvolvidos, que incluem os piretróides sintéticos, contudo essas substâncias também apresentaram impactos sobre a saúde humana e no ambiente (Walker, 2000; Godfray, 2013).

Com a seleção de indivíduos resistentes às substâncias químicas, a efetividade das ações fica cada vez mais limitada (Forattini, 2002; Gama, 2009), o que renovou o interesse pela ecologia e outros aspectos biológicos dos mosquitos, motivando o desenvolvimento de novas abordagens.

Devido às peculiaridades intrínsecas do ambiente amazônico, as medidas tradicionais de combate à malária (borrifação intradomiciliar e tratamento de pessoas doentes) não alcançaram a mesma eficiência obtida em outras regiões com características distintas. Por isso, outras abordagens têm sido buscadas, principalmente porque os recursos para combater a doença são limitados e precisam ser aplicados racionalmente (Tadei *et al.*, 2007).

Vários grupos de pesquisa têm realizado estudos para o desenvolvimento de intervenções eficazes de controle vetorial (controle físico, biológico e químico) e também abordagens inovadoras, como produção de mosquitos estéreis, mosquitos transgênicos e paratransgênicos. No entanto, a maior parte desses estudos está em fase experimental e o método mais utilizado ainda é aquele que se faz por meio de inseticidas. Seja qual for o método de controle a ser adotada, a população de mosquitos na qual ele age precisa ser

monitorada antes e após a intervenção, para assegurar que está exercendo impacto efetivo sobre os vetores alvo (Favia *et al*., 2012).

O monitoramento das populações de mosquitos representa uma etapa fundamental para a identificação de transmissão do patógeno à humanos e, portanto, é um importante componente no controle da doença (Missawa *et al*., 2011; Drago *et al*., 2012). A coleta feita durante todo o ano permite prever o período de maior risco de contrair a doença, bem como possibilita reconhecer a distribuição, riqueza e abundância de espécies em cada localidade e assim antecipar as medidas de controle dos vetores (Silver, 2008; Gama, 2009; Williams *et al*., 2012). Também possibilita identificar a migração ou eliminação de espécies em diferentes regiões, inclusive as exóticas, tal como aconteceu na década de 1930 quando *A. gambiae* foi detectado no Brasil por meio de coletas de imaturos durante atividade de monitoramento rotineira de mosquitos (Killeen *et al*., 2002; Williams *et al*., 2012).

Os dados entomológicos constituem a base para as medidas rotineiras de combate ao vetor, pois os resultados obtidos sobre a diversidade e índice epidemiológico das espécies permitem avaliar a efetividade do controle vetorial, caracterizar o potencial malarígeno de uma região específica, direcionando as decisões sobre as medidas que devem ser adotadas para o controle da doença (Tadei *et al*., 2007).

Portanto, a coleta sistemática de mosquitos é necessária para o combate ao vetor da doença. Apesar disso, os métodos de amostragem de anofelinos adultos, atualmente disponíveis não permitem ou dificultam sua replicação, revelando a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas para a captura dos vetores da malária, especialmente *A. darlingi* (Gama *et al*., 2013).

A amostragem de mosquitos pode ser feita por meio de métodos atraentes e não atraentes. O primeiro utiliza uma resposta positiva do mosquito, e são representados principalmente por armadilhas luminosas, armadilhas com compostos atrativos e a atração humana protegida, sendo este último o método mais eficiente para a coleta das espécies antropófilas disponível, até o momento. O segundo método não interrompe o voo do inseto até o momento de sua captura, por exemplo, a armadilha Malaise ou armadilha pegajosa.

Apesar da grande eficiência da atração humana com proteção, existem desvantagens em utilizá-la. O coletor dever possuir a habilidade necessária para capturar os mosquitos atraídos, trata-se de um procedimento com desconforto e ainda deve ser considerado o fato de que, embora protegido, a exposição aos mosquitos pode levar a infecções por agentes patogênicos transmitidos pelos mesmos (Trape, 2001; Ndiath *et al*., 2011). Por isso,

alternativas tem sido desenvolvidas e consistem, principalmente, em novas armadilhas para a captura dos mosquitos.

1.6.1. Armadilhas para captura de anofelinos adultos

Para contornar os riscos e superar os problemas associados com à atração humana, diversas armadilhas foram desenvolvidas para estimar abundância e diversidade de anofelinos em uma área, bem como para avaliar a eficácia das medidas de controle (Silver, 2008; Matowo *et al*., 2013; Ritchie, 2013).

A atividade de monitoramento visando a avaliação das medidas de controle vetorial deve ser realizada por meio de dispositivos de amostragem apropriados que levem, em consideração, as características ecológicas e comportamentais das espécies alvo (Drago *et al*., 2012). Embora muitas armadilhas tenham sido desenvolvidas para amostragem de mosquitos, nenhuma se mostrou satisfatória para a captura de anofelinos antropófilos e consequente substituição da atração humana. Suas especificidades e sensibilidade variam em relação ao contexto ecológico e a espécie vetor alvo (Drago *et al*., 2012).

As armadilhas luminosas têm sido os principais dispositivos para a captura de mosquitos, dentre os quais as armadilhas CDC e de Shannon são as mais utilizadas (Davis *et al*., 1995). Estas armadilhas possuem atração luminosa, são generalistas e pouco eficientes para coleta de anofelinos antropófilos. Até o momento, não parecem adequadas para substituir a atração em humanos. O uso de luz atrai anofelinos mais zoófilos e não é interessante para o monitoramento das espécies vetores da malária humana, caracterizadas pela antropofilia (Magbity e*t al*., 2002).

Algumas destas armadilhas foram posteriormente modificadas para melhorar suas taxas de captura por meio da adição de atraentes olfativos, sendo que o mais utilizado é o CO_2, proveniente principalmente de gelo seco (Stoops *et al*., 2010). Essas armadilhas para mosquitos iscadas com odor podem ser ferramentas efetivas e, especialmente, quando integradas com outros métodos (Takken e Knols, 1999). No entanto, nos últimos anos, o desenvolvimento e adoção de ferramentas alternativas para o controle e monitoramento dos mosquitos têm sido bastante lentos (Okumu *et al*., 2010b).

Os diversos tipos de armadilhas diferem em suas sensibilidades para a detecção de espécies particulares e, até o momento, as armadilhas desenvolvidas não são práticas para a captura de *A. darlingi* (Williams *et al*., 2012). Assim, buscando um modelo de coleta sensível a anofelinos, a armadilha Biogents Malária, denominada BG-Malária, foi avaliada e, por meio

de alterações na temperatura e da adição de odores corporais, buscou-se ampliar sua taxa de captura, tornando-as mais atrativa.

1.6.2. Armadilha BG-malária

A BG-Malária foi originada a partir da armadilha BG-Sentinel, sendo esta última desenvolvida para capturar principalmente mosquitos do gênero *Aedes* (Krokel *et al*., 2006). Apesar de serem robustas, as BGs podem ser transportadas de forma compacta e seu baixo peso as torna mais adequadas para coleta de mosquitos em campo. Também possui um tubo coletor que pode ser substituído rapidamente, onde os insetos ficam retidos (Schmied *et al*., 2008).

A BG-Malária é cilíndrica e apresenta contraste de cores em sua abertura, visto que sinais visuais auxiliam o mosquito durante o voo, mesmo durante a noite, em condições de baixa luminosidade (Takken e Knols, 1999). Os mosquitos sugados para o interior da armadilha e capturados por um sistema de aspiração que utiliza a recirculação da corrente de ar, conforme figura 1 (Drago *et al*., 2012).

Figura 1. Armadilhas para captura de mosquitos. A) BG-Sentinel. Fonte: trampamosquito.com/ingles/mas-info/BG-sentinel.php. B) BG-Malária. Fonte: L.G.S. Soares. Setas amarelas e vermelhas indicam, respectivamente, a entrada e saída de ar na armadilha.

Originalmente a BG-Malária utiliza CO_2 com uma taxa de liberação de 25,4 g/h como atrativo químico, o qual é proveniente de gelo seco contido em recipientes de isopor (Gama *et al.*, 2013). No presente estudo, em todos os experimentos, nas armadilhas foram instalados dispositivos contendo CO_2, regulado com uma taxa de liberação de 65,7 g/h, obtida por meio de um recipiente confeccionado a partir de garrafa metálica, envolvida por isopor. Esta concentração foi obtida a partir do trabalho de Rodrigues (2013). A armadilha é instalada à aproximadamente 40 cm de acima do solo, com o fluxo de ar voltado para cima e a abertura fica para baixo.

A posição invertida da armadilha, com a abertura voltada para baixo, contribui para a captura dos mosquitos, visto que os mesmos tendem a voa para cima quando se sentem em perigo, e, ao fazerem isso, são capturados com mais facilidade pela armadilha BG-Malária.

A BG-Malária foi comparada a outras armadilhas, apresentando resultados promissores na captura de anofelinos (Gama *et al.*, 2013). Em duas coletas realizadas em Porto Velho (RO), a armadilha capturou 1505 anofelinos contra 1538 capturados pela atração humana, indicando ter potencial para substituir a coleta de anofelinos pela atração humana (Gama *et al.*, 2013).

Os resultados desse estudo foram otimistas, no entanto o número de réplicas comparando a armadilha com a atração humana foi muito baixo - duas noites de coletas-, sugerindo a necessidade de novos estudos com um delineamento mais robusto envolvendo a BG-malária, inclusive testando odores e temperaturas diferentes, visando aperfeiçoar e aumentar a eficiência da armadilha na captura de anofelinos.

Assim, este trabalho foi conduzido no sentido de aperfeiçoar a armadilha BG-Malária, proporcionando alternativa eficiente na captura de *A. darlingi*, com potencial para uso nos programas de vigilância de anofelinos e fornecer dados entomológicos que possam auxiliar no controle e monitoramento do principal vetor de plasmódios humanos na Amazônia e também substituir a atração humana.

2. Justificativa

A malária é a parasitose de maior ocorrência no mundo, levando a óbito milhares de pessoas anualmente, principalmente crianças na África. Apesar de a doença possuir grande importância, ainda não existe uma medida eficiente capaz controlá-la, o que levou à adoção de ações alternativas visando o controle da mesma, que consistem, dentre outras atividades, no monitoramento e controle dos vetores.

No complexo ambiente amazônico, onde ocorrem 99% da malária no Brasil, a estratégia para controlar a doença se dá por meio da combinação de prevenção, detecção oportuna e contenção de epidemias, o que pode ser alcançado pelo monitoramento regular da situação da malária, particularmente de seus determinantes ecológicos, dentre os quais estão os fatores relacionados aos *Anopheles*.

O principal e mais eficiente método para o monitoramento dos anofelinos é atração humana, cuja execução impõe limitações éticas e metodológicas difíceis de serem sanadas. Este fato levou a várias pesquisas para o desenvolverem métodos alternativos de

monitoramento, visando sua substituição, os quais consistem principalmente em armadilhas para coleta de dados entomológicos.

Atualmente um dos maiores desafios para se trabalhar com armadilhas é a grande dependência de CO_2 e as dificuldades financeiras e em logísticas, relacionadas a esse produto. Contudo, o dióxido de carbono ainda é a melhor alternativa para substituir a atração humana, pois permite um nível constante de eficácia, independente do operador. No entanto, o dióxido de carbono é um composto generalista para atração de mosquitos. Os odores humanos, mais específicos, poderiam aumentar a especificidade e eficiência das armadilhas, cujo objetivo principal é capturar vetores de patógenos causadores de doenças em humanos. Portanto, estudos posteriores apontam para o descobrimento de fontes CO_2 mais econômicas, ou a inovação e origem de novos atrativos (físicos, químicos, ou ambos) com efeito similar ao do CO_2.

Visto que os recursos para combater a malária na Amazônia muitas vezes são menores que o adequado, e que nem todos os anofelinos são vetores da malária, entende-se que o combate à doença pode ser mais econômico se a biologia do mosquito for inteiramente entendida, o que pode ser almejado por meio de um método de monitoramento eficiente e padronizado.

Assim, caracterizar a ecologia comportamental dos anofelinos, principalmente de *A. darlingi*, perante atrativos físicos e químicos constituem ferramentas para auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de monitoramento, que fornecerão dados entomológicos para direcionar o controle de vetores de plasmódios humanos, com ênfase em *A. darlingi*.

3. Objetivos

3.1. Geral:

Avaliar o efeito de fatores físicos, químicos e do delineamento experimental em quadrado latino sobre a captura de anofelinos, com ênfase em *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae), utilizando a armadilha BG-Malária.

3.2. Específicos:

- Comparar o efeito da adição de três temperaturas internas distintas sobre a taxa de captura de anofelinos;

- Comparar o desempenho do suor do tronco *versus* suor dos pés, a fresco e incubado, como atraente para anofelinos; e

-Avaliar a influência dos pontos de coleta dos quadrados latinos sobre a taxa de captura de anofelinos.

4. Material e Métodos

4.1. Locais de coleta

O estudo foi realizado em três localidades situadas na área periurbana de Manaus (AM): Sítio Cristo Vive (03°01’48.9’’S, 59°51’01,6’’W), Sítio Barnabé (3° 1'47.57"S, 59°51'14.04"W) e Sítio Raifran (03° 02’ 08.7’’S, 59°52’16.8’’W) (Figura 2). Esses locais são áreas de transmissão de malária e apresentam condições adequadas para o desenvolvimento dos anofelinos: contato com o rio, pelo lago do Puraquequara (especialmente no período das cheias); igarapés; pequenos represamentos, tanques de piscicultura e também fragmentos de matas, situados em suas adjacências. Coletas anteriores de adultos realizadas nestas áreas pelo Laboratório de Malária e Dengue do INPA, demostraram uma alta densidade de anofelinos durante a maior parte do ano, com predomínio de *A. darlingi*.

As residências presentes nessas localidades estavam distantes uma das outras e situadas na borda dos fragmentos florestais, o que aumenta o contato dos moradores com os anofelinos, facilitando a transmissão do plasmódio.

Adicionalmente, nesses locais de coleta sempre mantinham criação de animais domésticos, entre outros, porcos, cachorros, gatos, galinhas, cavalos, cabras ou bois.

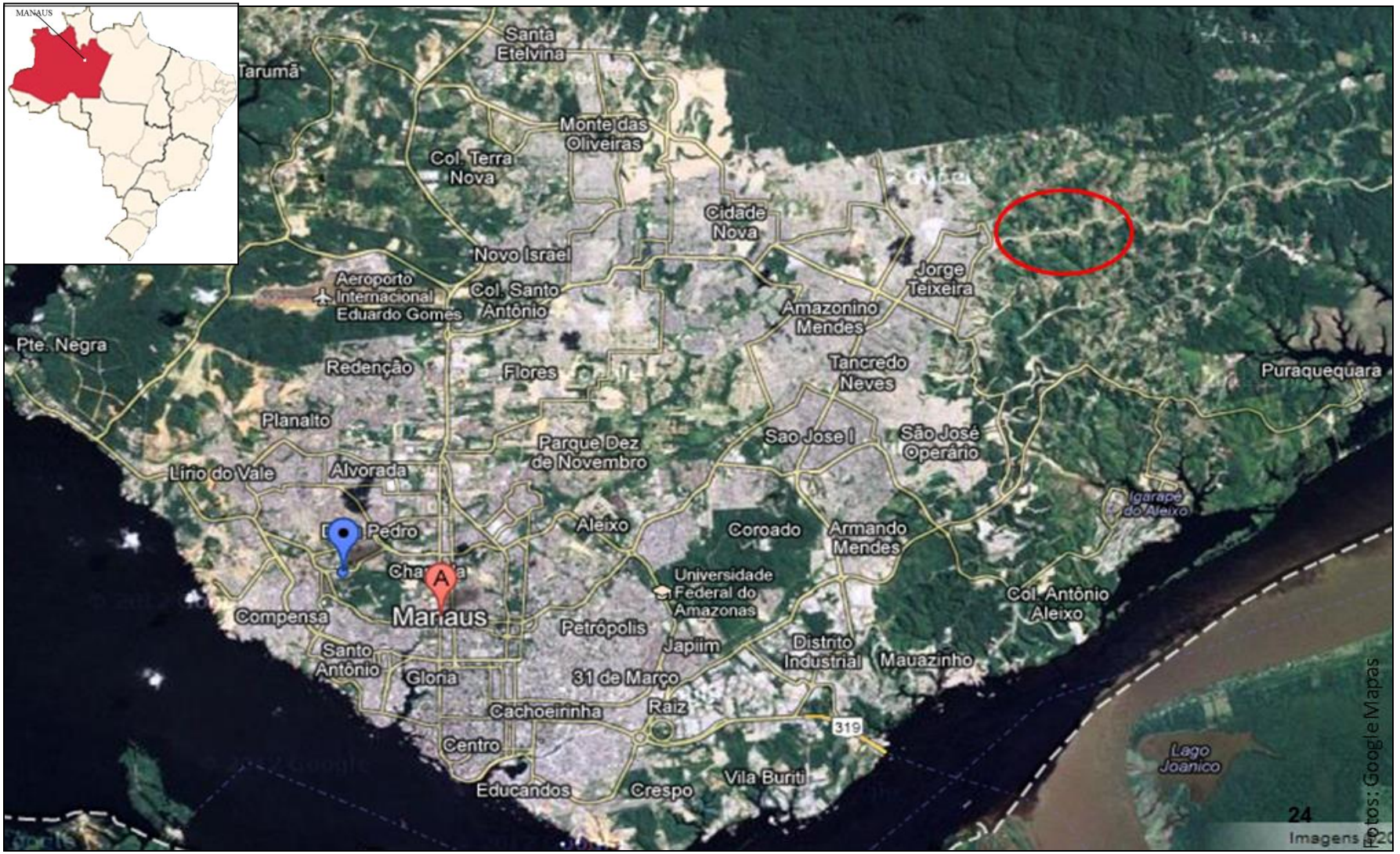

Figura 2. Mapa de Manaus com a localização das áreas de coleta durante os meses de Maio, Junho, Agosto e Setembro de 2013. Em destaque com círculo vermelho, estão situadas as localidades onde foram realizadas as coletas. Fonte: Google Mapas

4.2. Desenho experimental

As armadilhas foram instaladas em campo, no peridomicílio das casas, suspensas a aproximadamente 40 cm do solo (Figura 3), a uma distância mínima de 20 m entre elas, espaçamento superior ao utilizado por outros trabalhos com armadilhas para assegurar que não houvesse interferência entre os tratamentos (Barghini *et al.*, 2004; Gama, 2009). Os experimentos foram realizados nas primeiras três horas da noite, entre 18h00min e 21h00min, quando os anofelinos são geralmente bastante ativos, principalmente no crepúsculo vespertino.

Figura 3. Armadilha BG-Malária instalada em campo para coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus, Amazonas, nos meses de Maio, Junho, Agosto e Setembro de 2013.

Conforme mostra a figura 3, os liberadores de CO_2 foram confeccionados a partir de garrafas metálicas inseridas em recipientes de isopor, com uma mangueira de silicone na extremidade superior, por meio da qual foi conseguida as taxa de liberação desejada. A extremidade da mangueira foi anexada à abertura do copo coletor da armadilha, permitindo que o CO_2 fosse sugado para o interior da armadilha e posteriormente saísse pela tela protetora de sua abertura.

Todos os experimentos de campo seguiram o delineamento do tipo quadrado latino, metodologia que já foi utilizada em outros estudos com culicídeos (Laporta & Sallum, 2011; Drago *et al.*, 2012; Gama *et al*., 2013; Ritchie *et al*., 2013). O número de pontos de coleta foi igual ao número de tratamentos avaliados, sendo que a posição dos tratamentos foi alternada diariamente, de modo que ao final de um quadrado latino todos os tratamentos tivessem passado por cada ponto de coleta selecionado (Figuras 6 e 9). Assim, efeitos de posicionamento na taxa de captura de anofelinos, por cada armadilha, foram minimizados e a coleta ficou mais homogênea.

A disposição dos pontos de coleta em cada área foi realizada tomando como referência a residência presente na propriedade, geralmente representado por uma única casa, habitada por no máximo duas pessoas.

Durante o estudo, as armadilhas BG-Malária foram manuseadas com luvas de látex para evitar contaminação com odores humanos. As superfícies dessas armadilhas foram tratadas antes e após a execução de cada quadrado latino, com auxílio de um lenço de papel umedecido com álcool 70%, água e sabão neutro. O objetivo deste procedimento foi eliminar possíveis influências de odores contaminantes externos.

4.3. Avaliação da temperatura na coleta de anofelinos

Essa etapa do estudo foi realizada nos Sítios Cristo Vive e Barnabé, durante os meses de maio e junho de 2013.

O aquecimento instalado na armadilha foi proveniente de lâmpadas vermelhas (Zoo Med Laboratories Inc.) próprias para geração de calor em criações de anfíbios e répteis. Essas lâmpadas possuíam potências distintas -15V, 40V e 60V, por meio das quais foi possível obter diferentes temperaturas nas armadilhas (Figura 4). A coloração vermelha das lâmpadas foi importante uma vez que os mosquitos não diferenciam esta cor e, portanto, a mesma não interferiu no processo de atração (Barghini *et al.*, 2004). A temperatura no interior da armadilha foi aferida a cada 30 minutos utilizando-se termo-higrômetro com cabo para monitorar o aquecimento interno.

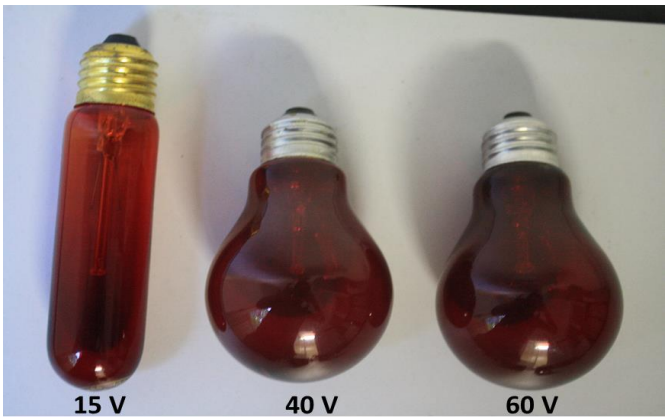

Figura 4. Lâmpadas com diferentes potências para aquecimento das armadilhas durante coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus, Amazonas, nos meses de Maio e Junho de 2014. Fonte: L.B. Leal

As lâmpadas foram instaladas no interior da armadilha, em sua região superior, visando aquecê-la de modo uniforme e constante durante todo o período de realização do experimento (Figuras 5).

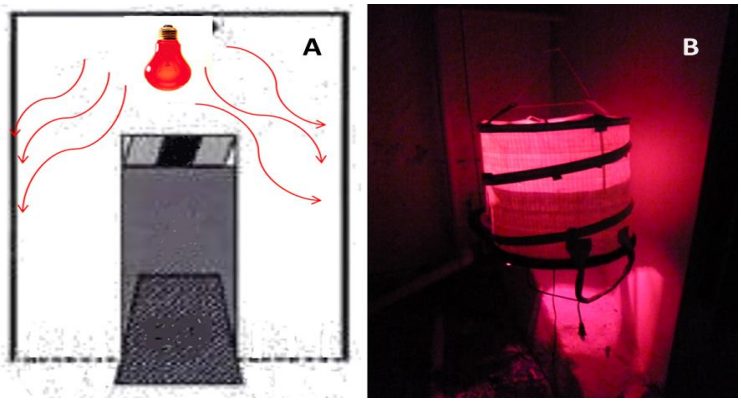

Figura 5. Aquecimento da armadilha BG-Malária utilizada coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus, Amazonas, nos meses de Maio e Junho de 2014. A) Diagrama do sistema de aquecimento. Fonte: adaptado de Krockel *et al*., 2006. B) Armadilha aquecida. Fonte: L.B. Leal.

As lâmpadas para aquecimento foram energizadas por meio de extensões elétricas ligadas a partir da propriedade presente no local da coleta. Assim, a armadilha permaneceu aquecida e manteve uma temperatura constante durante todo o período do experimento, entre às 18h00min e 21h00min.

Assim, com base em todas as descrições acima, os seguintes tratamentos foram avaliados em campo:

(1) Apenas CO_2 (controle – sem lâmpada);

(2) CO_2 + Lâmpada 15 V;

(3) CO_2 + Lâmpada 40 V;

(4) CO_2 + Lâmpada 60 V.

Foram utilizadas quatro armadilhas, em um Quadrado Latino 4x4, o qual foi repetido três vezes (Figura 6), totalizando 12 noites de coleta.

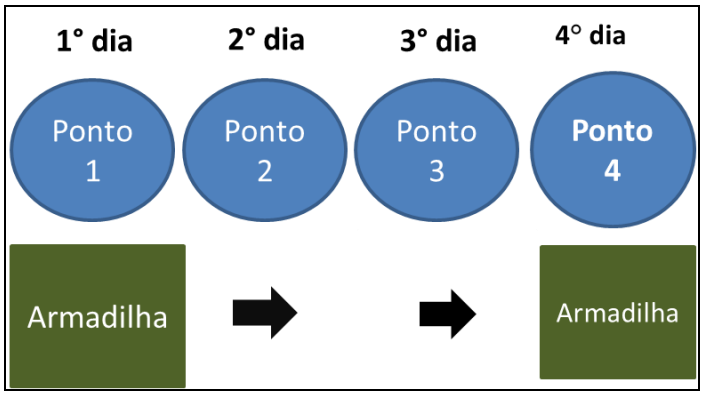

Figura 6. Ilustração representando o percurso que cada armadilha, e seu respectivo tratamento, percorreram até o término do Quadrado Latino 4x4, durante coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus, Amazonas, nos meses de Maio e Junho de 2014

Os quatro pontos do primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Cristo Vive, estavam em condições similares no campo, amostrando um ambiente bastante homogêneo: em área aberta, equidistantes da única residência na propriedade e distantes do criadouro e dos abrigos dos animais.

Em relação ao segundo e terceiro quadrado latino, todos os pontos de amostragem estavam longe dos abrigos dos animais. Os pontos de coleta 1 e 3 estavam mais próximos da residência, enquanto os pontos 2 e 4 estavam mais distantes da casa, em ambiente sombreado, sob árvores. Assim, houve diferença de micro hábitats na localização de cada ponto de coleta, amostrando micro ambientes heterogêneos.

4.4. Avaliação da adição do suor humano na taxa de captura de anofelinos pela BG-Malária

Neste experimento para avaliar o efeito da adição do suor humano na taxa de captura de anofelinos da BG-Malária, o procedimento foi configurado considerando o suor procedente de duas partes distintas do corpo humano - tronco e pés, e com tempos de incubação diferenciados: a fresco e incubado.

No processo para obter o suor, ocorreu a colaboração de 13 voluntários (cinco do sexo masculino e oito do sexo feminino) com idade entre 23 e 45 anos. Em cada dia de coleta no campo, era utilizado o suor de um casal diferente de voluntários, para renovar os estímulos inseridos na armadilha.

Foram utilizados vários voluntários para assegurar que os resultados não seriam influenciados pela variação individual na atratividade que existe entre as pessoas, tais como a microflora, pH e outras diferenças individuais na composição do suor, que podem provocar respostas diferenciadas para mosquitos.

O suor humano foi coletado com meias e camisas brancas de algodão limpas (Figura 7), as quais foram lavadas com sabão neutro e álcool 70% antes de sua utilização, para prevenir qualquer contaminação por outro odor. As meias e camisas eram brancas para assegurar que não tivessem sido tratadas com nenhum tipo de corante, assegurando que as características químicas do suor não seriam alteradas pelas propriedades da roupa. O uso de roupas para absorver o suor humano permitiu excluir outras variações existentes em indivíduos, tais como cor, temperatura e umidade da pele e assim avaliar somente a atratividade de diferentes modalidades de suor.

Figura 7. Roupas brancas para a coleta do suor utilizadas em campo para coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus, Amazonas, nos meses de Agosto e Setembro de 2014. (A) Camisa; (B) Meias.

O suor foi coletado em dois dias consecutivos para cada voluntário. Com o objetivo de padronizar e estimular a produção do suor impregnado nas roupas, cada participante do estudo recebeu meias e camisa limpas, e caminhavam em velocidade moderada, de acordo com o seu condicionamento físico, em uma esteira por um período de 30 minutos, em temperatura ambiente, sempre no período da manhã.

Os voluntários foram orientados a não ingerir bebida alcoólica, não tomar banho com sabão ou sabonete e não usar qualquer tipo de perfume ou desodorante até o momento da coleta do suor, com as roupas. Este experimento foi realizado durante os meses de agosto e setembro de 2013, nos sítios Barnabé e Raifran.

Todos os voluntários receberam uma explanação sobre o desenvolvimento do projeto, sua finalidade, seus potenciais riscos, benefícios e o destino do suor, e posteriormente, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1). O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia sob o número de registro 14138813.0.0000.0006.

No preparo do suor incubado por um dia, as meias e camisa do voluntário logo após a atividade física eram recolhidas e armazenadas dentro de sacos plásticos, em temperatura ambiente (sob a ação dos microrganismos para produção de voláteis atrativos) para serem utilizadas no dia seguinte.

No preparo do suor a fresco, o mesmo voluntário do dia anterior caminhava novamente em esteira, as roupas eram recolhidas, armazenadas em sacos plásticos, para serem utilizadas no mesmo dia juntamente com o suor incubado coletado um dia antes. Assim, as roupas impregnadas com suor fresco e incubado, de um único casal de voluntários, eram usadas a cada noite de coleta.

Desta forma, foi possível compor onze tratamentos diferenciados para serem avaliados em campo, utilizando-se a armadilha BG-Malária, assim distribuídos:

Alternativas	**Conteúdo das armadilhas**
1º	Armadilha apenas com CO_2 e constitui o controle
demais alternativas combinadas com o CO_2	
2º	Meia Limpa
3º	Camisa Limpa
4º	Suor fresco do pé masculino
5º	Suor incubado do pé masculino
6º	Suor fresco do tronco feminino
7º	Suor incubado do tronco feminino
8º	Suor fresco do pé masculino
9º	Suor incubado do pé masculino
10º	Suor fresco do tronco masculino
11º	Suor incubado do tronco masculino

Durante a realização dos testes, as roupas provenientes das diferentes alternativas acima mencionadas, foram inseridas no interior das armadilhas e presas no compartimento que recebe o tubo coletor da BG-Malária, conforme mostram as figuras 8A e 8B. Em A - a camisa é anexada diretamente no tubo coletor, envolvendo-o completamente. Em B – a meia é anexada ao tubo com o auxílio de um compartimento de malha, já anexado ao tubo coletor. Este compartimento de malha originalmente é usado na armadilha BG-Sentinela, para colocar os atrativos sintéticos para atrair *Aedes aegypti*.

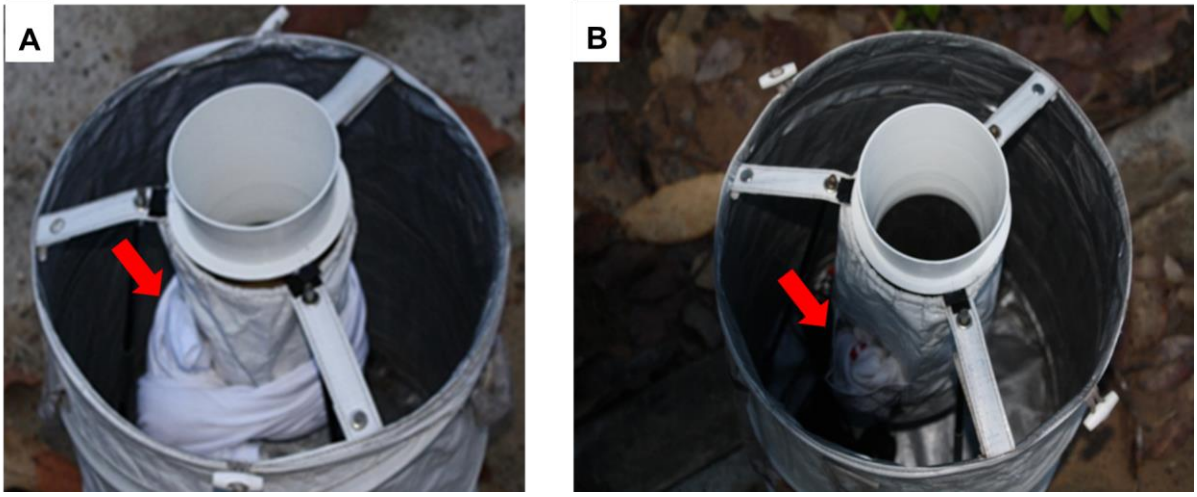

Figura 8. Camisas (A) e meias (B) anexadas no interior das armadilhas para coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus, Amazonas, nos meses de Agosto e Setembro de 2014. Setas vermelhas indicam o compartimento da armadilha no qual as roupas foram presas.

Dessa forma, os onze tratamentos foram submetidos a um quadrado latino 11x11 (Figura 9), totalizando 11 noites de coletas. Como este experimento foi replicado três vezes, foram necessárias 33 noites de coleta para assegurar a amostragem de todas as armadilhas nos 11 pontos de cada quadrado latino. Cada tratamento permaneceu na mesma armadilha do início ao fim do experimento. Este procedimento possibilitou que os resultados obtidos em cada armadilha referem-se exclusivamente sobre aquela modalidade de teste. Não houve risco de contaminação. O número de fêmeas de mosquitos capturadas, por cada tratamento, foi usado para avaliar a atratividade dos onze alternativas.

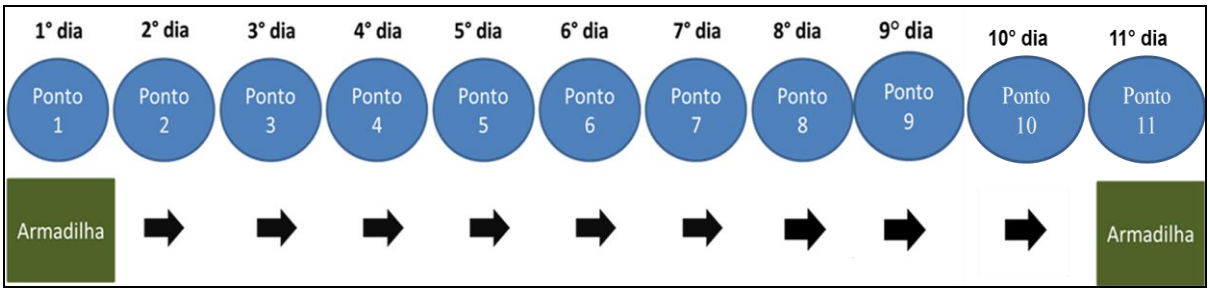

Figura 9. Ilustração representando o trajeto que cada armadilha, e seu respectivo atrativo, percorreram até o término do Quadrado Latino 11x11, em coletas realizadas na área periurbana de Manaus, Amazonas, nos meses de Agosto e Setembro de 2014

No primeiro quadrado latino, os pontos de coleta 1, 2 e 4 estavam mais próximos à residência. Os pontos 3, 5, 6, 7 e 8 situavam-se em áreas arborizadas, à distâncias maiores que os pontos anteriormente citadas. Os pontos 9, 10 e 11 estavam em áreas abertas, e distantes da única casa da propriedade.

No segundo e terceiro quadrados latinos, os pontos de amostragem de mosquitos 1 e 2 estavam distantes da casa e próximos do criadouro. O ponto de coleta 3 estava junto à casa. Os pontos 4, 5, e 6 situavam próximos ao abrigos dos animais. Os pontos 7, 8, 9, 10 e 11 estavam em áreas mais abertas, e distantes do abrigo dos animais e longe da casa presente na propriedade.

Considerando o funcionamento da armadilha, o ar aspirado pelo ventilador entra em contato com a roupa impregnada com o suor e sai pela tela protetora. Desta forma, a armadilha libera ar rico em CO_2 e componentes do suor humano, os quais são testados para atrair anofelinos.

Em seguida aos testes em campo, as armadilhas com os mosquitos capturados foram transportadas para o Laboratório e o material capturado, em cada tubo coletor, foi guardado em freezer para análises posteriores. Neste momento, era avaliado o nível de mortalidade dos mosquitos em cada armadilha, com o intuito de verificar se o procedimento estava causando algum tipo de dano aos mosquitos capturados.

No dia seguinte, já no laboratório de Malária e Dengue (LMD) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), procedia-a contagem e identificação de acordo com as chaves taxonômicas de Forattini (2002) e Consoli e Lourenço de Oliveira (1994).

4.5. Análise dos dados

Com a finalidade de verificar se o número de anofelinos atraídos diferiu entre os 11 tratamentos do experimento com suor humano, ou entre os quatro tratamentos do experimento com temperatura, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA). O presuposto de normalidade dos resíduos foi avaliado utilizando o teste Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) (Sokal & Rohlf 1995) enquanto que a homogeneidade da variância foi avaliada com o teste de Levene (Sokal & Rohlf 1995). Quando houve efeito do tratamento ou do ponto de coleta, o teste "a posteriori" de Tukey foi utilizado para fazer múltiplas comparações e encontrar as diferenças. Todas as análises foram realizadas no Programa de estatística R 2.15.2 (R Development Core Team 2013).

5. Resultados

5.1. Abundância de exemplares da família Culicidae

Ao longo de todo o estudo foram coletados 20.775 mosquitos pertencentes à família Culicidae, representados por oito gêneros e 22 espécies (Tabela 1). Os anofelinos compreenderam 64,12 % (13.320 indivíduos), enquanto Culicinae representou 35,88% (7.455 indivíduos).

A. darlingi foi a espécie predominante durante o estudo, representando 51,79% (10.759 espécimes) da amostra total, seguido por *Aedeomyia squamipennis* (Lynch Arribalzaga) (14,95%), *A. albitarsis* (7,75%) e *Mansonia humeralis* Dyar & Knab (5,76%) (Tabela 1).

Tabela 1. Abundância e porcentagem de culicídeos capturados na armadilha BG-Malária, em experimento com temperatura e suor, realizados durante os meses de Maio, Junho, Agosto e Setembro de 2014, na zona Leste de Manaus, Amazonas.

ESPÉCIES	**EXPERIMENTOS**		**Total geral**
	Suor	**Temperatura**	
Anopheles darlingi	6.328	4431	10.759 (51,79)
Anopheles albitarsis	1.593	18	1.611 (7,75)
Anopheles nuneztovari	167	105	272 (1,31)
Anopheles evansae	164	21	185 (0,89)
Anopheles triannulatus	157	25	182 (0,88)
Anopheles oswaldoi	133	23	156 (0,75)
Anopheles mattogrossensis	82	16	98 (0,47)
Anopheles brasiliensis	53	3	56 (0,27)
Anopheles mediopunctatus	0	1	1 (0,00)
Total *Anopheles*	**8.677**	**4.643**	**13.320 (64,12)**
Culex (*Melanoconion*) spp	508	72	580 (2,79)
Culex coronator	4	5	9 (0,04)
Culex nigripalpus	500	5	505 (2,43)
Culex quinquefasciatus	882	89	971 (4,67)
Total *Culex*	**1.894**	**171**	**2.065 (9,94)**
Mansonia amazonensis	354	220	574 (2,76)
Mansonia humeralis	1.006	190	1.196 (5,76)
Mansonia titillans	305	179	484 (2,33)
Total *Mansonia*	**1.665**	**589**	**2.254 (10,85)**
Psorophora cingulate	10	0	10 (0,05)
Psorophora albipes	0	15	15 (0,07)
Total *Psorophora*	**10**	**15**	**25 (0,12)**
Aedeomyia squamipennis	2.990	115	3.105 (14,95)
Aedes aegypti	2	0	2 (0,01)
Coquillettidia venezuelensis	1	2	3 (0,01)

Trichoprosopon digitatum	1	0	1(0,00)
Total outras espécies	**2.994**	**117**	**3.111 (14,97)**
Total Geral	**15.240 (73,36)**	**5.535 (26,64)**	**20.775 (100)**

( ) = Porcentagem

5.2. Avaliação do efeito da temperatura para coleta de anofelinos

Na tabela 2 estão representadas as temperaturas obtidas durante o período de desenvolvimento das amostragens, em cada uma das quatro armadilhas. O termo-higrômetro não pode ser instalado em dois dias de amostragens, em função de intensas chuvas que impossibilitaram de usá-lo. Desta forma, foram obtidas dez informações sobre temperatura interna das armadilhas, neste experimento de 12 leituras.

Tabela 2. Temperaturas obtidas durante o desenvolvimento das amostragens em cada uma das quatro armadilhas utilizadas

	TRATAMENTOS			
Dia	Sem lâmpada	Lâmpada 15V	Lâmpada 40V	Lâmpada 60V
07/05/2013	25,8 ºC	27,17 ºC	28,8 ºC	31,5 ºC
13/05/2013	**24,4** ºC	**26,04** ºC	28,52 ºC	**30,2** ºC
14/05/2013	**25,84** ºC	**27,77** ºC	29,3 ºC	30,5 ºC
20/05/2013	25,17 ºC	27,51 ºC	29,48 ºC	31,78 ºC
21/05/2013	25,77 ºC	27,34 ºC	**33,7 ºC**	31,64 ºC
23/05/2013	23,82 ºC	25,04 ºC	**28,57** ºC	32,11 ºC
24/05/2013	24,62 ºC	26,24 ºC	28,04 ºC	30,75 ºC
27/052013	24,62 ºC	26,5 ºC	29,32 ºC	30,98 ºC
28/05/2013	24,8 ºC	26,98 ºC	28,77 ºC	**33,3** ºC
03/06/2013	25,14 ºC	26,4 ºC	29,5 ºC	33,1 ºC
Média	24,99 ºC	26,65 ºC	29,14 ºC	31,6 ºC

*Números em negrito: Destacam a maior e a menor temperatura obtida em cada tratamento

Observa-se na tabela 2 que na armadilha sem lâmpada, a média de temperatura foi de 24,99°C, sendo o menor registro de 24,40°C e o maior de 25, 84°C – variação de **1,64°C**; na armadilha com lâmpada de 15 V a média foi de 26,65°C e a temperatura oscilou entre 26,04°C a 27,77°C – variação de **1,53°C**; na armadilha de lâmpada de 40 V a média foi de 29,14°C e a temperatura oscilou entre 28,04°C a 33,70°C – variação de **5,66°C**. Na última lâmpada de 60V, a média foi de 31,60°C e a temperatura oscilou entre 30,20°C a 33,30°C – variação de **3,10°C**. Portanto, considerando as quatro temperaturas, observa-se que a

oscilação foi menor na armadilha com a lâmpada de 15 V - **1,53°C** e a maior foi observada na armadilha com a lâmpada de 40 V - **5,66°C.**

As variações em cada dia de amostragem estão representadas graficamente na figura 10. Observa-se que a temperatura média das armadilhas não sofreram grandes alterações e, como mencionado acima, a menor oscilação foi em torno de um grau e meio para a lâmpada de 15 V e a maior entorno de cinco graus e meio para a lâmpada de 40 V. A lâmpada de 60 V produziu as maiores temperaturas, mas não foi a armadilha que mostrou a maior diferença entre a menor e maior temperatura.

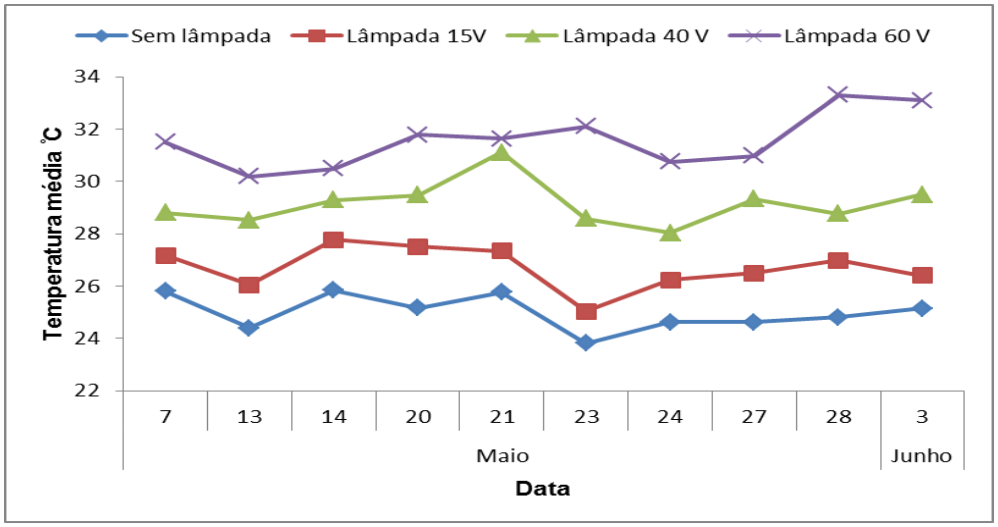

Figura 10. Temperatura média alcançada nas armadilhas contendo lâmpadas aquecedoras e na armadilha sem lâmpada, em coleta de anofelinos na área periurbana de Manaus, Amazonas, nos meses de Maio e Junho de 2014.

Os quatro tratamentos avaliados capturaram juntos, ao longo de 12 noites de coleta, um total de 4.643 indivíduos, distribuídos em nove espécies, dentre as quais *A. darlingi* foi predominante, com 4.431 (95.43%) espécimes. A segunda espécie mais abundante foi *A. nuneztovari*, representada por 105 exemplares, correspondendo a um percentual de 2,26%. As demais espécies foram pouco abundantes, representando menos de 1% cada, e no total correspondem a apenas 2,39% da amostra, correspondendo a 107 indivíduos. *A. mediopunctatus* foi representada por apenas um indivíduo, o qual foi capturado em armadilha contendo a lâmpada de 60V (Tabela 3).

A maior abundância de anofelinos foi coletada com armadilhas utilizando lâmpadas de 40V (1564 espécimes), seguido por armadilhas utilizando lâmpadas de 60V (1.190 espécimes), 15V (1.099 espécimes) e sem lâmpada (790 espécimes) (Tabela 3).

Tabela 3. Abundância de anofelinos capturados nos experimentos com temperatura, realizados na cidade de Manaus, Amazonas.

	T R A T A M E N T O S				
Espécie	Sem Lâmpada	Lâmpada de 15V	Lâmpada de 40V	Lâmpada de 60V	Total
A. darlingi	726	1.060	1.496	1.149	4.431(95,43)
A. nuneztovari	35	17	28	25	105 (2,26)
A. triannulatus	3	0	22	0	25 (0,54)
A. oswaldoi	4	9	5	5	23 (0,50)
A. evansae	11	3	4	3	21 (0,45)
A. albitarsis	7	6	3	2	18 (0,39)
A. mattogrossensis	3	3	5	5	16 (0,34)
A. braziliensis	1	1	1	0	3 (0,06)
A. mediopunctatus	0	0	0	1	1 (0,02)
Total	790	1.099	1.564	1.190	4.643 (100)
	(17,01)	(23,67)	(33,69)	(25,63)	

( ) = Porcentagem

Na tabela 4 estão representados os dados obtidos considerando todos os anofelinos capturados no Sítio Cristo Vive, resultado obtido no primeiro quadrado latino realizado nesta localidade. Observa-se que o maior número de mosquitos coletados nas armadilhas foi com a lâmpada de 40V. A comparação das diferentes abundâncias observadas nas capturas mostrou que os resultados não diferem estatisticamente entre os tratamentos (ANOVA: F=0,84; p= 0,50) (Tabela 4, Figura 11). Também não houve diferença estatística entre os pontos de amostragem (ANOVA: F=1.30; p = 0.32) (Tabela 5; Figura 12).

Tabela 4. Total de anofelinos capturados em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS				Total
	Sem lâmpada	Lâmpada de 15V	Lâmpada de 40V	Lâmpada de 60V	
07/05/2013	202	4	520	248	974
09/05/2013	30	171	82	117	400
13/05/2013	106	107	160	48	421
14/05/2013	40	300	168	71	579
Total	378	582	930	484	2.374

Tabela 5. Total de anofelinos capturados em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus, Amazonas.

Data	PONTOS DE COLETA				Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	
07/05/2013	202	4	520	248	974
09/05/2013	117	30	171	82	400
13/05/2013	160	48	106	107	421
14/05/2013	300	168	71	40	579
Total	779	250	868	477	2.374

Considerando ainda os resultados obtidos no primeiro quadrado latino, mas levando-se em conta apenas *A. darlingi*, os testes estatísticos também mostram que não houve diferença entre os tratamentos (ANOVA: F= 0.71; p=0.57) (Tabela 6; Figura 11), nem entre os pontos de amostragem (ANOVA: F=1.53; p=0.26) (Tabela 7; Figura 12).

Tabela 6. Total de *Anopheles darlingi* capturados com a armadilha BG-Malária, em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS				Total
	Sem lâmpada	Lâmpada de 15V	Lâmpada de 40V	Lâmpada de 60V	
07/05/2013	202	0	518	246	966
09/05/2013	25	164	81	116	386
13/05/2013	100	97	157	39	393
14/05/2013	39	295	126	69	529
Total	366	556	882	470	2.274

Tabela 7. Total de *Anopheles darlingi* capturados com a armadilha BG-Malária, em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus, Amazonas.

Data	PONTOS DE COLETA				Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	
07/05/2013	202	0	518	246	966
09/05/2013	116	25	164	81	386
13/05/2013	157	39	100	97	393
14/05/2013	295	126	69	39	529
Total	770	190	851	463	2.274

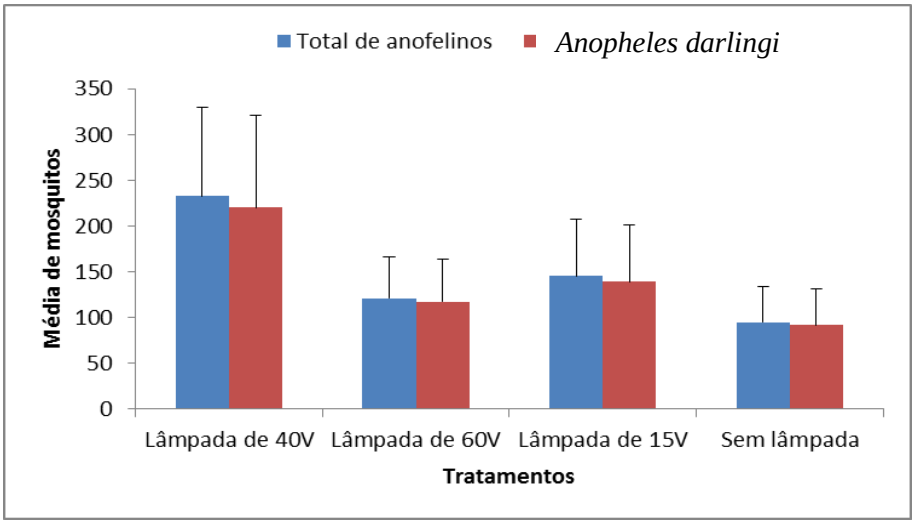

Figura 11. Média e erro padrão do número de anofelinos, e de *Anopheles darlingi*, capturados com a armadilha BG-Malária, nas quatro temperaturas avaliadas no primeiro quadrado latino durante o mês de Maio de 2014, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus, Amazonas.

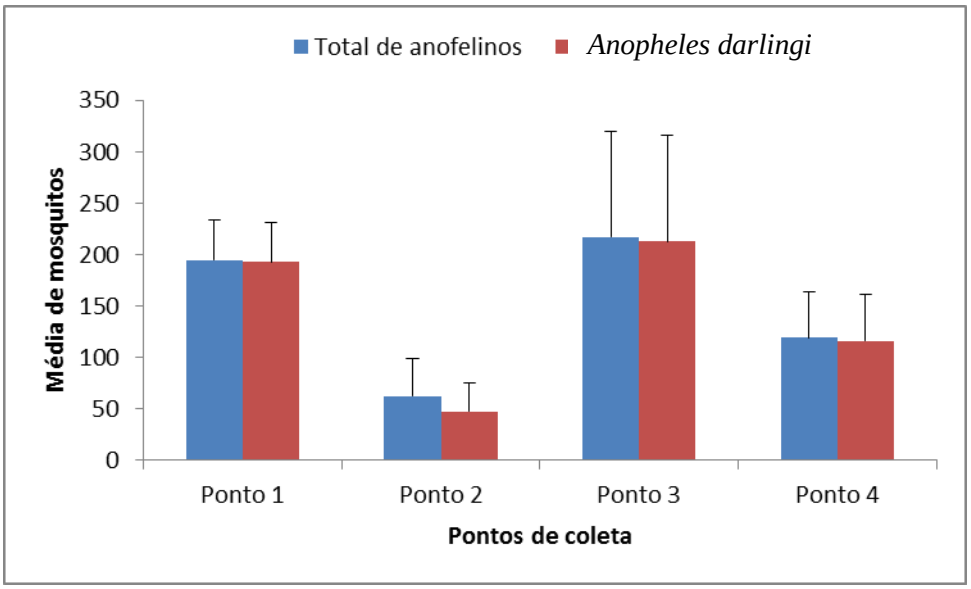

Figura 12. Média e erro padrão do número de anofelinos, e de *Anopheles darlingi*, capturados utilizando a armadilha BG-Malária, nos quatro pontos de coleta do primeiro quadrado latino, durante o mês de Maio de 2014, realizado no Sítio Cristo Vive, Manaus, Amazonas.

No segundo quadrado latino do experimento realizado no Sítio Barnabé, a média de todos os anofelinos foi também maior em armadilhas com lâmpadas de 40V. Neste caso novamente não houve diferenças estatísticas entre as diversas temperaturas (ANOVA: $F=0.48$; $p=0.70$) (Tabela 8; Figura 13). No entanto, quando se considera os pontos de coleta verifica-se que houve diferença significativa entre pontos (ANOVA: $F= 9.06$; $p<0.05$), destacando-se os pontos 1 e 3, com um número de mosquitos significativamente maior que os demais (Tabela 9; Figura 14).

Tabela 8. Total de anofelinos capturados em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o segundo quadrado latino, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS				Total
	Sem lâmpada	Lâmpada de 15V	Lâmpada de 40V	Lâmpada de 60V	
20/05/2013	22	60	49	60	191
21/05/2013	58	26	47	32	163
22/05/2013	20	47	41	73	181
23/05/2013	74	25	100	13	212
Total	174	158	237	178	747

Tabela 9. Total de anofelinos capturados em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o segundo quadrado latino, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	PONTOS DE COLETA				Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	
20/05/2013	60	49	60	22	191
21/05/2013	58	26	47	32	163
22/05/2013	73	20	47	41	181
23/05/2013	100	13	74	25	212
Total	291	108	228	120	747

Quando se considera os dados apenas do *A. darlingi*, capturados também no segundo quadrado latino, observa-se que não há diferenças estatísticas entre as diversas temperaturas (ANOVA: $F=0.44$; $p= 0.73$) (Tabela 10; Figura 13). No entanto, existiu diferenças entre os pontos de amostragem (ANOVA: $F=10.95$; $p< 0.05$), com destaque também para os pontos 1 e 3 (Tabela 11; Figura 14).

Tabela 10. Total de *Anopheles darlingi* capturados utilizando a armadilha BG-Malária, em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o segundo quadrado latino, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS				Total
	Sem lâmpada	Lâmpada de 15V	Lâmpada de 40V	Lâmpada de 60V	
20/05/2013	22	60	45	60	187
21/05/2013	56	22	47	24	149
22/05/2013	17	47	41	73	178
23/05/2013	72	25	96	13	206
Total	167	154	229	170	720

Tabela 11. Total de *Anopheles darlingi* capturados utilizando a armadilha BG-Malária, em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o segundo quadrado latino, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	PONTOS DE COLETA				Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	
20/05/2013	60	45	60	22	187
21/05/2013	56	22	47	24	149
22/05/2013	73	17	47	41	178
23/05/2013	96	13	72	25	206
Total	285	97	226	112	720

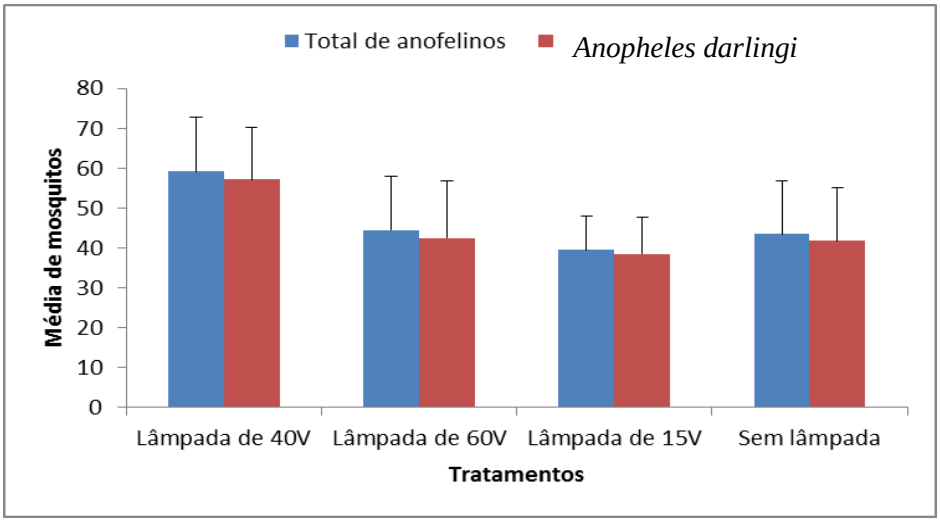

Figura 13. Média e erro padrão do número de anofelinos, e de *Anopeheles darlingi*, capturados utilizando a armadilha BG-Malária, com quatro temperaturas avaliadas no segundo quadrado latino, durante o mês de Maio de 2014, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

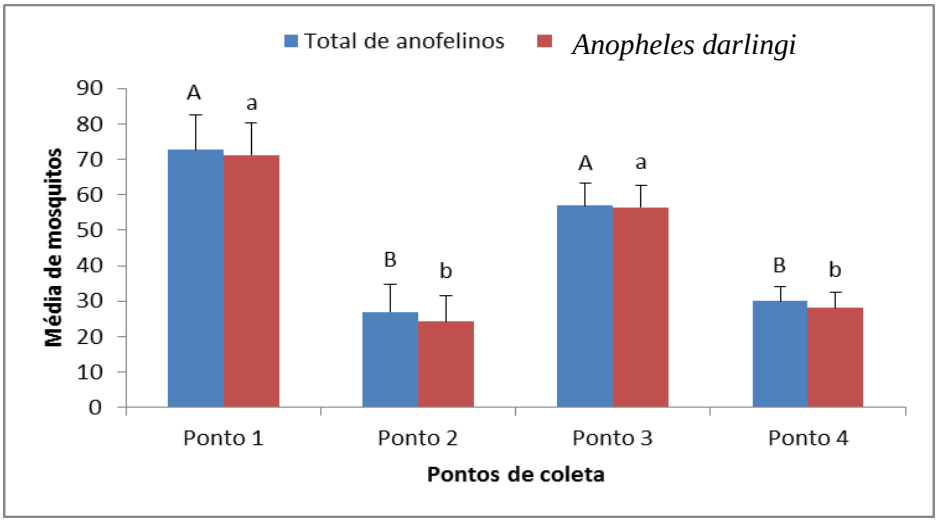

Figura 14. Média e erro padrão do número de anofelinos, e de *Anopheles darlingi*, capturados com a armadilha BG-Malária, nos quatro pontos de coleta do segundo quadrado latino, durante o mês de Maio de 2014, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas. Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey). Letras maiúsculas indicam diferenças na abundância de anofelinos em geral, enquanto letras minúsculas indicam diferença na abundância de *Anopheles darlingi*.

No terceiro quadrado latino, também realizado no Sítio Barnabé, a captura do total de anofelinos não diferiu estatisticamente entre as diversas temperaturas, apesar de ser maior nas armadilhas com lâmpadas de 60V (ANOVA: F=0.27; p=0.84) (Tabela 12; Figura 15). A média de anofelinos capturados também não diferiu significativamente entre os pontos de amostragem (ANOVA: F=1.33; p=0.31) (Tabela 13; Figura 16).

Tabela 12. Total de anofelinos capturados em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS				Total
	Sem lâmpada	Lâmpada de 15V	Lâmpada de 40V	Lâmpada de 60V	
24/05/2013	3	12	4	20	39
27/05/2013	48	35	182	48	313
28/05/2013	51	246	87	399	783
03/06/2013	136	66	124	61	387
Total	238	359	397	528	1.522

Tabela 13. Total de anofelinos capturados em cada ponto de amostragem nos experimentos com temperatura, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	PONTOS DE COLETA				Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	
24/05/2013	20	3	12	4	39
27/05/2013	182	48	48	35	313
28/05/2013	246	87	399	51	783
03/06/2013	136	66	124	61	387
Total	584	204	583	151	1.522

Considerando ainda estes dados obtidos no terceiro quadrado latino, mas levando-se em conta apenas os referentes a *A. darlingi*, verifica-se que não houve diferenças entre os tratamentos (ANOVA: F=0.34; p= 0.80) (Tabela 14; Figura 15) e também entre os diferentes pontos de amostragem (ANOVA: F=1.22; p= 0.34) (Tabela 15; Figura 16).

Tabela 14. Total de *Anopheles darlingi* capturados utilizando a armadilha BG-Malária, em cada tratamento avaliado nos experimentos com temperatura, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS				Total
	Sem lâmpada	Lâmpada de 15V	Lâmpada de 40V	Lâmpada de 60V	

24/05/2013	3	12	3	19	37
27/05/2013	45	35	179	45	304
28/05/2013	51	242	84	396	773
03/06/2013	94	61	119	49	323
Total	193	350	385	509	1.437

Tabela 15. Total de *Anopheles darlingi* capturados em cada ponto de amostragem utilizando a armadilha BG-Malária, nos experimentos com temperatura, durante o terceiro quadrado latino, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	PONTOS DE COLETA				Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	
24/05/2013	19	3	12	3	37
27/05/2013	179	45	45	35	304
28/05/2013	242	84	396	51	773
03/06/2013	94	61	119	49	323
Total	534	193	572	138	1.437

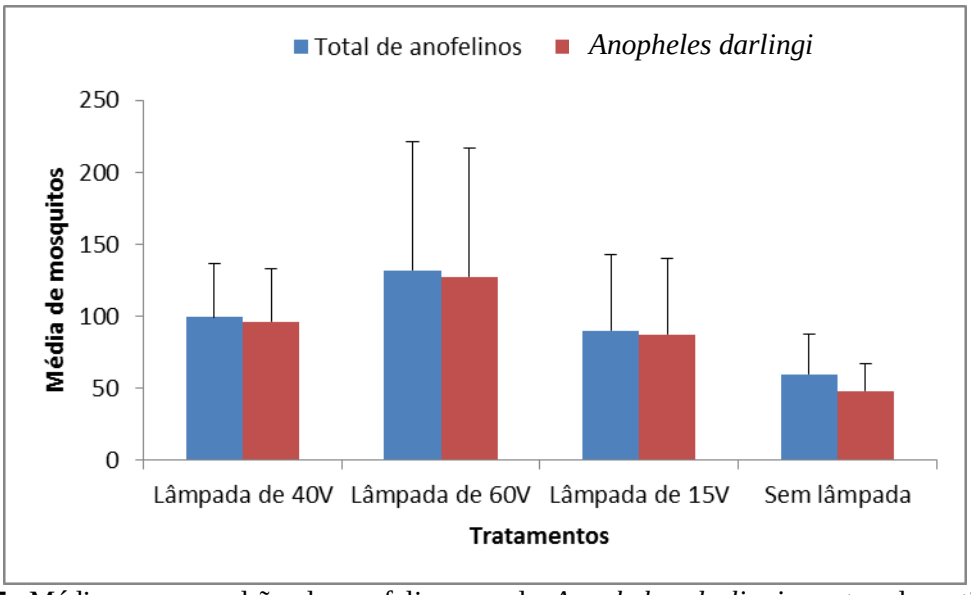

Figura 15. Média e erro padrão de anofelinos, e de *Anopheles darlingi*, capturados utilizando a armadilha BG-Malária, com quatro temperaturas avaliadas no terceiro quadrado latino, durante os meses de Maio e Junho de 2014, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

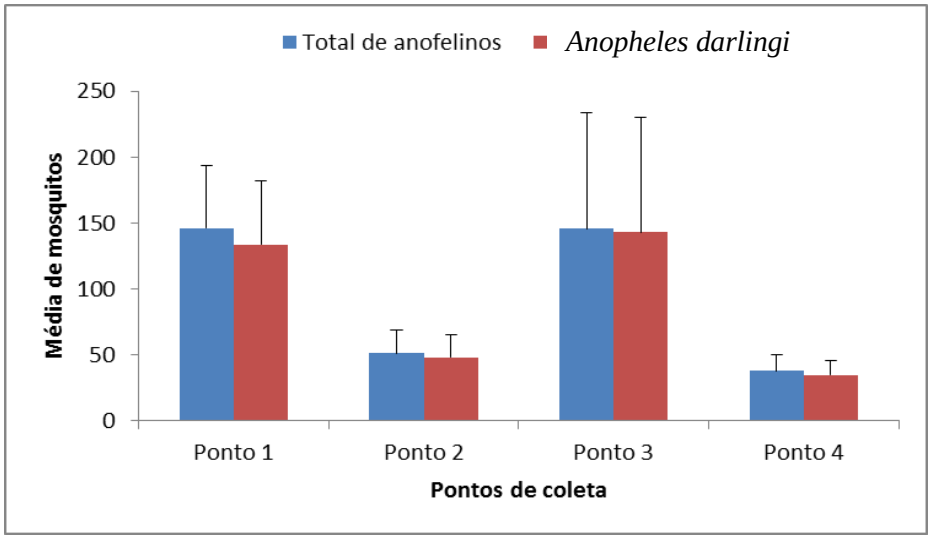

Figura 16. Média e erro padrão de anofelinos, e de *Anopheles darlingi*, capturados com a armadilha BG-Malária, nos quatro pontos de coleta do terceiro quadrado latino, durante os experimentos avaliando diferentes temperaturas, realizados nos meses de Maio e Junho de 2014, no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas

5.3. Efeito da adição do suor humano na taxa de captura de anofelinos pela BG-Malária

Conforme mostram os dados da tabela 16, neste experimento foi capturado um total de 8.677 anofelinos, representados por oito espécies distribuídas em todos os tratamentos, dentre as quais *A. darlingi* foi a mais abundante, sendo representado por 6.328 (72,9%) espécimes (Tabela 16). A segunda espécie mais abundante foi *A. albitarsis*, representada por 1.593 (18,3%) espécimes. A terceira mais abundante foi *A. nuneztovari* registrada com 167 espécimes, representando 1,92% dos exemplares. As demais espécies registradas ocorreram com percentuais abaixo destes valores.

Apesar de não existirem diferenças na diversidade de anofelinos, capturados por cada tratamento, a abundância variou de acordo com cada tipo de atrativo utilizado (Tabela 16).

Dentre os 11 tratamentos avaliados, o maior número de anofelinos foi atraído e capturado pelas armadilhas contendo suor incubado do tronco feminino e masculino, respectivamente. Por outro lado, o suor fresco do pé masculino e o suor incubado do pé feminino foram os que menos atraíram mosquitos, capturando menos que os tratamentos controles que não utilizavam odor humano (Tabela 16).

Tabela 16. Abundância e porcentagem de mosquitos do gênero *Anopheles* capturados utilizando a armadilha BG-Malária, em experimentos avaliando suor humano, realizado durante os meses de Julho, Agosto e setembro de 2014, na zona Leste de Manaus, Amazonas.

Espécies	TRATAMENTOS											Total
	Suor incubado do tronco feminino	Suor incubado do tronco masculino	Camisa Limpa	Suor fresco do tronco feminino	Suor incubado do pé masculino	Meia Limpa	Suor fresco do tronco masculino	Suor fresco do pé feminino	CO_2	Suor fresco do pé masculino	Suor incubado do pé feminino	
Anopheles darlingi	806	710	662	633	553	558	551	480	487	440	448	6.328 (72,92)
Anopheles albitarsis	180	173	173	145	163	133	155	125	124	131	91	1.593 (18,35)
Anopheles nuneztovari	3	33	13	22	18	19	14	16	8	10	11	167 (1,92)
Anopheles evansae	13	30	16	20	11	21	11	9	19	5	9	164 (1,89)
Anopheles triannulatus	16	21	7	20	14	9	19	15	11	10	15	157 (1,80)
Anopheles oswaldoi	10	22	19	12	8	15	8	21	10	5	3	133 (1,53)
Anopheles mattogrossensis	8	14	8	7	7	4	7	9	5	4	9	82 (0,94)
Anopheles brasiliensis	5	7	11	1	1	9	3	3	6	4	3	53 (0,61)
Total	1.041 (11,99)	1.010 (11,63)	909 (10,47)	860 (9,91)	775 (8,93)	768 (8,85)	768 (8,85)	678 (7,81)	670 (7,7)	609 (7,01)	589 (6,78)	8.677 (100)

( ) = Porcentagem

Levando-se em conta todos os anofelinos, capturados no primeiro quadrado latino realizado no Sítio Barnabé, as análise estatística dos dados obtidos mostraram que os tratamentos não diferem estatisticamente (ANOVA: $F=1.17$; $p= 0.32$). Porém, o número de mosquitos capturados foi maior no tratamento com suor incubado do tronco masculino (Tabela 17; Figura 17). Quando se considera os pontos de coleta, verifica-se que a amostragem diferiu significativamente (ANOVA: $F=3.83$; $p<0.05$), indicando que o ponto quatro atrai significativamente mais mosquitos que os demais pontos de coleta (Tabela 18; Figura 18).

No concernente somente à abundância de *A. darlingi*, o número de exemplares capturados no primeiro quadrado latino não apresentou diferença estatística quanto ao número de indivíduos capturados pelos tratamentos (ANOVA: $F=1.056$; $p=0.403$), ainda que o suor incubado do tronco masculino tenha atraído mais mosquitos (Tabela 19; Figura 17). No que diz respeito aos pontos de coleta, foi observada diferença significativa entre o ponto de coleta quatro e os demais (Tabela 20; Figura 18).

Tabela 17. Total de anofelinos capturados utilizando a armadilha BG-malária, em cada tratamento avaliado no experimento com suor, durante o primeiro quadrado latino, realizado durante os meses de Julho e Agosto, no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS											Total
	Suor incubado do tronco masculino	Suor fresco do tronco feminino	Meia Limpa	Suor fresco do pé masculino	Camisa Limpa	Suor incubado do tronco feminino	Suor fresco do tronco masculino	Suor fresco do pé feminino	CO_2	Suor incubado do pé masculino	Suor incubado do pé feminino	
18/07/2013	3	8	1	27	4	21	10	9	10	3	0	96
19/07/2013	5	10	35	0	4	1	5	1	3	5	1	70
22/07/2013	13	14	2	0	0	2	4	1	1	3	3	43
23/07/2013	12	5	2	2	4	3	1	6	0	2	4	41
24/07/2013	21	10	2	2	19	0	11	8	13	4	3	93
25/07/2013	10	11	11	20	16	11	9	18	16	21	3	146
26/07/2013	37	0	15	7	6	11	11	5	11	6	27	136
29/07/2013	15	6	11	0	15	16	7	7	2	3	2	84
30/07/2013	2	20	7	16	5	3	1	3	2	5	0	64
31/07/2013	3	4	4	1	2	1	1	8	12	1	1	38
05/08/2013	25	10	2	7	6	8	10	4	0	2	2	76
Total	146	98	92	82	81	77	70	70	70	55	46	887

Tabela 18. Total de anofelinos capturados utilizando a armadilha BG-Malária, em cada ponto de amostragem no experimento com suor, durante o primeiro quadrado latino, durante os meses de Julho e Agosto de 2013, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	PONTOS DE COLETA											Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Ponto 9	Ponto 10	Ponto 11	
18/07/2013	9	8	1	10	3	10	27	21	0	3	4	96
19/07/2013	4	1	10	35	5	5	3	0	1	1	5	70
22/07/2013	3	0	1	14	2	4	13	1	0	2	3	43
23/07/2013	4	2	4	6	5	2	1	12	0	2	3	41
24/07/2013	0	3	4	19	8	10	2	11	21	13	2	93
25/07/2013	20	11	3	21	16	18	11	11	9	10	16	146
26/07/2013	11	7	11	27	6	6	5	0	15	11	37	136
29/07/2013	15	2	0	16	2	3	15	7	6	11	7	84
30/07/2013	1	2	2	16	3	0	5	5	23	0	7	64
31/07/2013	4	1	3	12	1	1	1	1	2	8	4	38
05/08/2013	10	2	10	25	0	7	8	2	2	6	4	76
Total	81	39	49	201	51	66	91	71	79	67	92	887

Tabela 19. Total de *Anopeheles darlingi* capturados com a armadilha BG-Malária, em cada tratamento avaliado no experimento com suor, durante o primeiro quadrado latino, durante os meses de Julho e Agosto, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS											Total
	Suor incubado do tronco masculino	Suor fresco do tronco feminino	Suor incubado do tronco feminino	Camisa Limpa	Suor fresco do pé masculino	Meia Limpa	Suor fresco do tronco masculino	Suor fresco do pé feminino	Suor incubado do pé masculino	CO_2	Suor incubado do pé feminino	
18/07/2013	2	7	20	1	19	1	9	7	3	5	0	74
19/07/2013	5	10	0	3	0	34	3	0	1	1	0	57
22/07/2013	12	12	0	0	0	2	4	1	1	1	1	34
23/07/2013	9	4	2	1	0	1	1	6	1	0	4	29
24/07/2013	2	9	0	17	0	2	2	5	0	0	1	38
25/07/2013	3	10	9	15	19	9	7	12	21	6	2	113
26/07/2013	11	0	11	5	1	3	1	2	5	7	23	69
29/07/2013	10	4	15	13	0	1	6	4	3	2	2	60
30/07/2013	0	4	2	2	16	0	0	0	0	2	0	26
31/07/2013	2	1	1	2	1	4	1	4	1	12	1	30
05/08/2013	23	10	7	3	5	2	10	2	0	0	1	63
Total	79	71	67	62	61	59	44	43	36	36	35	593

Tabela 20. Total de *Anopheles darlingi* capturados com a armadilha BG-Malária, em cada ponto de amostragem no experimento com suor humano, durante o primeiro quadrado latino, realizado nos meses de Julho e Agosto, no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

	PONTOS DE COLETA											
Data	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Ponto 9	Ponto 10	Ponto 11	Total
18/07/2013	7	7	1	9	2	5	19	20	0	3	1	74
19/07/2013	3	0	10	34	3	5	1	0	0	0	1	57
22/07/2013	1	0	1	12	2	4	12	1	0	0	1	34
23/07/2013	4	1	1	6	4	1	1	9	0	0	2	29
24/07/2013	0	1	0	17	5	9	2	2	2	0	0	38
25/07/2013	19	9	2	21	15	12	10	9	7	3	6	113
26/07/2013	7	1	11	23	5	5	2	0	3	1	11	69
29/07/2013	10	2	0	15	2	3	13	4	4	1	6	60
30/07/2013	0	0	2	16	2	0	0	2	4	0	0	26
31/07/2013	4	1	2	12	1	1	1	1	2	4	1	30
05/08/2013	10	2	10	23	0	5	7	1	0	3	2	63
Total	65	24	40	188	41	50	68	49	22	15	31	593

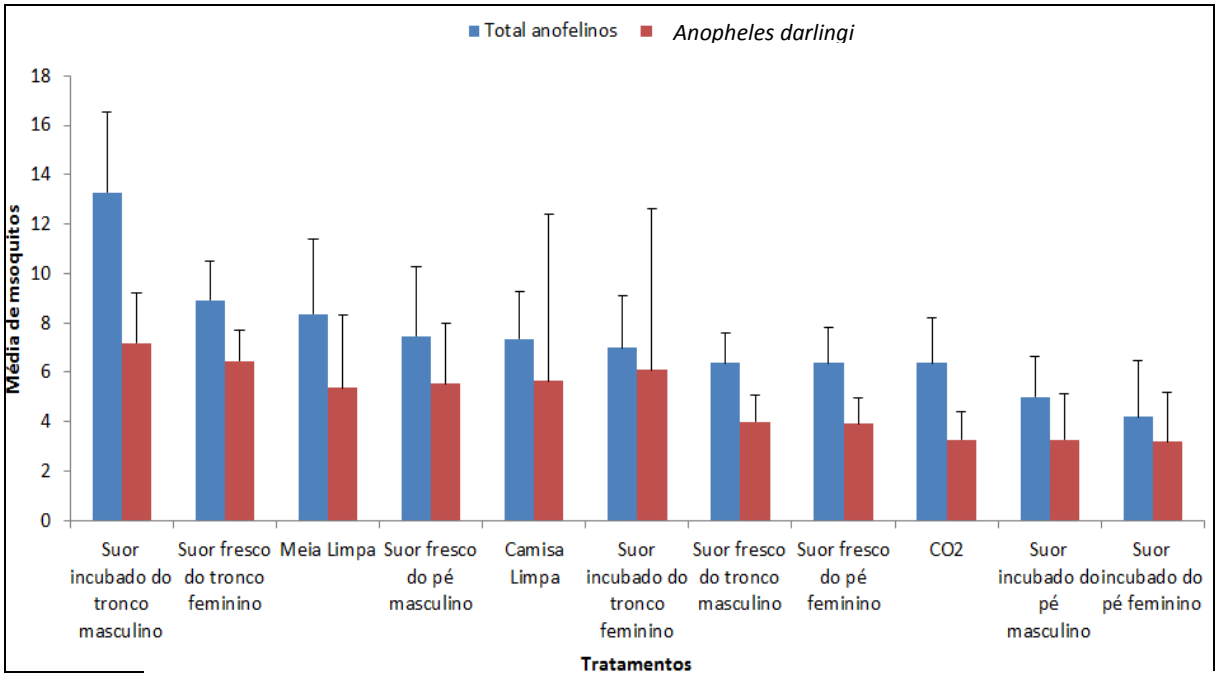

Figura 17. Média e erro padrão de anofelinos, e de *Anobpheles darlingi*, capturados com a armadilha BG-Malária, nos 11 tratamentos avaliados no primeiro quadrado latino, realizado no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas.

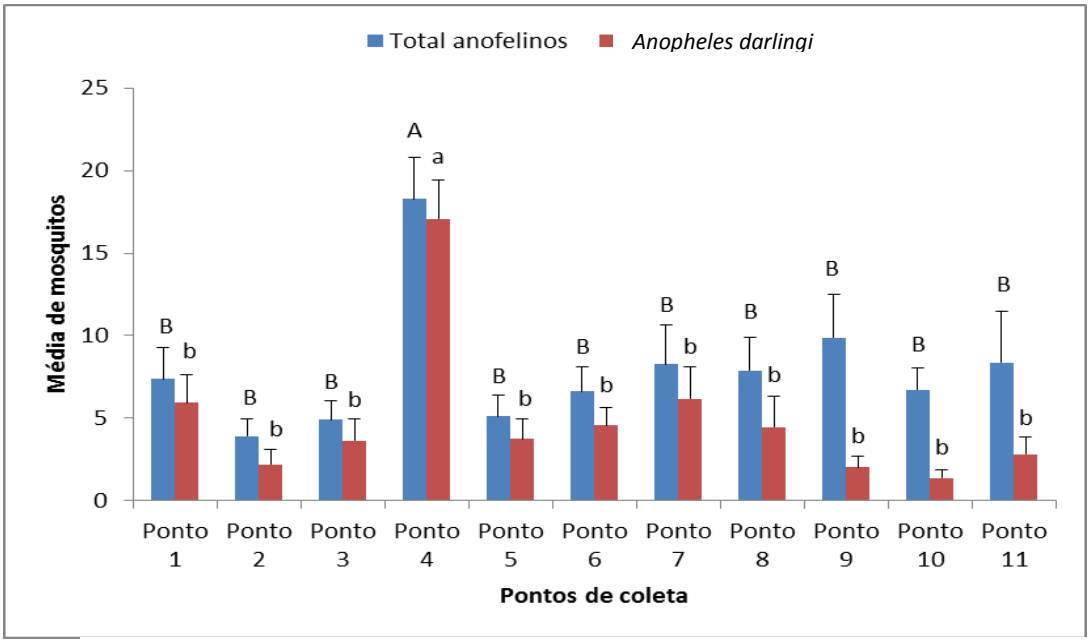

Figura 18. Média e erro padrão de anofelinos, e de *Anopheles darlingi*, capturados com a armadilha BG-Malária, nos 11 pontos de coletas do primeiro quadrado latino, no Sítio Barnabé, Manaus, Amazonas. Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey). Letras maiúsculas indicam diferenças na abundância de anofelinos em geral, enquanto letras minúsculas indicam diferença na abundância de *Anopheles darlingi*.

No que diz respeito à captura de todos os anofelinos no segundo quadrado latino, os espécimes foram coletados em maior quantidade utilizando o tratamento suor incubado do tronco feminino, porém as análises não indicaram diferenças estatísticas na abundância de mosquitos entre os tratamentos (ANOVA: F=0.98; p= 0.47) (Tabela 21; Figura 19). Levando-se em consideração os pontos de amostragem, houve significativamente mais mosquitos coletados no ponto 3 (Tabela 22; Figura 20).

Em relação à captura específica de *A. darlingi*, o número de mosquitos coletados foi maior nas armadilhas com suor incubado do tronco feminino, mas não variou estatisticamente entre os 11 diferentes tratamentos avaliados nesse estudo (ANOVA: F=0.504; p=0.884) (Tabela 23; Figura 19). Quando se considera os pontos de coleta, a captura foi significativamente maior no ponto 3, que era o ponto de amostragem mais próximo da única residência presente na propriedade (p<0.001) (Tabela 24; Figura 20).

Tabela 21. Total de anofelinos capturados utilizando a armadilha BG-Malária, em cada tratamento avaliado no experimento com suor humano, durante o segundo quadrado latino, realizado no mês de Agosto, no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS											Total
	Suor incubado do tronco feminino	Suor incubado do tronco masculino	Camisa Limpa	Suor incubado do pé masculino	Suor fresco do pé feminino	Meia Limpa	Suor fresco do tronco feminino	Suor fresco do tronco masculino	Suor incubado do pé feminino	Suor fresco do pé masculino	CO_2	
07/08/2013	38	89	69	13	8	76	38	36	7	10	25	409
08/08/2013	85	143	16	128	16	26	42	5	15	5	6	487
09/08/2013	18	11	24	9	101	68	21	74	24	31	10	391
14/08/2013	40	33	134	29	27	108	40	23	15	12	12	473
15/08/2013	18	40	44	95	72	6	76	22	44	31	36	484
16/08/2013	17	51	115	38	68	20	10	73	87	13	46	538
19/08/2013	133	25	16	46	5	29	12	19	14	19	6	324
20/08/2013	25	8	8	48	23	16	47	22	22	50	1	270
21/08/2013	48	13	2	1	22	7	35	6	71	10	26	241
22/08/2013	104	91	22	6	17	5	36	12	4	21	24	342
23/08/2013	6	12	29	26	21	5	4	46	4	42	11	206
Total	532	516	479	439	380	366	361	338	307	244	203	4.165

Tabela 22. Total de anofelinos capturados utilizando a armadilha BG-Malária, em cada ponto de amostragem, no experimento com suor humano, durante o segundo quadrado latino, realizado no mês de Agosto, no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas.

Data	PONTOS DE COLETA											Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Ponto 9	Ponto 10	Ponto 11	
07/08/2013	8	38	76	36	89	25	10	38	7	13	69	409
08/08/2013	16	16	42	26	5	143	6	5	85	15	128	487
09/08/2013	9	24	101	21	68	74	11	10	31	18	24	391
14/08/2013	15	29	134	27	40	108	23	33	12	12	40	473
15/08/2013	18	44	95	44	72	76	6	22	40	36	31	484
16/08/2013	13	17	87	38	115	68	10	20	73	51	46	538
19/08/2013	6	19	133	14	46	16	5	12	29	19	25	324
20/08/2013	8	1	50	25	22	48	8	23	47	16	22	270
21/08/2013	6	13	26	10	48	71	1	2	22	35	7	241
22/08/2013	5	12	91	24	21	104	4	6	22	17	36	342
23/08/2013	4	5	46	12	11	42	6	4	26	29	21	206
Total	108	218	881	277	537	775	90	175	394	261	449	4.165

Tabela 23. Total de *Anopheles darlingi* capturados com a armadilha BG-Malária, em cada tratamento avaliado no experimento com suor humano, durante o segundo quadrado latino, realizado no mês de Agosto, no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS											Total
	Suor incubado do tronco feminino	Suor incubado do tronco masculino	Camisa Limpa	Suor incubado do pé masculino	Meia Limpa	Suor fresco do tronco feminino	Suor fresco do pé feminino	Suor fresco do tronco masculino	Suor incubado do pé feminino	Suor fresco do pé masculino	CO_2	
07/08/2013	23	68	58	10	66	26	6	21	4	4	25	311
08/08/2013	72	123	11	104	20	38	14	3	10	3	3	401
09/08/2013	12	8	16	6	48	10	92	64	18	26	5	305
14/08/2013	16	19	110	15	88	30	8	18	6	9	7	326
15/08/2013	8	24	27	88	4	53	33	9	33	19	26	324
16/08/2013	9	23	79	20	9	4	55	41	63	5	2	310
19/08/2013	122	21	6	27	16	7	2	14	9	8	1	233
20/08/2013	18	4	1	36	8	32	16	16	57	39	25	252
21/08/2013	42	6	0	0	4	22	7	3	1	5	10	100
22/08/2013	81	86	14	2	4	36	5	11	1	14	3	257
23/08/2013	0	5	6	14	2	0	13	35	16	30	31	152
Total	403	387	328	322	269	258	251	235	218	162	138	2.971

Tabela 24. Total de *Anopheles darlingi* capturados com a armadilha BG-Malária, em cada ponto de amostragem no experimento com suor humano, durante o segundo quadrado latino, realizado no mês de Agosto, no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas.

Data	PONTOS DE COLETA											Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Ponto 9	Ponto 10	Ponto 11	
07/08/2013	6	26	66	21	68	25	4	23	4	10	58	311
08/08/2013	11	14	38	20	3	123	3	3	72	10	104	401
09/08/2013	6	16	92	10	48	64	8	5	26	12	18	305
14/08/2013	6	15	110	8	30	88	18	19	7	9	16	326
15/08/2013	8	33	88	27	33	53	4	9	24	26	19	324
16/08/2013	5	9	63	20	79	55	4	9	41	23	21	329
19/08/2013	2	8	122	9	27	6	2	7	16	14	16	229
20/08/2013	4	1	39	18	42	36	1	16	32	8	4	201
21/08/2013	3	6	25	5	14	57	0	0	7	22	36	175
22/08/2013	4	11	86	10	3	81	1	2	14	5	13	230
23/08/2013	0	2	35	5	16	30	0	1	14	6	31	140
Total	55	141	764	153	363	618	45	94	257	145	336	2.971

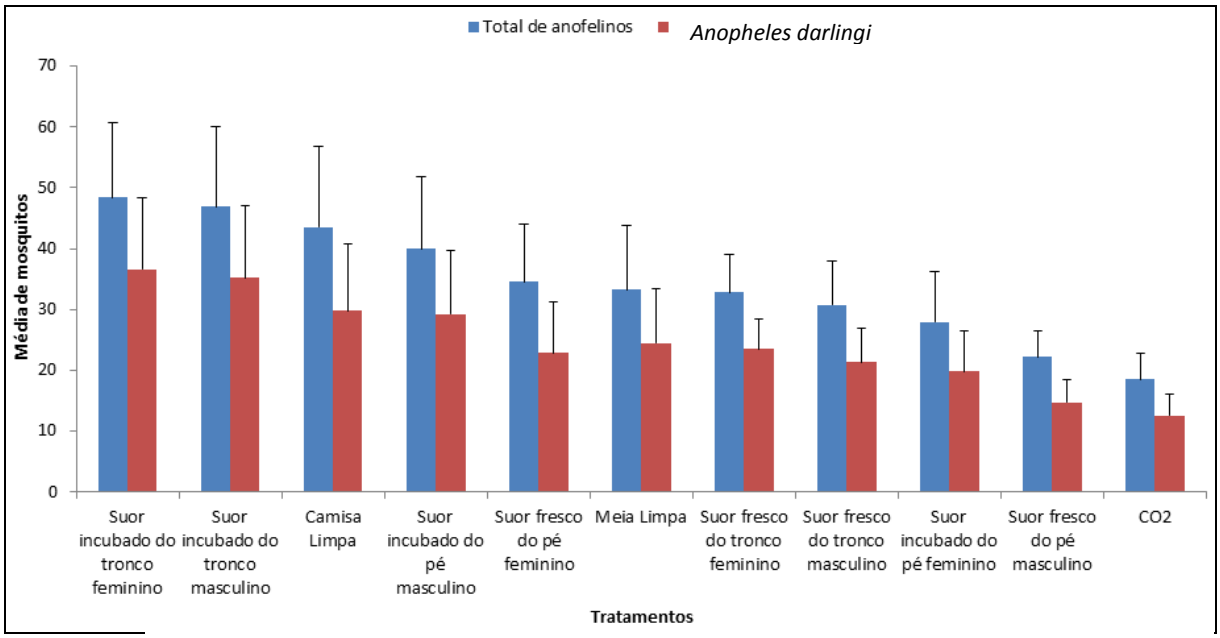

Figura 19. Média e erro padrão do anofelinos, e de *Anopheles darlingi*, capturados com a armadilha BG-Malária, nos 11 tratamentos avaliados no segundo quadrado latino, realizado no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas.

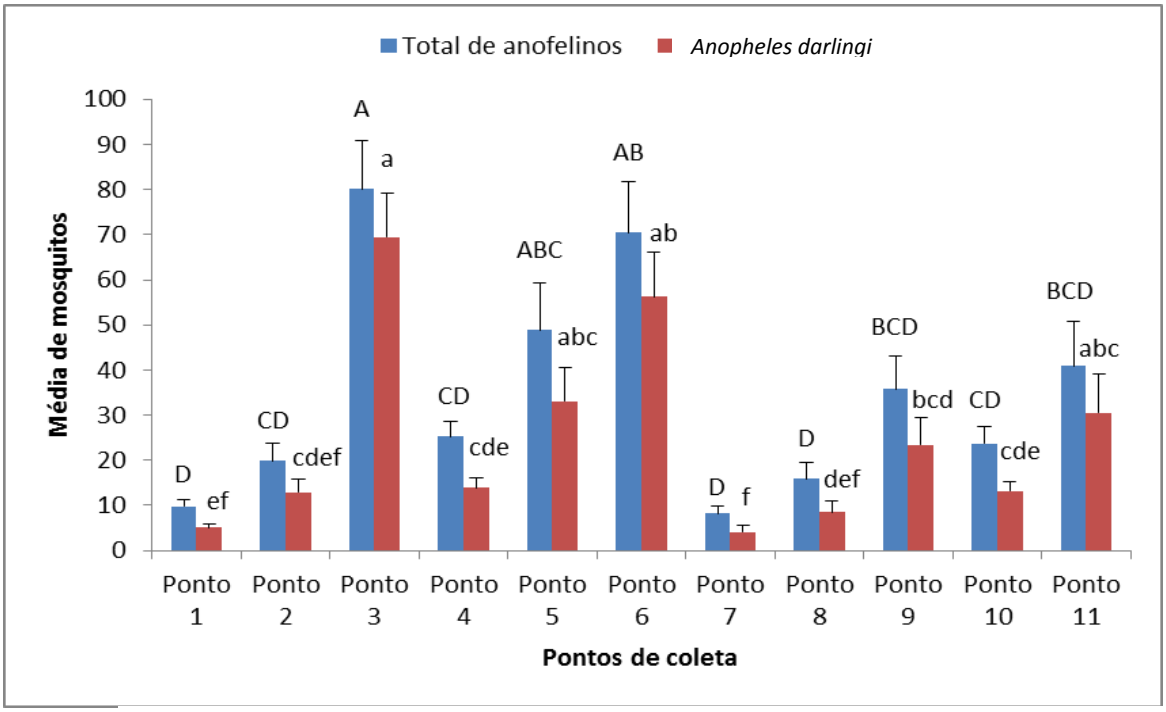

Figura 20. Média e erro padrão de anofelinos, e de *Anopheles darlingi*, capturados com a armadilha BG-Malária, nos 11 pontos de coletas do segundo quadrado latino, realizado no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas. Diferentes letras em cima da barra indicam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey). Letras maiúsculas indicam diferenças na abundância de anofelinos em geral, enquanto letras minúsculas indicam diferença na abundância de *Anopheles darlingi*.

No terceiro quadrado latino, a abundância de anofelinos coletados não diferiu estatisticamente entre os diversos tratamentos (ANOVA: F= 11.47; p>0.05), apesar do suor incubado do tronco feminino ter capturado mais mosquitos (Tabela 25; Figura 21). Contudo, tratando-se dos pontos de coleta, houve diferença significativa entre os diferentes pontos de amostragem de anofelinos, com destaque para o ponto 3 e 4 (Tabela 26; Figura 22).

Em relação *A. darlingi* capturados no terceiro quadrado latino, o número de mosquitos coletados não variou entre os onze tratamentos (ANOVA: F=0.746; p=0.68) (Tabela 27; Figura 21). Quando se considera os pontos de coleta, verifica-se que o número de *A. darlingi* coletados variou estatisticamente entre os pontos de amostragem (ANOVA: F=11.51; p<0.001), com abundância significativamente maior no ponto 3 (Tabela 28; Figura 22).

Tabela 25. Total de anofelinos capturados utilizando a armadilha BG-Malária, em cada tratamento avaliado no experimento com suor humano, durante o terceiro quadrado latino, realizado nos meses de Agosto e Setembro, no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS											Total
	Suor incubado do tronco feminino	Suor fresco do tronco feminino	CO_2	Suor fresco do tronco masculino	Camisa Limpa	Suor incubado do tronco masculino	Meia Limpa	Suor fresco do pé masculino	Suor incubado do pé masculino	Suor incubado do pé feminino	Suor fresco do pé feminino	
26/08/2013	40	26	63	90	25	58	68	42	28	18	21	418
27/08/2013	27	79	1	10	25	21	63	15	9	17	2	240
28/08/2013	11	44	28	37	6	4	17	3	1	4	35	144
29/08/2013	27	18	14	22	30	22	32	37	6	4	33	185
30/08/2013	45	97	42	12	103	20	4	10	76	8	39	372
02/09/2013	31	10	10	24	68	24	9	36	54	50	43	285
03/09/2013	70	35	46	7	23	36	31	12	28	57	5	275
04/09/2013	96	37	12	15	4	37	30	73	53	36	20	297
05/09/2013	37	20	72	32	22	20	13	2	6	28	7	215
06/09/2013	42	19	67	12	14	27	22	30	11	2	6	204
09/09/2013	6	16	42	99	29	79	21	23	9	12	17	330
Total	432	401	397	360	349	348	310	283	281	236	228	2.965

Tabela 26. Total de anofelinos capturados utilizando a armadilha BG-Malária, em cada ponto de amostragem no experimento com suor humano, durante o terceiro quadrado latino, realizado nos meses de Agosto e setembro, no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas.

	PONTOS DE COLETA											
Data	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Ponto 9	Ponto 10	Ponto 11	Total
26/08/2013	21	26	68	90	58	63	42	40	18	28	25	479
27/08/2013	25	2	79	63	10	21	1	15	27	17	9	269
28/08/2013	1	6	35	44	17	37	4	28	3	11	4	190
29/08/2013	4	6	30	33	18	32	22	22	14	37	27	245
30/08/2013	45	8	76	103	39	97	4	12	20	42	10	456
02/09/2013	45	31	50	45	68	43	10	9	24	24	10	359
03/09/2013	46	12	70	48	28	23	14	35	31	7	36	350
04/09/2013	0	12	73	96	45	44	4	20	37	30	52	413
05/09/2013	32	20	72	2	37	28	6	22	7	20	13	259
06/09/2013	22	12	27	67	30	42	2	11	14	6	19	252
09/09/2013	16	21	99	79	42	23	6	12	9	29	17	353
Total	257	156	679	670	392	453	115	226	204	251	222	3.625

Tabela 27. Total de *Anopheles darlingi* capturados com a armadilha BG-Malária, em cada tratamento avaliado no experimento com suor humano, durante o terceiro quadrado latino, realizado nos meses de Agosto e Setembro, no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas.

Data	TRATAMENTOS											Total
	Suor incubado do tronco feminino	CO2	Suor fresco do tronco feminino	Suor fresco do tronco masculino	Camisa Limpa	Suor incubado do tronco masculino	Meia Limpa	Suor fresco do pé masculino	Suor incubado do pé feminino	Suor incubado do pé masculino	Suor fresco do pé feminino	
26/08/2013	30	52	14	67	21	35	61	25	9	21	21	356
27/08/2013	6	0	72	6	23	9	49	7	11	3	1	187
28/08/2013	9	15	32	18	5	2	10	0	4	0	31	126
29/08/2013	19	9	12	3	22	7	32	26	3	6	26	165
30/08/2013	32	27	87	7	89	4	2	4	6	67	27	352
02/09/2013	25	7	3	17	59	20	5	36	45	36	34	287
03/09/2013	66	41	23	4	18	19	20	9	46	20	5	271
04/09/2013	86	10	21	14	2	31	15	67	36	34	18	334
05/09/2013	30	64	14	29	19	18	7	2	25	0	3	211
06/09/2013	29	56	10	12	3	24	13	20	1	1	4	173
09/09/2013	4	32	16	95	11	75	16	21	9	7	16	302
TOTAL	336	313	304	272	272	244	230	217	195	195	186	2.764

Tabela 28. Total de *Anopheles darlingi* capturados com a armadilha BG-Malária, em cada ponto de amostragem no experimento com suor, durante o terceiro quadrado latino, realizado nos meses de Agosto e Setembro, no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas.

Data	PONTOS DE COLETA											Total
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Ponto 9	Ponto 10	Ponto 11	
26/08/2013	21	14	61	67	35	52	25	30	9	21	21	356
27/08/2013	23	1	72	49	6	9	0	7	6	11	3	187
28/08/2013	0	5	31	32	10	18	2	15	0	9	4	126
29/08/2013	3	6	22	26	12	32	3	7	9	26	19	165
30/08/2013	32	6	67	89	27	87	2	7	4	27	4	352
02/09/2013	36	25	45	36	59	34	3	5	17	20	7	287
03/09/2013	41	9	66	46	20	18	5	23	20	4	19	271
04/09/2013	31	10	67	86	36	34	2	18	21	15	14	334
05/09/2013	29	18	64	2	30	25	0	19	3	14	7	211
06/09/2013	13	12	24	56	20	29	1	1	3	4	10	173
09/09/2013	16	16	95	75	32	21	4	9	7	11	16	302
Total	245	122	614	564	287	359	47	141	99	162	124	2.764

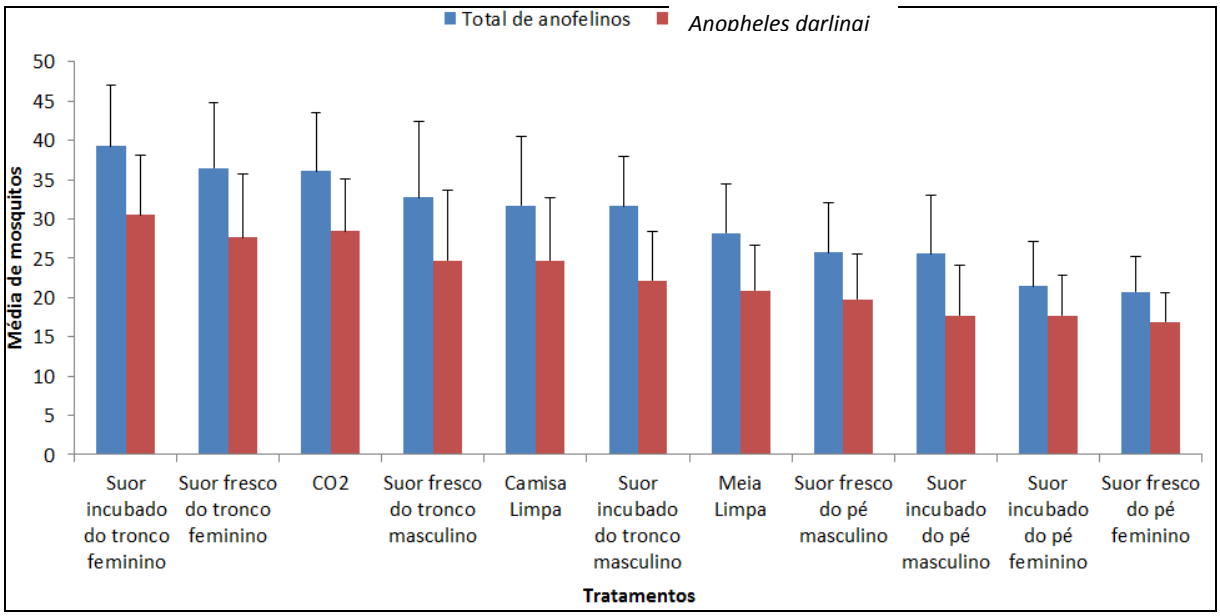

Figura 21. Média e erro padrão de anofelinos, e de *Anopheles darlingi*, capturados com a armadilha BG-Malária, nos 11 tratamentos avaliados no terceiro quadrado latino, realizado no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas.

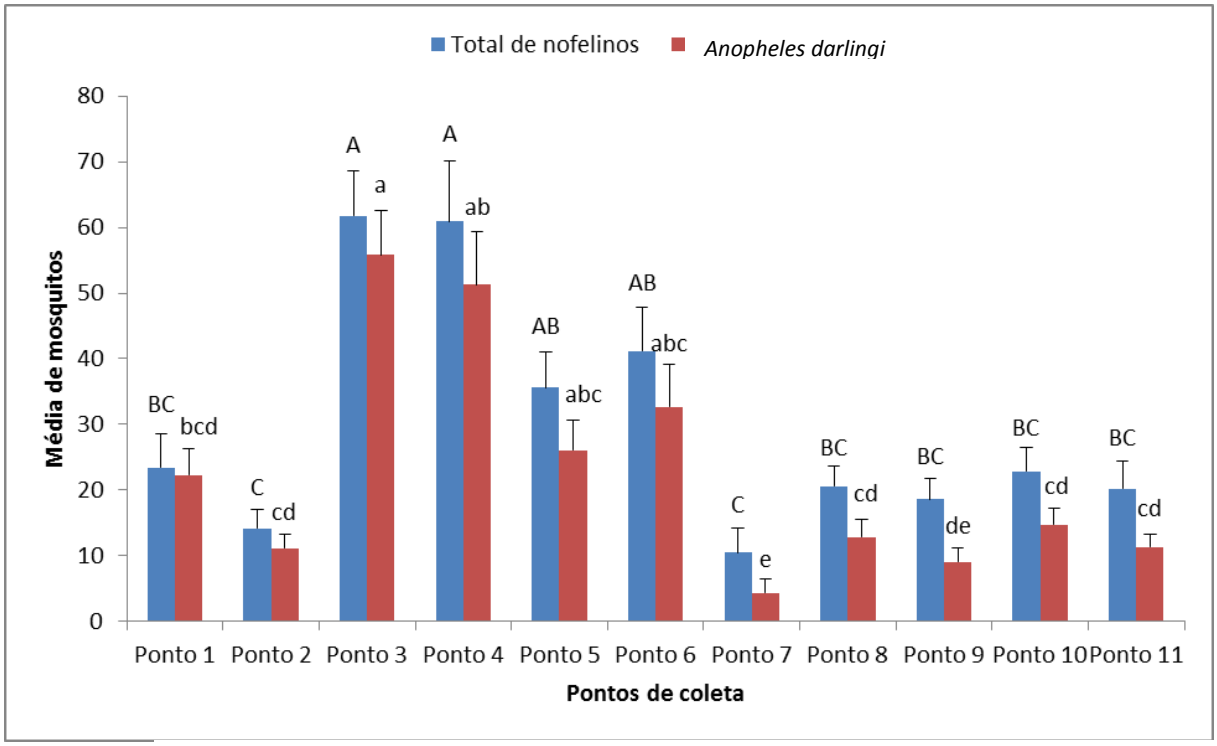

Figura 22. Média e erro padrão de anofelinos, e de *Anopheles darlingi*, capturados com a armadilha BG-Malária, nos 11 pontos de coletas do terceiro quadrado latino, realizado no Sítio Raifran, Manaus, Amazonas. Diferentes letras em cima da barra indicam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey). Letras maiúsculas indicam diferenças na abundância de anofelinos em geral, enquanto letras minúsculas indicam diferença na abundância de *Anopheles darlingi*.

As observações em laboratório ao final de cada noite de coleta demonstraram que a mortalidade de mosquitos foi muito baixa, com média de quatro a 10 mosquitos mortos em cada tudo coletor.

6. Discussão

O delineamento experimental em quadrado latino exerceu grande influência sobre os resultados obtidos, pois levou a uma homogeneização dos dados, visto que qualquer tratamento situado nas proximidades das residências, ou do abrigo dos animais, capturaria abundância mais elevada de mosquitos. Assim, as diferenças nas características de cada ponto de coleta tornou não significativa a abundância de mosquitos capturados por cada atrativo avaliado. A grande vantagem da metodologia do quadrado latino está no fato de promover o mapeamento da área, indicando pontos que apresentam uma maior incidência de anofelinos e, neste trabalho, os locais de *A. darlingi*.

Ainda assim, a BG-Malária se mostrou efetiva em coletar grandes quantidades de anofelinos, que poderiam, inclusive, ser utilizados para outros fins, pois permaneciam vivos após as coletas. No entanto, para ratificar a utilização da BG-Malária, principalmente visando a substituição da atração humana, os dois métodos precisam ser comparados em condições de campo, onde os efeitos do ambiente estão presentes.

6.1. Avaliação do efeito da temperatura para a coleta de anofelinos

No presente estudo, não houve diferenças significativas, tanto para anofelinos em geral quanto para *A. darlingi*, no número de mosquitos capturados por cada tratamento. A ausência de diferença significativa entre as temperaturas testadas, provavelmente ocorreu pela proximidade das temperaturas produzidas pelas lâmpadas. A lâmpada mais potente produziu a maior temperatura média (31,6 ºC), que ainda assim ficou bem abaixo da temperatura corporal humana, que é o hospedeiro natural e preferencial de *A. darlingi*, a qual gira em torno de 37 ºC.

A temperatura corporal é um dos fatores que pode afetar a atratividade em mosquitos, para diferentes pessoas. Está relatado na literatura, por exemplo, que a ingestão de bebida alcoólica pode provocar maior atração de mosquitos por elevar a temperatura corporal do hospedeiro. Da mesma forma, mulheres grávidas são mais atacadas pelos mosquitos por apresentarem maior temperatura corporal (Lindsay *et al*., 2000). Assim, testar uma

temperatura mais elevada, similar à do corpo humano, poderia refletir em capturas significativamente maiores.

Em relação aos pontos de coleta, apenas o segundo quadrado latino apresentou diferenças significativas entre os pontos de amostragem. A ausência de diferença significativa entre os pontos de coleta, na maior parte dos quadrados latinos, provavelmente é devida ao baixo número de tratamentos avaliados, fazendo com que as armadilhas não ficassem muito dispersas na área. Assim, amostraram um ambiente mais homogêneo, sem micro hábitats distintos, o que não refletiu em diferenças marcantes.

Dessa forma, neste experimento o delineamento em quadrado latino não foi determinante para a obtenção do resultado observado no primeiro e terceiro quadrados latinos. Em vez disso, a ausência de diferença estatisticamente significativa foi decorrente da proximidade entre as temperaturas produzidas no interior de cada armadilha, que ficaram bem abaixo da temperatura corporal do ser humano, e que não desencadearam maior predileção por armadilhas com aquecimento.

6.2. Efeito da adição do suor humano na taxa de captura de anofelinos pela BG-Malária

No presente estudo, tanto para anofelinos em geral quanto para *A. darlingi*, observou-se, nos três quadrados latinos realizados, a ausência de diferença estatística entre os diversos tratamentos, com ou sem suor humano.

Este resultado foi surpreendente, principalmente pelos relatos de antropofilia de *A. darlingi* (Deane *et al*., 1949). Nas axilas de humanos há uma concentração excessiva de glândulas écrinas e apócrinas (Folk e Semken, 1991), cujo suor inodoro produzido está sob intensa ação da microbiota, resultando em um cheiro típico (Smallegange *et al*., 2011). Juntamente com o odor das axilas, o odor característico produzido pelos pés humanos é de interesse para estudo por apresentar um ambiente com alta umidade propício ao desenvolvimento de bactérias que convertem os componentes do suor em compostos com potencial para atrair mosquitos (Ara, 2006). Assim, esperava-se que, da mesma forma que já foi demonstrado para *A. gambiae*, a resposta da espécie brasileira para odores específicos provenientes do ser humano fosse maior, o que não ocorreu. Zimmerman *et al*. (2006) afirma que em *A. darlingi* é verificado um grau de antropofilia bastante variado ao longo de sua distribuição De acordo com Lyimo e Fergunso (2009), a preferência por um determinado hospedeiro pode variar entre espécies, mas também entre populações de uma mesma espécie.

Contudo, outros trabalhos com *A. darlingi* já obtiveram resultado semelhantes. Gama *et al*. (2013), utilizando a armadilha BG-Malária apenas com CO_2 como atrativo químico, capturou estatisticamente o mesmo número de anofelinos que a atração humana. Hiwat *et al*., (2011) também observaram que armadilhas contendo apenas CO_2 capturaram tantos *A. darlingi* quanto a atração com humano. Segundo Mohr *et al*. (2011), mesmo com o CO_2 sendo de grande importância na atração dos mosquitos, esse composto é de menor importância para a atração de mosquitos reconhecidos pela sua antropofilia, tais como o *A. darlingi*.

No presente estudo, não houve diferença significativa entre os diversos tratamentos, seja suor do tronco ou do pé, a fresco ou incubado, masculino ou feminino. Por muito tempo, por meio do uso da atração humana em coletas de campo, tem sido observado o hábito dos mosquitos realizarem o repasto sanguíneo nas partes inferiores do corpo, o que levou diversas pesquisas a avaliarem este fato e reconhecerem o pé como atrativo para mosquitos.

Da mesma forma, algumas pesquisas já comprovaram que a incubação do suor o torna mais atrativo. Em experimentos realizados por Braks e Takken (1999) foi demonstrado que a incubação do suor é acompanhada por uma mudança distinta no pH, de ácido para alcalino, o que é observado como o resultado da decomposição microbiana dos componentes da amônia no suor. Braks *et al*. (2000) observaram que a incubação do suor, depois de removidas as bactérias, não era acompanhada por uma mudança no valor do pH, salientando ainda mais a importância desses microrganismos no processo de incubação e mudança de pH do suor, através de sua ação sobre os componentes do suor humano.

No suor incubado o pH tende a se tornar mais alcalino devido a produção de amônia a partir da ação de bactérias presentes na ureia, e a quantidade de ácido lático tende a diminuir devido a utilização desse componente pela flora bacteriana da pele (Bergeim e Cornbleet, 1943; Braks e Takken, 1999, Braks *et al*., 2001). O deslocamento do pH de ácido para básico pode mudar a volatização de componentes já presentes no suor e o deixar mais atrativo para mosquitos (Braks *et al*., 2000).

Visto que os anofelinos não apresentaram nenhuma predileção por odores específicos de humanos, isso sugere que os mosquitos coletados foram atraídos principalmente pelo CO_2, e igualmente para todas as armadilhas, indicando que esse composto é suficiente para atrair os insetos, bem como que o suor humano não contribuiu com nenhum efeito significativo para a coleta feita com as armadilhas.

Adicionalmente, os microambientes ocupados por cada ponto de coleta também exerceram influência sobre os resultados observados, existindo diferenças significativas

quanto ao número de mosquitos capturados entre pontos de amostragem. Este fato revela a existência de micro densidades, em cada ponto e que o fator "local" foi decisivo nos resultados, causando um padrão de atratividade ilusório para os diferentes tratamentos, ou seja, a diferença na densidade de *A. darlingi*, em determinados pontos de coleta, dentro de cada quadrado latino, foram tão fortes que suprimiram a maior ou menor atratividade inerente de cada tratamento avaliado.

Assim, seja qual fosse o tratamento, este modelo de coleta captura maior número de mosquitos em pontos com maior densidade, e menor número em pontos com menor densidade, de forma a homogeneizar o número total de mosquitos capturados, por cada atrativo. Nesse caso, os dados deste trabalho indicam que seria relevante realizar estudos posteriores em laboratório, com todas as condições ambientais controladas, sem a influência de micro hábitats, para ratificar, ou não, os dados obtidos em campo.

Os pontos de coleta com maior densidade, observados neste trabalho (ponto 4 nas tabelas 18 e 20, e ponto 3 nas tabelas 22, 24, 26 e 28), estão próximos ao domicílio humano e ao abrigo dos animais, ou seja, locais que representam uma fonte de repasto sanguíneo. Por consequência, nestes pontos foram capturados mais mosquitos do que naqueles mais próximos dos criadouros. O ponto 4 do primeiro quadrado latino (Sitio Barnabé) estava muito próximo da única residência presente na propriedade, enquanto o ponto 3 do segundo e terceiro quadrado latino (Sítio Raifran), estava situado junto ao do assoalho da casa onde residia o caseiro. Visto que *A. darlingi* foi abundante na amostra e apresenta alta antropofilia, nestes pontos de coleta foi capturado um número elevado de mosquitos, tendenciando os padrões observados, para cada tratamento. Adicionalmente, esses dados revelam a importância de entender a ecologia dos mosquitos associada ao microclima em um local, que pode influenciar tanto as coletas desses insetos quanto a dinâmica das doenças causadas pelos patógenos, que eles veiculam.

A casa em cada propriedade, e o abrigo dos animais, representam locais onde os mosquitos podem encontrar fontes de repasto sanguíneo. Por isso, nos arredores desse ambiente, havia maior densidade de mosquitos. Os insetos, quando estão em alta densidade populacional, tendem a ser mais generalistas e menos seletivos ao escolher um hospedeiro, sendo atraídos por odores menos específicos, como CO_2 (Hii *et al.*, 2000; Rodrigues, 2013). Assim, qualquer tratamento que estivesse mais próximo à essas estruturas capturaria anofelinos de forma igualitária.

Com os dados do presente estudo, foi possível avaliar o melhor tratamento e o melhor local, bem como evidenciam que, em toda e qualquer coleta, o ambiente e a paisagem devem ser levados em consideração, fornecendo informações que permitirão planejar futuras coletas e prever os pontos de amostragens.

Desta forma, conforme mencionamos anteriormente, o número de *A. darlingi* capturados, neste trabalho, relativos aos diferentes tratamentos e os pontos de coleta, indicam que a armadilha BG-Malária pode ser utilizada no monitoramento entomológico, em áreas de transmissão da malária. A próxima etapa do trabalho será avaliar concomitantemente a atuação da BG-Malária, juntamente com a atração humana, em um procedimento que permita verificar a importância de cada método, na atração do *A. darlingi*, o principal vetor da malária na região amazônica.

7. Conclusões

- Nos dois experimentos realizados, o mesmo padrão de resposta foi observado tanto para anofelinos em geral quanto para *A. darlingi*, que ocorreu pela predominância desta espécie na amostragem;
- O método de quadrado latino foi decisivo na obtenção dos resultados observados nos experimentos com suor, suprimindo a atratividade inerente, a cada tratamento avaliado;
- O aquecimento interno da armadilha não aumentou as taxas de captura de anofelinos em relação ao tratamento controle, que não tinha aquecimento, evidenciando a necessidade de testar temperaturas mais elevadas, que se aproximem da temperatura corporal de um ser humano;
- A média de captura de anofelinos em geral, e de *A. darlingi*, não aumentou com a adição de suor humano, revelando a necessidade de avaliar a atratividade de outros componentes liberados pelo corpo humano, inclusive por meio de experimentos em laboratório, com todas as condições controladas;
- A grande abundância de anofelinos capturados neste trabalho, especialmente *A. darlingi*, revela que a armadilha BG-Malária tem potencial para substituir a modalidade de coleta de mosquitos, por atração humana, constituindo uma alternativa ao monitoramento de mosquitos, em áreas malarígenas.

8. Referências

Alexandre, M.A.; Ferreira, C.O.; Siqueira, A.M.; Magalhães, B.L.; Mourão, M.P.G.; Lacerda, M.V. & Alecrim, M.G.C. 2010. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, 16(10): 1611-1614p.

Ara, K.; Hama, M.; Akiba, S.; Koike, K.; Okisaka, K.; Hagura, T.; Kamiya, T.; Tomita, F. 2006. Foot odor due to microbial metabolism and its control. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(4): 357-364p.

Barghini, A.; Urbinatti, P.R.; Natal, D. 2004 Atração de mosquitos (Diptera Culicidae) por lâmpadas incandescentes e fluorescentes. *Entomología y Vectores*, 11 (4): 611-622.

Bergeim, O., Cornbleet, T. 1943. The antibacterial action of the lactic acid and volatile fatty acids of sweat. *Am. J. Med. Sci*., 206:785-792p.

Bernier, U.R., Kline, D.L., Allan, S.A. & Barnard, D.R. 2007. Laboratory comparison of *Aedes aegypti* to humans odors and to synthetic human odor compounds and blends. *J Am Mosq Control Assc*, 23:288:293

Bernier, U.R., Kline, D.L., Schreck, C.E., Yost, R.A. & Barnard, D.R. 2002. Chemical analysis of human skin emanations: comparison of volatiles from humans that differ in attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 18:186–195p.

Braks, M.A.H.; Cork, A.; Takken, W. 1997.Olfactometer studies on the attraction of *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae) to human sweat. *Proceendings Experimental and Applied Entomology N.E.V. Amsterdam*, 8: 99–104.

Braks, M.A.H. & Takken, W. 1999. Incubated human sweat but not fresh sweat attracts the malaria mosquito *anopheles gambiae* sensu stricto. *Journal of Chemical Ecology*, 25(3): 663-672p.

Braks, M.A., Anderson, R.A. & Knols, B.G. 1999. Infochemicals in mosquito host selection: human skin microflora and *Plasmodium* parasites. *Parasitol Today*, 15(10):409-13.

Braks, M.A.H., Scholte, E.J., Takken, W. & Dekker, T. 2000. Microbial growth enhances the attractiveness of human sweat for the malaria mosquito, *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). *Chemoecology*, 10(3): 129-134.

Braks, M.A.H.; Meijerink, J.; Takken, W. 2001. The response of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to two components of human sweat, ammonia and L-lactic acid, in an olfactometer. *Physiological Entomology*, 26: 142-148.

Braga, E.M.; Fontes, J.F. 2005. *Plasmodium* - Malária. *In*.: Neves, D.P; Melo, A.L.; Linardi, P.M. & Vitor, R.W.A. *Parasitologia humana*. 11 ed. São Paulo : Atheneu.

Bronner, U.; Divis, P.C.S.; Farnet, A. & Singh, B. 2009. Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. *Malaria Journal*, 8:15

Cabrini, I. & Andrade, C.F.S. 2006. Resposta de Fêmeas de Mosquitos ao Hospedeiro – Busca por Alimentação. Página na Internet: Ecologia Aplicada - Instituto de Biologia da UNICAMP. Disponível em: http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/artigos_tecnicos.htm. Acesado em: 30 de Setembro de 2013.

Choumet, v\V. 2012. Proteomics of *Anopheles gambiae*, Malaria Parasites, Dr. Omolade Okwa (Ed.). Disponível em: http://www.intechopen.com/books/malaria-parasites/proteomics-of-anopheles-gambiae. Acessado em: 04/03/2012.

Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-de-Oliveira R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 225 pp.

Cork, A. & Park, K.C. 1996. Identification of electrofisiologically-active compounds for the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, in sweat human extracts. *Med Vet entomol*, 10:269-276.

Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I., Knight, R. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326(5960):1694-7. doi: 10.1126/science.1177486

Curran, A.M., Rabin, S.I., Prada, P.A., Furton, K.G. 2005. Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS. *J Chem Ecol*, 31(7):1607-19.

Davis, J.R., Hall, T., Chee, E.M., Majala, A., Minjas, J. & Shiff, C.J. 1995. Comparison of sampling anopheline mosquitoes by light-trap and human-bait collections indoors at Bagamoyo, Tanzania. *Med Vet Entomol* 9: 249-255.

Deane L.M., Causey, O.R., Deane M.P. 1948. Notas sobre a biologia do anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. *Rev Serv Esp Saúde* Publ 1: 827-965.

Deane, L.M., Vernin, C.S. & Damasceno, R.G. 1949. Avaliação das preferências alimentares das fêmeas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis* em Belém, Pará, por meio de Provas de precipitina. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2(3):793-808p.

Deane L.M. 1986. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Owaldo Cruz* 81(Suppl.II): 5-14

Deane, L.M. 1988. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 38: 223-230

Deane, L.M. 1989. A cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia Brasileira. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 84 (Supl. IV): 149 – 156.

Drago, A., Marini, F., Caputo, B., Coluzzi, M., della Torre, A., Pombi, M.. 2012. Looking for the gold standard: assessment of the effectiveness of four traps for monitoring mosquitoes in Italy. *J Vector Ecol.*, 37(1):117-23. doi: 10.1111/j.1948-7134.2012.00208.x.

Eiras, A.E. & Mafra-Neto, A. 2001. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. *In*: Vilela, E.F.& Della Lucia, T.M.C. **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas.** 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, p. 27-39.

Eiras, A.E. & Jepson, P.C. 1994. Responses of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to host odoursand convection currents using an olfactometer bioassay. *Bulletin of Entomological Research*, 84: 207-211.

Favia, G., Ricci, I., Scuppa, P., Damiani, C., Rossi, P., Capone, A., De Freece, C., Valzano, M., Cappelli, A., Mosca, M. & Ulissi, U. 2012. Facing Malaria Parasite with Mosquito Symbionts, Malaria Parasites, Dr. Omolade Okwa (Ed.), Malaria, InTechOpen, 57–70p.

Folk GE; Semken A. 1991. The evolution of sweat glands. *International Journal of Biometeorology*. 35(3): 180-186.

Forattini, O.P. 2002. Culicidologia Médica. São Paulo, EDUSP, 864p.

Gama, R.A. 2009. *Periodicidade de Anopheles darlingi, em Porto Velho (RO) e modificação da armadilha BG-Sentinel® para a captura de anofelinos, visando à substituição atração humana*. Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 172 p.

Gama, R.A., Silva, I.M., Geier, M., Eiras, A.E. 2013. Development of the BG-Malaria trap as an alternative to human-landing catches for the capture of *Anopheles darlingi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 108(6): 000-000.

Gatton, M. L., Chitnis, N., Churcher, T., Donnelly, M. J., Ghani, A. C., Godfray, H. C. J., Gould, F., Hastings, I., Marshall, J., Ranson, H., Rowland, M., Shaman, J. & Lindsay, S. W. 2013. The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. Evolution, 67: 1218–1230. doi: 10.1111/evo.12063

Geier, M. & Boeckh, J. 1999. A new Y-tube olfactometer for mosquitoes to measure the attractiveness of host odours. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 92: 9–19

Geier, M., O. J. Bosch & J. Boeckh. 1999 . Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. Chem. Senses 24: 647–653.

Gibson, G. & Torr, S.J. 1999. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Medical and veterinary Entomology* 13, 2-23

Gillies, M.T. 1980. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): a review. *Bull. ent. Res.*, 70: 525-532

Godfray, H,C.J. 2013. Mosquito ecology and control of malaria. *Journal of Animal Ecology*, 82:15–25p.

Harbach, R.E. 2004.The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research*, 94, 537-553

Hiwat, H., de Rijk, M., Andriessen, R., Koenraadt, C.J.M. & Takken, W. 2011. Evaluation of Methods for Sampling the Malaria Vector *Anopheles darlingi* (Diptera, Culicidae) in Suriname and the Relation with Its Biting Behavior. *Journal of Medical Entomology*, 48(5):1039-1046p.

Howlet, F.M. 1910. The Influence of Temperature upon the Biting of Mosquitoes. *Parasitology*. 3: 479-484p.

Killeen, G.F., Fillinger, U., Kiche, I., Gouagna, L.C. & Knols, B.G. 2002. Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa? *Lancet Infectious Diseases* 2, 618–627.

Kline, D.L., Takken, W., Wood, J.R., Carlson, D.A. 1990. Field studies on the potential of butanone, carbon dioxide, honey extract, 1-octen-3-ol, L-lactic acid and phenols as attractants for mosquitoes. *Med Vet Entomol* 4:383–391.

Knols, B.G.J. 1996. *Odour-mediated host seeking behaviuor of the Afro-tropical malaria vector Anopheles gambiae Giles*. (Tese de Doutorado). Department of Entomology, Wageningen Agricultural university, the Netherlands and The National Institute for Medical Research, 213 p.

Krockel, U.; Rose, A.; Eiras, A.E.; Geier, M. 2006. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of traps catches with human landing rates in an urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(2): 229-238.

Laporta, G.Z. & Sallum, M.A.M. 2011. Effect of CO_2 and 1-octen-3-ol attractants for estimating species richness and the abundance of diurnal mosquitoes in the southeastern Atlantic forest, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106(3): 279-284

Lefreve, T., Gouagna, L.C., Dabire, K.R. Elguero, E., Fontenille, D., Renaud, F., Costantini, C. & homas, F. 2010. Beer Consumption Increases Human Attractiveness to Malaria Mosquitoes. *PLoS ONE* 5(3): e9546. doi:10.1371/journal.pone.0009546

Lindsay, S., Ansell, J., Selman, C., Cox, V., Hamilton, K., & Walraven, G. 2000. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet*, 355: 1972.

Lyimo, I.N. & Ferguson, H.M. 2009. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends in Parasitology*, 25:4, pp. 189 – 196.

Lyimo, I.N., Haydon, D., Russell, T.L., Mbina, K.F., Daraja, A.A., Mbehela, E.M., Reeve, R., and Ferguson, H. (2013) The impact of host species and vector control measures on the fitness of African malaria vectors. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 280.

Mabaso, M.L.H., Sharp, B. & Lengeler, C. 2004. Historical review of malaria control in southern Africa with an emphasis on the use of indoor residual house-spraying. Trop Med Int Health 9:846–856

Magbity, E.B., Lines, J.D., Marbiah, M.T., David, K. & Peterson, E. 2002. How reliable are light traps in estimating biting rates of adult *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the presence of treated bed nets? *Bulletin of Entomological Research*, 92: 71–76p.

Martins-Campos K.M., Pinheiro W.D., Vitor-Silva S., Siqueira A.M., Melo G.C., Rodrigues I.C., Fé, N.F., Barbosa, M.G.V., Tadei, W.P., Guinovart, C., Bassat, Q., Alonso, P.L., Lacerda, P.L. & Monteiro, W.M. 2012. Integrated vector management targeting *Anopheles darlingi* populations decreases malaria incidence in an unstable transmission area, in the rural Brazilian Amazon. Malar J 2012;11:351.

Mboera, L.E.G. & Takken, W. 1997. Carbon dioxide chemotropism in mosquitoes (Diptera:Culicidae) and its potential in vector surveillance and management programmes. *Review of Medical and Veterinary Entomology*, 85, 355–368.

Meijerink, J., M. A. H. Braks, Brack, A. A, Adam, W., Dekker, T., Posthumus, M.A., Van Beek, T.A. & Van Loon, J.J.A. 2000. Identification of olfactory stimulants for Anopheles gambiae from human sweat samples. J Chem Ecol 26:1367–1382.

Meijerink, J., Braks, M.A.H., Van Loon, J.J.A. 2001. Olfactory receptors on the antennae of the malaria mosquito Anopheles gambiae are sensitive to ammonia and other sweat-borne components. *Journal of Insect Physiology*, 47:455–464

Ministério da Saúde. 2012. Portal da saúde. Disponível em: portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526. Acessado em 01 de Setembro de 2013.

Ministério da Saúde. 2014. SIVEP-Malária/SVS. Disponível em: portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional. Acessado em 03/03/2014.

Moreno M., Bickersmith S., Harlow W., Hildebrandt J., McKeon S.N., Silva-do-Nascimento T.F., Loaiza J.R., Ruiz F., Lourenço-de-Oliveira R., Sallum M.A.M., Bergo E.S., Fritz G.N., Wilkerson R.C., Linton Y.M., Dantur Juri M.J., Rangel Y., Povoa M.M., Gutierrez-Builes L.A., Correa M.M., Conn J.E. 2013.

Mohr, R.M.; Mullens, B.A.; Gerry, A.C. 2011. Evaluation of ammonia, human sweat, and bovine blood as attractants for the female canyon fly, *Fannia conspicua* (Diptera: Muscidae), in southern California. *Journal of Vector Ecology*, 36(1): 55-58.

Ndiath, M.O., Mazenot, C, Gaye, A., Konate, L., Bouganali, C., Faye, O., Sokhna, C. & Trape, J.F., 2011. Methods to collect *Anopheles* mosquitoes and evaluate malaria transmission: A comparative study in two villages in Senegal. *Malaria Journal*, 10:270

Phylogeography of the neotropical Anopheles triannulatus complex (Diptera: Culicidae) supports deep structure and complex patterns. *Parasit Vectors* 6: 47.

Matowo, N.S., Moore J., Mapua S., Madumla, E.P., Moshi, I.R., Kaindoa, E.W., Mwangungulu, S.P., Kavishe, D.R., Sumaye, R.D., Lwetoijera, D.W. & Okumu, F.O. 2013. Using a new odour-baited device to explore options for luring and killing outdoor-biting malaria vectors: a report on design and field evaluation of the Mosquito Landing Box. *Parasites & Vectors*, 6:137

Mukabana, W.R., Takken, W., Coe, R. & Knols, B.G.J. 2002. Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 1:17

Mukabana, W.R., Takken, W., Killeen, G.F. & Knols, B.G.J. 2004. Allomonal effect of breath contributes to differential attractiveness of humans to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 3:1

Okumu, F.O.; Madumla, E.P.; Alex, N.; John, A.N.; Lwetoijera, D.W.; Sumaye, R.D. 2010a. Attracting, trapping and killing disease transmitting mosquitoes using odor-baited stations - The Ifakara Odor-Baited Stations. *Parasites & Vectors* 3(12), 10.

Okumu, F.O., Killeen, G.F., Ogoma, S., Biswaro, L., Smallegange, R.C., Mbeyela, E., Titus, E., Munk, C., Ngonyani, H., Takken, W., Mshinda, H., Mukabana, W.R., Moore, S.J. 2010b. Development and Field Evaluation of a Synthetic Mosquito Lure That Is More Attractive than Humans. *PLoS ONE*, 5(1): e8951. doi:10.1371/journal.pone.0008951

Olanga, E.A., Okal, M.N., Mbadi, P.A., Kokwaro, E.D. & Mukabana, W.R. 2010. Attraction of *Anopheles gambiae* to odour baits augmented with heat and moisture. Malar J.; 9: 6.

Oliveira-Ferreira, J.; Lacerda, M.V.G.; Brasil, P.; Ladislau, J.L.B.; Tauil, P.L. & Daniel-Ribeiro, C.T. 2010. Malaria in Brazil: na overview. *Malaria journal*, 9:15.

Pates, P. & Curtis, C. 2005. Mosquito behavior and vector control. *Annu. Rev. Entomol*., 50:53–70

Peterson, D.G. & Brown, A.W.A. 1951. Studies of the Responses of the Female *Aedes* Mosquito. Part III. The Response of *Aedes aegypti* (L.) to a Warm Body and its Radiation. *Bull. Ent. Res*., 42: 535-541p.

Pickett, J.A., Birkett, M.A., Dewhirst, S.Y., Logan, J.G., Omolo, M.O., Torto, B., Pelletier, J., Syed, Z. & Leal, W.S. 2010. Chemical ecology of animal and human pathogen vectors in a changing global climate. *J Chem Ecol.* 2010 Jan;36(1):113-21. doi: 10.1007/s10886-010-9739-9.

Qiu, Y.T., Smallegange, R.C., Van Loon, J.J., Ter Braak, C.J., Takken, W. 2006. Interindividual variation in the attractiveness of human odours to the malaria mosquito *Anopheles gambiae* s.s. *Med Vet Entomol*., 20(3):280-7.

Rafael, J.A.; Melo, G.A.R.; Carvalho, C.J.B.; Casari, S.A.; Constantino, R. 2012. *Insetos do Brasil*. Diversidade e Taxonomia. 1ª Ed. Ribeirão Preto: Holos. 810 p.

Ritchie, S.A., Cortis, G., Paton, C., Townsend, M., Shroyer, D., Zborowski, P., Hal,-Mendelin, S., Van Den Hurk, A.F. 2013. A simple non-powered passive trap for the collection of mosquitoes for arbovirus surveillance. *J Med Entomol*, 50(1):185-94.

Rodrigues, I.B., Tadei, W.P., dos Santos, R.L.C., dos Santos, S. & Baggio, J.B. 2008. Controle da malária: eficácia de formulados de *bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de espécies de *Anopheles* em criadouros artificais – tanques de piscicultura e criadouros de olaria. *Revista de Patologia Tropical*. Vol. 37 (2): 161-176.

Rodrigues, M.S. 2013. *Desenvolvimento e avaliação da eficiência de protótipos da armadilha BG-Malária para a captura de adultos de Anopheles darlingi em substituição a coleta por atração em humanos.* Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 111pg.

Rosa-freitas, M.G.; Lourenço-de-oliveira, R.; Carvalho-pinto, C.J.; Flores-mendoza, C. & Silva do nascimento, T.F. 1998. Anopheline species complexes in Brasil. Current knowledge of those Related to Malária Transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93**(5), Rio de Janeiro.

Ruiz-Lopez, F.; Wilkerson, R.C.; Ponsonby D.J; Herrera M.; Sallum MAM; Velez I.D.; Quiñones M.L.; Flores-Mendoza C.; Chadee D.D.; Alarcon, J.; Alarcon-Ormasa, J.; Linton, Y.M. 2013. Systematics of the Oswaldoi Complex (*Anopheles*, *Nyssorhynchus*) in South America. *Parasites & Vectors*, **6**:324

Sant'ana, A.L. & Lazovei, A.L. 2001. Influência do ciclo lunar na atividade de vôo de *Coquillettidia* (*Rhynchotaenia*) *venezuelensis* (Theobald) (Diptera, Culicidae) na Mata Atlântica, Serra do Marumbi, Morretes, Paraná, Brasil. *Revta bras. Zool.* 18(2): 365 – 374 pp.

Schmied, W. H.; Takken, W.; Killeen, G.F.; Knols, B.G.J. & Smallegange, R.C. 2008. Evaluation of two counterflow traps for testing behaviour-mediating compounds for the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. under semi-field conditions in Tanzania. *Malaria Journal*, 8:230.

Shiao, S.H; Hansen, I.A.; Zhu, J.; Sieglaff, D.H. & Raikhel, A. 2008. Juvenile hormone connects larval nutrition with target of rapamycin signaling in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 54, pp. 231–239

Silver, J.B. 2008. Mosquito Ecology: Field Sampling Methods. 3rd edition. Springer, 1494 pp. *Australian Journal of Entomology*, **47**, 382–383

Sinka M.E., Rubio-Palis Y., Manguin S., Patil A.P., Temperley W.H., Gething P.W., Van Boeckel T., Kabaria C.W., Harbach R.E., Hay S.I. 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors* 3: 72.

Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemmingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Burkot, T.R., Harbach, R.E., Hay, S.I., 2012. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit. Vectors* 5, 69.

Smallegange, RC, Qiu YT, Van-Loon JJ, Takken W. 2005. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). *Chem. Senses*, 30:145–52. doi: 10.1093/chemse/bji010.

Smallegange, R.C. & Takken, W. 2010. Host-seeking behaviour of mosquitoes: responses to olfactory stimuli in the laboratory. *In*: Takken, W., Knols, B.G.J. Ecology and control of vectors-borne diseases: olfaction in vectors-host interactions. Vol. 2, Wageningen Academic Publishers, The Natherlands, 143-180.

Smallegange, R.C., Knols, B.G.J. & Takken, W. 2010. Effectiveness of Synthetic Versus Natural Human Volatiles as Attractants for *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) Sensu Stricto. *Journal of Medical Entomology*, 47(3):338-344. DOI: http://dx.doi.org/10.1603/ME09015

Smallegange, R.C., Verhulst, N.O. & Takken, W. 2011. Sweaty skin: An invitation to bite? *Trends in Parasitology* 27: 143-148

Smallegange, R.C., Van Gemert G-J., Van de Vegte-Bolmer, M., Gezan, S, Takken, W., Sauerwein, R.W. & Logan, J.G. 2013. Malaria Infected Mosquitoes Express Enhanced Attraction to Human Odor. *PLoS ONE* 8(5): e63602. doi:10.1371/journal.pone.0063602

Sokal, R.R. & ROHLF, F.J. 1995. Biometry: the principles of statistics in biological research. New York, Freeman, 887p.

Stoops, C.A., Gionar, Y.R., Rusmiarto, S., Susapto, D., Andris, H., Elyazar, I.R., Barbara, K.A. & Munif, A. 2010. Laboratory and field testing of bednet traps for mosquito (Diptera: Culicidae) sampling in West Java, Indonesia. *J Vector Ecol.*, 35(1):187-96. doi: 10.1111/j.1948-7134.2010.00046.x.

Tadei W.P., Mascarenhas, B. M., Podestá, M.G. 1983. Biologia de anofelinos amazônicos VIII. Conhecimentos sobre a distribuição de espécies de *Anopheles* na região de Tucuruí-Marabá (Pará). *Acta Amazon* 13: 103-140.

Tadei, W.P. 1987. Biologia de anofelinos amazônicos. XI. Estudos em populações de *Anopheles* e controle da malária em Ariquemes (Rondônia). *Acta Amazon* 17: 151-167

Tadei, W.P., dos Santos, J.M.M., Costa, W.L.S.; Scarpassa, V.M. 1988. Biologia de anofelinos amazônicos XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia) Rev Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 30: 221-251.

Tadei, W.P.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B. 1993. Incidence, distribution and ecological aspects of *Anopheles species* (Diptera: Culicidae) in natural and environmental impact areas of Brazilian Amazon, p. 167-196. In: Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A. (Eds.). *Scientific Bases for Development and Preservation Strategies of the Amazon*. Vol. 2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas

Tadei, W.P.; Thatcher, B.D.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B. & Rafael, M.S. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59(2), 1998, pp. 325–335.

Tadei, W.P., Dutary-Thatcher, B. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus Nyssorhynchus. Rev Inst Med Trop São Paulo 42: 87-94.

Tadei, W.P. & Rodrigues, I.B. 2003. Controle Biológico de anofelinos na Amazônia. Tema apresentado na Mesa Redonda sobre "Alternativas para o Controle Vetorial e Resistência aos inseticidas" durante o XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belém/PA.

Tadei, W.P.; Rodrigues, I.B.; Santos, M.M.; Rafael, M.S.; Passos, R.A.; Costa, F.M.C.; Pinto, R.C. & Oliveira, A.E.M. 2007. Entomologia e controle de vetores: o papel da entomologia no controle da malária. X reunião Nacional de pesquisa em Malária. *Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Vol. 40: suplemento II.

Takken, W. 1991. The role of olfaction in host-seeking of mosquitoes: A review. *Insect Science and its Application*, 12:287-295p.

Takken, W. & Knols, B.G.J. 1999. Odor-mediated behavior of afrotropical malaria mosquitoes. Annu. Rev. Entomol. 1999. 44:131–57.

Takken, W.; Knols, B.G.J.; Otten, H. 1997. Interactions between physical and olfactory cues in the host-seeking behavior of mosquitoes: the role of relative humidity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91:119–120p.

Torr, S.J., Dellatorre, A., Calzetta, M., Costatini, C. & Vale, G.A. 2008. Towards a fuller understanding of mosquito behaviour: use of electrocuting grids to compare the odour orientated responses of *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* in the field. *Medical and Veterinary Entomology* **22**, 93–108

Trape, J.F. 2001. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 64(1, 2): 12–17 pp.

Triplehorn, C.A. & Johnson, N.F. 2011. *Estudo dos insetos _ tradução da 7ª edição de borror and delong's introduction to the study of insects*. São Paulo, Cengage Learning, 809 p.

Tun-Lin, W., Kay, B.H., Barnes, Forsyth, S. 1996. Critical Examination of *Aedes aegypti* Indices: Correlations with Abundance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 54(5): 543-547.

Verhulst, N.O., Beijleveld, H., Knols, B.G., Takken, W., Schraa, G., Bouwmeester, H.J., Smallegange, R.C. 2009. Cultured skin microbiota attracts malaria mosquitoes. *Malaria Journal*, 8:302. doi: 10.1186/1475-2875-8-302.

Verhulst, N.O.; Qiu, Y.T.; Beijleveld, H.; Maliepaard, C.; Knights, D.; Schulz, S.; Berg-Lyons, D.; Lauber, C.L.; Verduijn, W.; Haasnoot, G.W.; Mumm, R.; Bouwmeester, H.J.; Claas, F.H.J.; Dicke, M.; Van Loon, J.J.A.; Takken, W.; Knight, R.; Smallegange, R.C. 2011. Composition of Human Skin Microbiota Affects Attractiveness to Malaria Mosquitoes. *PLoS ONE*, 6(12): e28991. Doi: 10. 1371.journal.pone.0028991

Vilela, E.F. & Della Lúcia, T.M.C. (Ed.). 2001. *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. Ribeirão Preto: Editora Holos. 206pg.

Walker, K. 2000. Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control. *Medical and Veterinary Entomology*, 14:345-354

Who, World Health Organization. 2012. Global Malaria Programe: World Malaria Report 2012. World Health Organization, Geneva, 259 p.

Who, World Health Organization. 2013. Global Malaria Programe: World Malaria Report 2013. World Health Organization, Geneva, 253 p.

Walker, K. & Lynch, M. 2007. Contributions of *Anopheles* larval control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential. *Medical and Veterinary Entomology*, 21, 2–21

Williams, C.R., Bader, C.A., Williams, S.R. & Whelan, P.I. 2012. Adult mosquito trap sensitivity for detecting exotic mosquito incursions and eradication: a study using EVS traps and the Australian southern saltmarsh mosquito, *Aedes camptorhynchus. J Vector Ecol.*, 37(1):110-6. doi: 10.1111/j.1948-7134.2012.00207.x.

Zimmerman, R.H., Galardo, A.K., Lounibos, L.P., Arruda, M.E. & Wirtz, R. 2006. Bloodmeal hosts of *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) in a malaria-endemic area of the Brazilian Amazon. *Journal of Medical Entomology*, 43: 947-956p.

Zwiebel, L.J. & Takken, W. 2004. Olfactory regulation of mosquito–host interactions. *Insect Biochem Mol Biol*.; 34(7): 645–652.

ANEXO 1

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA EM BIODIVERSIDADE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Nº de Registro na Pesquisa: 14138813.0.0000.0006

O pesquisador Leandro Barros Leal convida a participar e pede autorização para coletar seu suor que irá ajudar na realização das atividades do Projeto de Pesquisa "**ARMADILHA BG-MALÁRIA: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA E DA ADIÇÃO DE SUOR HUMANO NA CAPTURA DE ANOFELINOS, COM ÊNFASE EM *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE)**". Se você autorizar esta coleta, seu suor será utilizado como atrativo para mosquitos e servirá para compararmos a eficiência de atração entre o suor dos pés *vs* o suor do tronco, bem como a atratividade de suor fresco *vs* suor incubado. A coleta do suor será realizada utilizando camisas e meias brancas de algodão, sem causar nenhum tipo de dano ou dor no ato da coleta. Essas roupas suadas serão utilizadas em campo como atraentes para anofelinos.. Dessa forma, nenhum voluntário será utilizado como atração humana, e sim apenas as suas roupas suadas.

Para obter o suor impregnado nas roupas, o voluntário será convidado a caminhar em velocidade moderada por 30 min. em uma esteira no início da manhã. Durante esta atividade física para produzir suor, uma paramédica acompanhará o voluntário.

Não participará da pesquisa qualquer voluntário com problemas cardíacos, fumantes ou com comprometimento físico, bem como aqueles que possuem alergia às camisas e meias de algodão utilizadas para coletar o suor. No dia de coleta do suor, será solicitado ao voluntário que não consuma, antes da atividade física, alimentos que possam alterar o seu odor. Também será solicitado ao voluntário que não seja ingerido bebida alcoólica e que não utilize perfume ou desodorante até o momento da caminhada na esteira.

Mesmo após sua autorização, o voluntário terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem prejuízo do

atendimento fornecido pelo pesquisador. O voluntário não terá nenhuma despesa e também nenhuma remuneração. Consequentemente a vantagem de sua participação é apenas de caráter científico ao auxiliar este estudo que poderá proporcionar a futura substituição do método tradicionalmente utilizado que é a atração humana.

O pesquisador a frente desta pesquisa assume toda a responsabilidade de dar assistência integral ao voluntário, diante de qualquer complicação e danos recorrentes dos riscos previstos.

Os resultados da pesquisa serão analisados e divulgados, porém sua identidade será mantida em sigilo para sempre. Se você quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa, faça contato com o pesquisador pelo telefone (92) 81121629 ou pelo e-mail: wptadei@gmail.com.br. Contatos com o Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos – CEP-INPA, endereço: Av André Araújo, 2936, prédio da diretoria, sala do CEP, bairro: Aleixo, CEP: 69.080-971, Manaus, Amazonas. Telefone: (92) 3643-3287, e-mail: cep.inpa@inpa.gov.br.

Consentimento Após–Informação

Eu,_____, por me considerar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste documento e da pesquisa a ser desenvolvida, livremente dou meu consentimento para inclusão como participante da pesquisa e atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

_____ ou ___-_____-_____

Assinatura do participante Data

Impressão do dedo polegar

Caso não saiba assinar

_____ ____-_____-_____

Leandro Barros Leal Data