

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

VICENTE ESTEVAM MACHADO

**ESTABELECIMENTO DE COLÔNIA DE *Lutzomyia* (L.) *longipalpis*
(DIPTERA:PSYCHODIDAE) E TESTES DE TÚNEL DE VENTO PARA AVALIAÇÃO
DE SUBSTÂNCIAS ATRATIVAS PARA FLEBOTOMÍNEOS**

Araraquara

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

VICENTE ESTEVAM MACHADO

**ESTABELECIMENTO DE COLÔNIA DE *Lutzomyia* (L.) *longipalpis*
(DIPTERA:PSYCHODIDAE) E TESTES DE TÚNEL DE VENTO PARA AVALIAÇÃO
DE SUBSTÂNCIAS ATRATIVAS PARA FLEBOTOMÍNEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de
Farmacêutico-Bioquímico.

Orientador: Mara Cristina Pinto

Araraquara
2014

Agradecimentos

A Deus por minha vida, família e amigos.

Aos meus pais e irmã, demais familiares e amigos, pelo incentivo e apoio incondicional.

À Professora Doutora Mara Cristina Pinto, pela orientação, ajuda, apoio, confiança e paciência a mim dedicados todo esse tempo.

Ao Jairo Torres Magalhães Junior, pela parceria e ajuda.

À Todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para minha formação.

Aos professores pela composição da banca examinadora e por todas as contribuições nela oferecidas.

Sumário

Resumo	5
1. Introdução	7
1.1. Leishmaniose.....	7
1.2. Flebotomíneos.....	9
1.3. Ecologia Química	10
2. Objetivos	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1. Criação dos flebotomíneos	14
3.2. Túnel de vento.....	15
3.3. Avaliação em túnel de vento das substâncias potencialmente atrativas	16
3.4. Análises estatísticas	17
4. Resultados	18
4.1. Fêmeas.....	19
4.2. Machos.....	21
5. Discussão	24
6. Referências	26
7. Anexos	32

Resumo

Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) são incriminados na transmissão das leishmanioses. A criação destes insetos em laboratório é considerada complexa, porém é importante para que testes na área de comportamento e ecologia química sejam realizados. Um dos ramos da chamada ecologia química, avalia compostos voláteis, os quais podem ser liberados por hospedeiros ou sintetizados em laboratório, com poder atrativo para insetos hematófagos. Vem sendo bastante estudada para o grupo dos culicídeos, mas para flebotomíneos estes estudos ainda são escassos. Neste estudo foi feito o estabelecimento da colônia da espécie *Lutzomyia* (L.) *longipalpis*, coletados em Ipecaetá – BA, importante vetor da leishmaniose visceral nas Américas, e realizado testes de atratividade utilizando alcoóis (1-octen-3-ol, 1-octanol, 1-heptanol e 1-nonanol), em túnel de vento no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, campus de Araraquara. Os testes foram feitos com fêmeas e machos, da colônia previamente estabelecida. Os resultados mostraram que as fêmeas apresentaram melhor resposta para os compostos nonanol e octenol e os machos para os compostos octenol, nonanol e heptanol.

Lista de Figuras

Fig 1. Aumento no número de casos de LV de 1981 – 2009. Os pontos indicam cidades com mais de 100.000 habitantes e com mais de 10 casos de LV por ano.....	14
Fig 2. Túnel de vento.....	15
Fig 3. Ativação de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> - Porcentagem de fêmeas ativadas pelo heptanol, octanol, octenol e nonanol (três diferentes concentrações). Barras com letras significando a diferença entre as comparações ($p < 0.05$).....	19
Fig 4. Atração de fêmeas de <i>L. longipalpis</i> - Porcentagem de fêmeas atraídas pelo octenol, octanol, heptanol e nonanol (três diferentes concentrações). Barras com letras significando a diferença entre as comparações ($p < 0.05$).....	19
Fig 5. Ativação de machos de <i>L. longipalpis</i> - Porcentagem de machos ativados pelo octenol, octanol, heptanol e nonanol (três diferentes concentrações). Barras com letras significando a diferença entre as comparações ($p < 0.05$).....	21
Fig 6. Atração de machos de <i>L. longipalpis</i> - Porcentagem de machos atraídos pelo octenol, octanol, heptanol e nonanol (três diferentes concentrações). Barras com letras significando a diferença entre as comparações ($p < 0.05$).....	21

1. Introdução

1.1. Leishmaniose

As leishmanioses, causadas pelo agente etiológico *Leishmania* spp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), são transmitidas através dos flebotomíneos, que são dípteros incriminados na transmissão de diversas bactérias, vírus e protozoários a diversos tipos de animais. De uma forma geral, as leishmanioses podem ser classificadas em cutânea e visceral. São enfermidades consideradas negligenciadas, porém, acredita-se na ocorrência de 2 milhões de novos casos no mundo por ano, sendo 1,5 milhão na forma cutânea, e os outros 500 mil, na forma visceral, além de atingir 88 países com mais de 12 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2012).

A leishmaniose visceral (LV) é causada pelo protozoário *Leishmania infantum chagasi*, que é transmitido para humanos pelo *Lutzomyia longipalpis* (Belo et al., 2013), o ciclo da doença começa quando o *L. longipalpis* se alimenta de sangue e ingere o parasita na sua forma amastigota, dentro do flebotomíneo os amastigotas se transformam em promastigotas e retornam para a probóscide, onde no repasto sanguíneo são injetadas no hospedeiro. Dentro do hospedeiro os promastigotas são fagocitados por macrófagos, onde voltam à forma amastigota e se dividem por divisão simples, reiniciando assim o ciclo (Harhay et al., 2011).

O Brasil é o país com o maior número de casos na América Latina, cerca de 3000, tendo uma mortalidade de 5,8%, no período de 2005-2009 (De Melo; Fortaleza, 2013). Nos últimos anos, o número de casos de LV no Brasil vem aumentando, uma das explicações é a capacidade de adaptação que o vetor apresenta, ou seja, o que há

algumas décadas era estritamente rural, hoje se encontra casos em perímetros peri-urbanos e urbanos (Fig 1) (Harhay et al., 2011). Outra explicação é a dificuldade de prevenção da leishmaniose, seja com problemas com a vacinação ou sacrifício de reservatórios caninos (De Melo; Fortaleza, 2013).

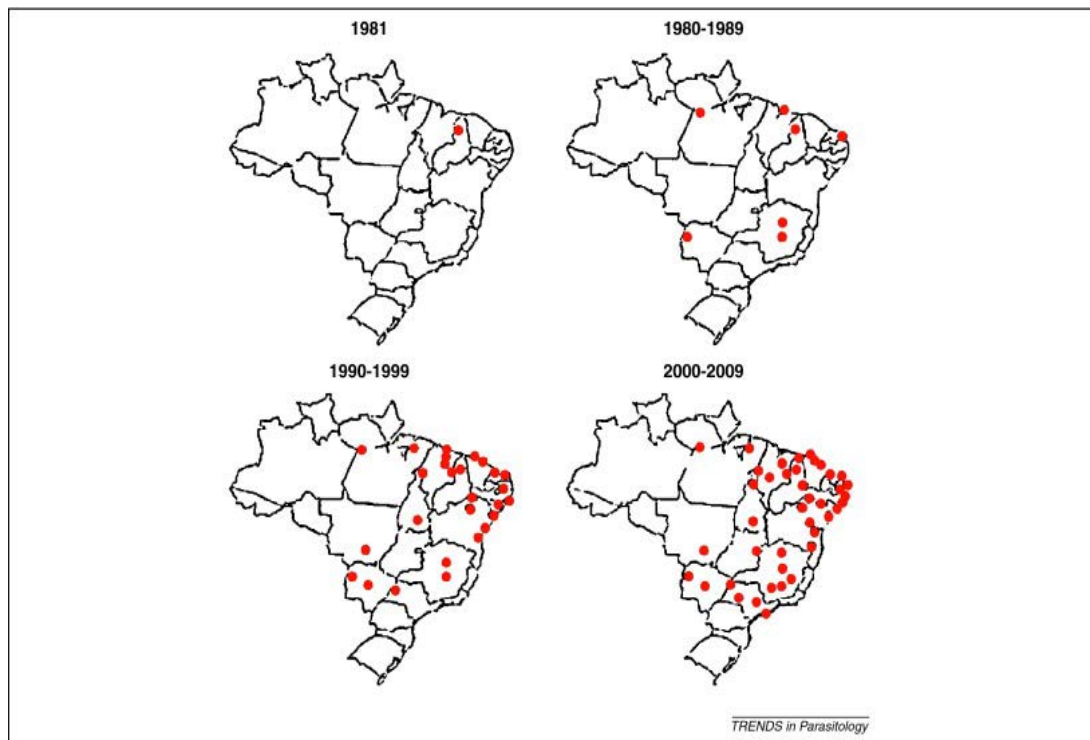


Fig 1. Aumento no número de casos de LV de 1981 – 2009. Os pontos indicam cidades com mais de 100.000 habitantes e com mais de 10 casos de LV por ano. (Fonte: Harhay et al., 2011)

As manifestações clínicas da LV podem ocorrer entre um período de 10 dias a 1 ano da exposição ao parasita, em crianças os sintomas mais comuns são: febre, perda de peso, distensão abdominal e fraqueza. Os sinais clássicos da LV após a disseminação do protozoário são acúmulo de células fagocíticas mononucleares, os quais invadem os órgãos e causam hepatoesplenomegalia.

O diagnóstico da LV é feito por meio de observação do protozoário em microscópio, cultura de amostras adequadas, detecção de antígenos, testes sorológicos e detecção do DNA do parasita (Elmahallawy et al., 2014).

O tratamento tradicional é feito com antimoniais pentavalentes, porém estes apresentam muitos efeitos adversos, além de casos de resistência do parasita. Assim, na Europa, na Ásia e na América do Sul, nas últimas duas décadas, estão sendo utilizados medicamentos alternativos, como a anfotericina B e derivados lipossomais (Pace, 2014).

1.2. Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos holometabólicos, ou seja, apresentam ovos, fase larval, pupas e inseto adulto (Soares e Turco, 2003). No gênero *Phlebotominae* há por volta de 900 espécies descritas, porém algumas sem importância médica ou veterinária, pois se alimentam de animais pecilotérmicos (Ready et al., 2013). Na natureza as larvas se alimentam de matéria orgânica em decomposição no solo e os adultos de ambos sexos necessitam de uma alimentação com carboidratos, encontrada em tecidos de plantas; somente as fêmeas adultas se alimentam de sangue, sendo que este é necessário para a oviposição (Soares e Turco, 2003).

Há muitas tentativas de criação de flebotomíneos em laboratório para várias espécies, porém mesmo com alguns avanços este ainda é um procedimento muito trabalhoso (Soares e Turco, 2003).

Em áreas altamente endêmicas no Brasil, utiliza-se três frentes de controle, tratamento dos pacientes infectados, sacrifício dos reservatórios caninos e nebulização de inseticidas nas casas (Lainson e Rangel, 2005).

Com recentes avanços na ecologia química, essa se torna mais uma tentativa de ferramenta para controle e monitoramento de insetos hematófagos utilizando-se de compostos químicos de vários grupos funcionais, que sejam atrativos para os insetos (Longan e Birkett, 2007).

1.3. Ecologia Química em flebotomíneos

A procura por compostos voláteis que possam ser utilizados em armadilhas para a atração de insetos hematófagos vem sendo bastante desenvolvida para o grupo dos culicídeos, inclusive com resultados bastante promissores (Mukabana et al., 2012). O mesmo não pode ser aplicado para o grupo de flebotomíneos, onde os estudos nessa área são ainda incipientes.

Os maiores avanços obtidos com flebotomíneos são referentes à utilização de feromônios da espécie *L. longipalpis* associados a galinheiros (Bray et al., 2009, 2010). Entretanto, como existem diferentes feromônios produzidos por diferentes populações de *L. longipalpis* (Hamilton et al., 2005), a utilização dos feromônios como possíveis ferramentas de monitoramento ou controle estará sujeita a variações locais.

Cairomônios são substâncias químicas voláteis produzidas por organismos de uma espécie, que causam reações fisiológicas ou comportamentais benéficas a outras espécies (Brown et al., 1970). Para flebotomíneos, um estudo com as espécies *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia* demonstrou que 45% da taxa de

atratividade de um ser humano está ligada ao CO₂, o restante da atratividade seria devido a outras substâncias voláteis produzidas pelo suor ou respiração (Pinto et al., 2001). Experimentos eletrofisiológicos e comportamentais em túnel de vento apresentaram resultados positivos para fêmeas de *L. longipalpis* submetidas a misturas de compostos extraídos de glândulas de odor, originárias da cauda e do ânus de raposa (Douguerty et al., 1999).

O composto 1-octen-3-ol é atrativo para diferentes espécies de insetos hematófagos, como por exemplo mosquitos (Kline et al., 1990) e moscas tsé-tsé (Torr et al., 2006), pode ser encontrado naturalmente em várias fontes: algumas plantas como nas flores da alfafa (Tava et al., 1997), na melancia (Yajima et al., 1985), em fungos como o champignon (Grove, 1981), além de bactérias (Viehweg et al., 1989) e animais como gado e ruminantes (Hall et al., 1984, Takken and Knols 1999). No ser humano foi identificado no suor (Bernier et al., 2010) e respiração (Xue et al., 2008), para flebotomíneos, apresentou atratividade em campo para a espécie *Nyssomyia neivai* (Pinto et al., 2011). Para *L. longipalpis*, embora tenha apresentado respostas eletrofisiológicas (Sant'Ana et al., 2002) apresentou baixa atratividade em campo (Andrade et al., 2008).

Essa divergência entre a resposta fisiológica e os dados de campo de *L. longipalpis* nos levou a pensar em avaliá-lo em túnel de vento. Além do mais, despertou mais uma questão, será que outros álcoois que diferentemente do octenol apresentem cadeia saturada e simples, também podem ser atrativos para *L. longipalpis*?

Neste estudo foram feitos testes de atratividade utilizando *L. longipalpis* em túnel de vento com os álcoois: 1-octen-3-ol, 1-octanol, 1-nonanol e o 1-heptanol.

O 1- octanol pode ser encontrado naturalmente em plantas como na melancia (Yajima et al., 1985), nas flores da alfafa (Tava et al., 1997) e também é encontrado em formigas (Peerzada et al., 1990).

O 1-nonanol pode ser encontrado naturalmente no mel de eucalipto (Bastos et al, 2002) e em algumas plantas em geral (Kekelidze et al.,1984, Kekelidze et al., 1983, Anjou et al., 1967).

O 1-heptanol também é encontrado naturalmente no mel de eucalipto (Bastos et al., 2002) e no mel de lavanda (Jerkovic e Marijanovic, 2009), além de ser encontrado em diversas plantas e vegetais (NCBI, 2012).

2. Objetivos

1. Estabelecer e manter a colônia de *L. longipalpis* originária de Ipecaetá – BA na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara.

2. Realizar testes de atratividade em túnel de vento com os compostos: 1-octen-3-ol, 1-octanol, 1-heptanol e 1-nonanol em diferentes concentrações para machos e fêmeas de *L. longipalpis*.

3. Material e Métodos

3.1. Criação dos flebotomíneos

A técnica empregada na criação em laboratório foi baseada na metodologia adaptada de Young et al., (1981) e Modi & Tesh (1983). Os flebotomíneos foram coletados em Ipecaetá – BA e trazidos em colaboração com a Dra. Stella Maria Barrouin-Melo do Laboratório de Infectologia Veterinária - Escola de Medicina Veterinária da UFBA. Os insetos foram acondicionados em gaiolas com estrutura feita em tubos de PVC recobertas com um tecido fino, “voil”. Na fase adulta os insetos recebiam diariamente alimentação composta por solução aquosa de 50% de sacarose, sendo a mesma colocada em um algodão embebido em cima da gaiola. Por volta de quatro dias após a emergência dos adultos as fêmeas são alimentadas com sangue, sendo colocado camundongo anestesiado para a hematofagia das fêmeas, as quais após um dia do repasto sanguíneo foram colocados em potes de plástico de 250 mL, com fundo cortado preenchido com gesso de cerca de 2 centímetros de espessura para a oviposição. Após eclosão dos ovos, as larvas eram alimentadas diariamente com uma mistura feita de ração de peixe, fezes de coelho seca e terra, autoclavadas. Os insetos eram mantidos em insetário climatizado com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 60%-70% de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas.

O uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Unicamp, processo: CEUA 2951-1.

3.2. Túnel de vento

O túnel de vento é de material acrílico transparente nas dimensões de 40X40cm e 200cm de extensão. Há uma parte removível na parte superior do túnel de vento para que os insetos sejam introduzidos. (Fig. 2).

O fluxo de ar, que leva as substâncias voláteis do seu ponto de liberação até os insetos, é obtido por cilindro de ar sintético comprimido de alta pureza (5.0, White Martins) umedecido e aquecido a 37°C em Kitassato, em banho-maria e regulado por um fluxômetro. Desenho do túnel em Pinto et al., (2012).



Fig 2. Túnel de vento

3.3. Avaliação em túnel de vento das substâncias potencialmente atrativas

Os experimentos foram realizados em ambiente com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 60%-70% de umidade relativa do ar.

Estímulos olfativos como 1-octen-3-ol, 1-octanol, 1-heptanol e 1-nonanol (98.0%, Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) foram testados em três concentrações diferentes (10%; 50% 100%) diluídas em hexano (98.0%, Aldrich Chemical, Milwaukee, WI). Os compostos foram adquiridos pela colaboração estabelecida com a Dra. Arlene Corrêa do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Antes de cada teste realizou-se a limpeza do túnel com hexano.

Os testes foram realizados com machos e fêmeas de quatro a seis dias de vida, eram colocados em grupos de três insetos em dez gaiolas, utilizando em cada teste o total de 30 insetos, os quais ficaram a 50 centímetros do estímulo que foi um papel filtro, com dimensões de 4x4 centímetros, com 200 microlitros dos compostos. Também foram realizados testes com hexano, como controle negativo, substância utilizada para a diluição dos álcoois.

Cada experimento teve duração de dois minutos e foram analisados os seguintes comportamentos dos flebotomíneos: número de insetos que deixaram a gaiola de liberação: Ativação; número de febotomíneos que alcançaram a fonte de odor e tempo gasto para a chegada até a fonte de odor: Atração.

3.4. Análises estatísticas

O teste de Chi-quadrado de Pearson foi utilizado para comparar as proporções de insetos ativados e atraídos nos diferentes compostos e concentrações. As análises foram realizadas no programa estatístico Bioestat 5.0.

4. Resultados

4.1. Fêmeas

A resposta para o octenol apresentou dose dependência, tanto na ativação como na atração. Na ativação, houve diferença estatística a partir da concentração 50% em relação ao controle ($p < 0,05$), porém não houve diferença entre as concentrações de 50% e 100% ($p > 0,05$). A atração foi estatisticamente diferente a partir de 50% em relação ao controle (Fig 2 e 3).

Para o octanol não houve uma resposta dose dependente. Houve apenas diferença entre o controle e a concentração de 50% na ativação.

Para o heptanol não houve resposta dose dependente, sendo que as concentrações de 50 e 100% obtiveram melhor resposta de ativação em comparação com o controle e 10%. Para a atração a única concentração em que houve resposta foi a de 50%.

A resposta para o nonanol apresentou dose dependência, tanto na ativação como na atração. A ativação foi estatisticamente diferente a partir de 50% em relação ao controle, enquanto na atração a resposta foi estatisticamente diferente apenas na concentração de 100%.

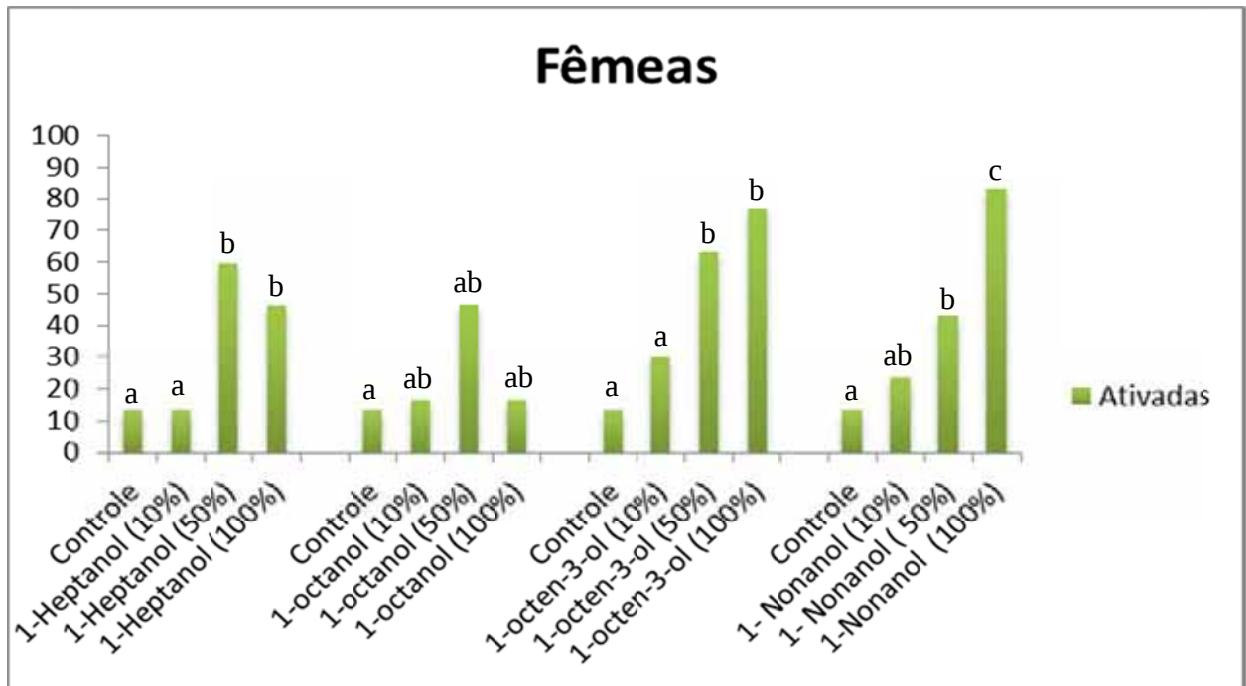


Fig 3 . Ativação de fêmeas de *L. longipalpis* - Porcentagem de fêmeas ativadas pelo heptanol, octanol, octenol e nonanol (três diferentes concentrações). Barras com letras significando a diferença entre as comparações ($p < 0,05$).

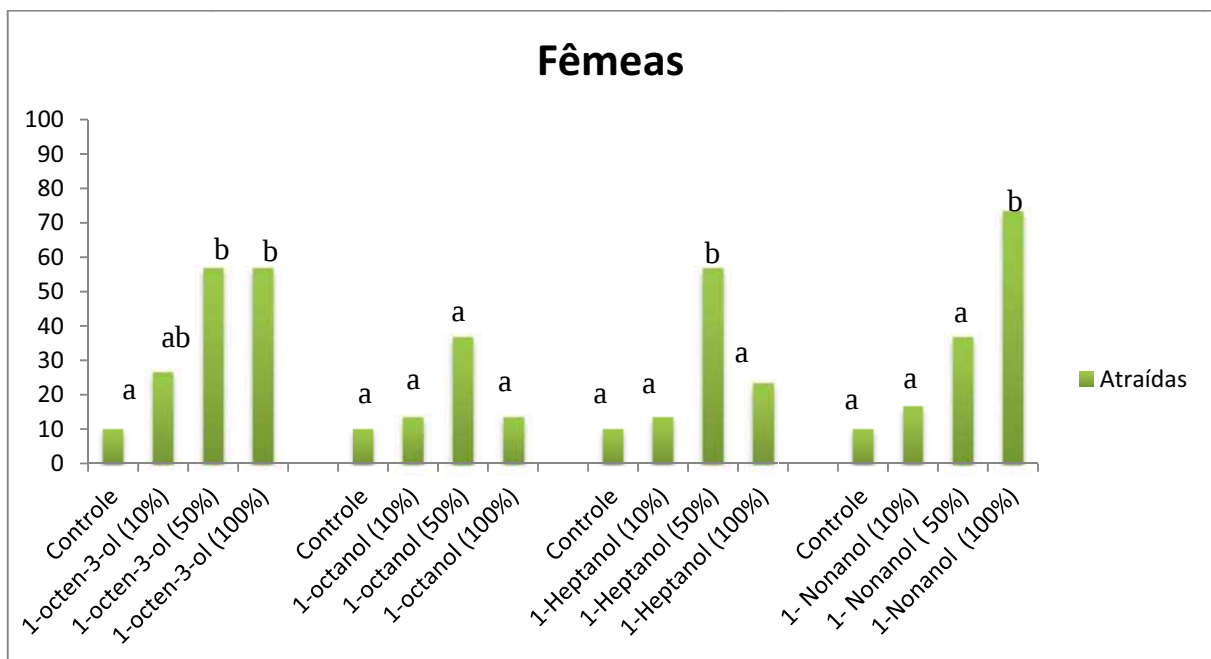


Fig 4. Atração de fêmeas de *L. longipalpis* - Porcentagem de fêmeas atraídas pelo octenol, octanol, heptanol e nonanol (três diferentes concentrações). Barras com letras significando a diferença entre as comparações ($p < 0.05$).

4.2. Machos

A resposta para o octenol apresentou dose dependência, tanto na ativação como na atração. Na ativação e atração, houve diferença estatística a partir da concentração 50% em relação ao controle ($p < 0,05$), porém não houve diferença entre 50% e 100% ($p > 0,05$) (Fig 4 e 5).

Para o octanol não houve uma resposta dose dependente. A concentração de 10% foi a única que obteve resposta comportamental de ativação e atração.

Para o heptanol houve resposta dose dependente tanto na ativação quanto na atração. A concentração de 100% foi a única que diferiu estatisticamente do restante, tanto na ativação quanto na atração.

Para o nonanol houve resposta dose dependente tanto na ativação quanto na atração, sendo que estas respostas foram estatisticamente diferentes a partir de 50% em relação ao controle, não diferindo entre as concentrações de 50% e 100%.

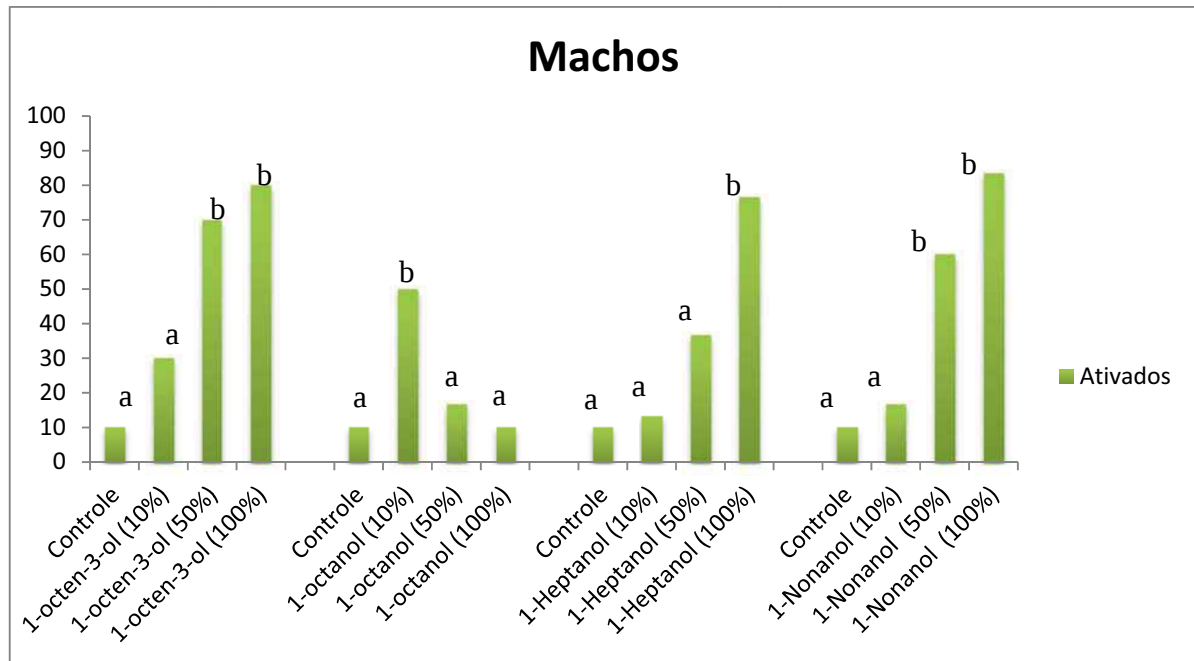


Fig 5. Ativação de machos de *L. longipalpis* - Porcentagem de machos ativados pelo octenol, octanol, heptanol e nonanol (três diferentes concentrações). Barras com letras significando a diferença entre as comparações

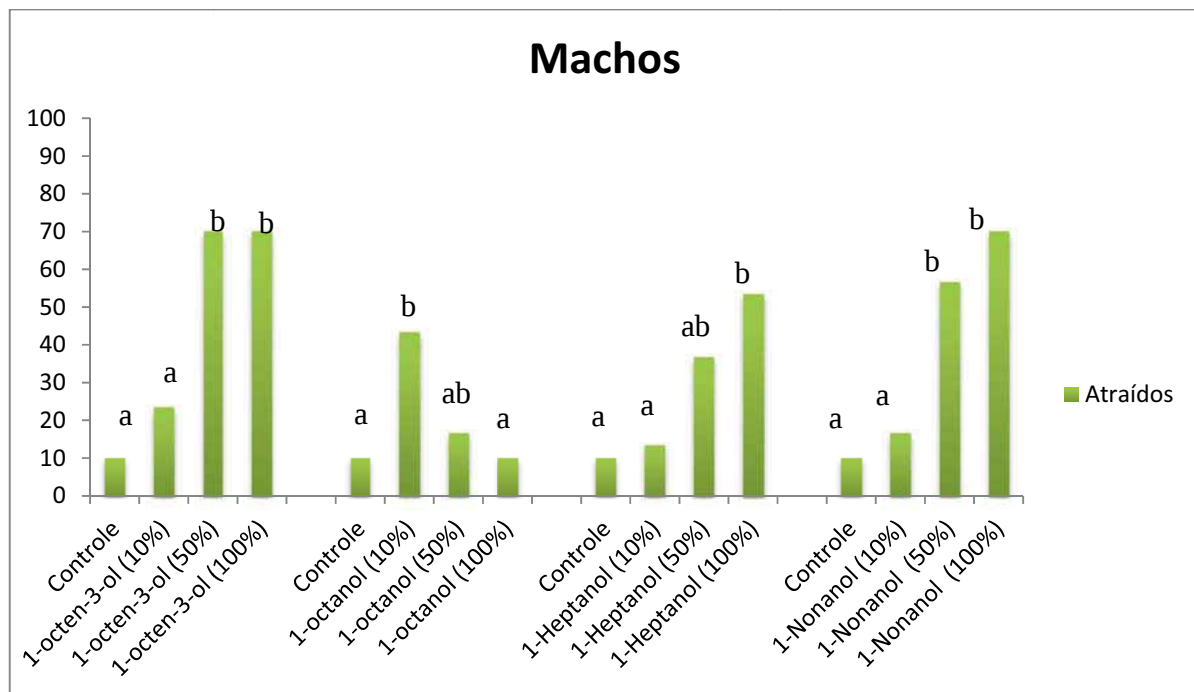


Fig 6. Atração de machos de *L. longipalpis* - Porcentagem de machos atraídos pelo octenol, octanol, heptanol e nonanol (três diferentes concentrações). Barras com letras significando a diferença entre as comparações ($p < 0.05$).

5. Discussão

Os resultados apresentados mostraram que além do octenol, os álcoois primários também obtiveram resposta, assim devem ser melhor investigados. Octenol e nonanol apresentaram as melhores respostas para fêmeas de *L. longipalpis*, enquanto que para os machos heptanol, octenol e nonanol obtiveram boas repostas.

O octenol é extensivamente usado como cairomônio para insetos hematófagos, pois é encontrado em várias fontes, como na respiração humana (Xue et al., 2008) e em bovinos (Hall et al., 1984). A atratividade do octenol é controversa, porém os resultados apresentaram uma dose – dependência, além de uma fraca atração na diluição de 10%, assim pode-se explicar a baixa resposta em campo do *L. longipalpis*, já que foi utilizada uma baixa taxa de liberação (0,5mg/h) (Andrade et al 2008).

No entanto, para o heptanol, octanol e nonanol, não há informação na literatura para flebotomíneos. Estes álcoois não estão diretamente ligados a animais, sendo por liberação na respiração ou pelo suor, porém estes álcoois foram detectados em pequenos níveis, após incubação de suor humano por 42-52 horas (Meijerink et al., 2000). O heptanol também foi isolado no hidrolisado de penas de galinha (De Milo et al., 1997) sendo importante, já que os flebotomíneos são frequentemente encontrados em galinheiros, estes sendo relevantes na criação das larvas de *L. longipalpis* (Casanova et al., 2013). Para insetos hematófagos no geral, existem alguns estudos mostrando resposta a estes compostos, como *Aedes aegypti* que apresentou atratividade ao nonanol (Mathew et al., 2013). Para os simulídeos foi testado o octanol, porém não apresentou resposta em campo (Sutcliffe et al., 1994), e o heptanol foi testado para triatomíneos e também não houve resposta (Vitta et al., 2009)

Voláteis de flores são compostos por várias substâncias, as quais se mostraram atrativa para mosquitos (Jhumur, Dötterl , Jürgens , 2008), Os álcoois primários aqui testados foram encontrados em algumas plantas (Yajima et al., 1985 , Kekelidze et al., 1984, Tava et al., 1997). Como os flebotomíneos utilizam as plantas como fonte de alimentação, esses álcoois presentes em plantas podem ser potencialmente atrativos. Sendo que machos e fêmeas necessitam de carboidratos para fornecimento de energia, o que é obtido através de alimentação direta em tecidos de plantas no campo (Schlein et al.,1995).

Considerando a resposta aos álcoois primários, pode-se observar tanto semelhanças como particularidades entre machos e fêmeas, entretanto, ambos os sexos necessitam de alimentação em plantas, assim certa atração para com alguns voláteis dessas plantas é esperado. Porém há dificuldades em caracterizar essas diferenças através de caracteres morfológicos, como as sensilas. Sendo que há diferenças no número das sensilas do segundo segmento palpal, no entanto no terceiro segmento do maxilar o número de sensilas são iguais (Spiegel et al., 2005).

A resposta dose-dependente do octenol para fêmeas, já foi observada em estudo eletrofisiológico (Santana et al., 2002), a qual corrobora com os resultados desse estudo, entretanto não há estudos de eletrofisiologia com octenol para machos, sendo que este também apresentam atração.

Os resultados mostraram que as fêmeas apresentaram melhor resposta para os compostos nonanol e octenol e os machos para os compostos octenol, nonanol e heptanol.

Mediante os resultados promissores encontrados, novos experimentos serão realizados com diferentes álcoois primários no laboratório de Parasitologia.

6. Referências

Andrade AJ, Andrade MR, Dias ES, Pinto MC, Eiras AE. Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 103: 337-343.2008.

Anjou K, von Sydow E. The Aroma of Cranberries. II. *Vaccinium macrocarpon* Ait. **Acta Chemica Scandinavica (1947-1973)**. 21: 2076 – 2082. 1967.

Bastos DHM, Franco MRB, Da Silva MAAP, Janzantti MS, Marques MOM. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 22:122-129.2002.

Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS Simões TC, Nascimento BWL, Silva ES, Struchiner CJ. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 7:1-12. 2013

Bernier, U. R., D. L. Kline, D. R. Barnard, C. E. Schreck, and R. A. Yost. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). **Analytical Chemistry**. 72: 747-756. 2000.

Bray DP, Bandi KK, Brazil RP, Oliveira AG, Hamilton JG. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) to traps in the field. **Journal of Medical Entomology**. 46: 428-434.2009.

Bray DP, Alves GB, Dorval ME, Brazil RP, Hamilton JG. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. **Parasites and Vectors**. 11: 3-16. 2010.

Brown WL, Eisner T, Whittaker RH. Allomones and kairomones: Transpecific chemical messengers. **BioScience Journal** . 20:21-22.1970.

Casanova C, Andrighetti MT, Sampaio SM, Marcoris ML, Colla-Jacques FE, Prado ÂP. Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Disease**. 7:2443. 2013

De Melo EC, Branco CMC. Challenges in the Therapy of Visceral Leishmaniasisin Brazil: A Public Health Perspective. **Journal of Tropical Medicine** . 2013: 1-5. 2013

DeMilo A, Lee CJ, Levi V, Moreno D. Volatile components of a chicken feather hydrolystate that is highly attractive to the West Indian and Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Entomological Science**. 32:245–256. 1997

Dougherty MJ, Guerin PM, Hamilton JGC, Ward RD. Behavioral and electrophysiological responses of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) when exposed to canid host odour kairomones. **Physiological Entomology**. 24: 241-262. 1999.

Elmahallawy EK, Martinez AS, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Mari JMN, Fernandez JG. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of infection in developing countries**. 8: 961-972. 2014.

Grove JF. Volatile compounds from the mycelium of the mushroom *Agaricus bisporus*. **Phytochemistry**. 20:2021-2022. 1981.

Hall DR, Beevor PS, Cork A, Nesbitt BF, Vale GA. 1-octen-3-ol A potent olfactory stimulant and attractant for tsetse isolated from cattle odours. **International Journal of Tropical Insect Science**. 5: 335-339. 1984.

Hamilton JG., Maingon RD., Alexander B, Ward RD., Brazil RP. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**. 19:480-488. 2005.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**. 27: 403-409. 2011

Jerković I, Marijanović Z. Screening of Volatile Composition of *Lavandula hybrida* *Reverchon* II Honey Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Ultrasonic Solvent Extraction. **Chemistry & Biodiversity**.6:421-429.2009

Jhumur US, Dötterl S, Jürgens A: Floral odors of *Silene otites*: their variability and attractiveness to mosquitoes..**Journal of Chemical Ecology**. 34:14–25. 2008

Kekelidze NA, Dzhanikashvili MI, Tatarishvili AN, Bagdoshvili TP. Essential oils of the leaves of the grafts of *Citrus unshiu*. **Chemistry of Natural Compounds**. 20: 572 – 574. 1984.

Kekelidze NA, Dzhanikashvili MI Essential oils of the leaves of *Citrus wilsonii*. **Chemistry of Natural Compounds**. 18: 753 – 754. 1982.

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

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 100: 811-827. 2005.

Logan JG, Birkett MA. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. **Pest Management Science**. 63:647–657. 2007.

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

Modi GB, Tesh RB. A single technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology** 30: 568-569. 1983.

Mukabana WR, Mweresa .CK, Otien B, Omusula P, Smallegange RC, van Loon, JJ, Takken, W. A novel synthetic odorant blend for trapping of malaria and other African mosquito species. **Journal of chemical ecology**. 38: 235-244.2012

NCBI, 2012

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>. Acesso em: 18/09/2012.

Pace D. Leishmaniasis. **Journal of infection**.69: 1-9.2014

Pinto MC, Campbell-Lendrum D, Lozovei AL, Teodoro U, Davies, CR. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. **Medical and Veterinary Entomology**. 15: 132-139. 2001.

Pinto MC, Barbieri K, Silva MCE, Graminha MAS, Casanova C, Andrade AJ, Eiras AE. Octenol as Attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the Field. **Journal of Medical Entomology**. 48: 39-44. 2011.

Pinto MC, Bray DP, Eiras AE, Carvalheira HP, Puertas CP. Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. **Parasites and Vectors**. 25:210. 2012

Peerzada N, Pakkiyaretnam T, Renaud S. Volatile Constituents of the Green Ant *Oecophylla smaragdina*. **Agricultural and Biological Chemistry**. 54: 3335-3336. 1990.

Ready PD. Biology of phlebotomine Sand Flies as a vector of disease agents. **Annual review entomology**. 58: 227-250. 2013

Sant'ana AL, Eiras AE, Cavalcante RR. Ecology behavior and bionomics Electroantennographic Responses of the *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) to 1-octen-3-ol. **Neotropical Entomology**. 31: 13-17.2002.

Schlein Y, Muller G: Assessment of plant tissue feeding by sandflies (Diptera: Psychodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Jounal of Medical Entomology**. 32:882–887.1995.

Soares RPP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 75: 301-330.2003

Spiegel CN, Oliveira SM, Brazil RP, Soares MJ: Structure and distribution of sensilla on maxillary palps and labella of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies. **Microscopy Research Technique**. 66:321–330. 2005.

Sutcliffe JF, Shemanchuk JA, McKeown DB: Preliminary survey of odours that attract the black fly, *Simulium arcticum* (Malloch)(IIS-10.11)(Diptera:Simuliidae) to its cattle hosts in the Athabasca region of Alberta. **Insect Science and Its Application**. 15:487–494. 1994

Takken W, Knols BGJ. Odor-mediated behavior of afrotropical malaria mosquitoes. **Annual Review of Entomology**. 44: 131-157. 1999.

Tava A, Pecetti L. Volatiles from *Medicago sativa* complex flowers. **Phytochemistry**. 45:1145-1148. 1997.

Torr, S. J., T. N. Mangwiro, and D. R. Hall. 2006. The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera: Glossinidae) and *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) to cattle. **Bulletin of Entomological Research**. 96: 71-84. 2006.

Viehweg SH., Schmitt RE., Schmidt-Lorenz W. Production of off-odours from poultry skin by bacterial isolates. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**. 22: 356 - 367. 1989.

Vitta AC, Bohman B, Unelius CR, Lorenzo MG: Behavioral and electrophysiological responses of *Triatoma brasiliensis* males to volatiles produced in the metasternal glands of females. **Journal of Chemical Ecology**. 35:1212–1221. 2009

WHO, 2012. Leishmaniasis.

Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso 17/09/2012.

Xue R, Dong L, Zhang S, Deng C, Liu T, Wang J, Shen X: Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**. 22:1181–1186. 2008

Yajima I., Sakakibara H., Ide J., Yanai T., Hayashi K. Volatile Flavor Components of Watermelon (*Citrullus vulgaris*). **Agricultural and Biological Chemistry**. 49: 3145-3150. 1985.

Young D.G.; Perkins P.V., Endris R.G. A larval diet for rearing phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, 18: 446. 1981.

7. Anexo

- Artigo publicado na revista Parasites & Vectors

SHORT REPORT

Open Access

A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae)

Jairo Torres Magalhães-Junior¹, Stella Maria Barrouin-Melo¹, Arlene Gonçalves Corrêa²,
Flavia Benini da Rocha Silva³, Vicente Estevam Machado³, José Silvio Govone⁴ and Mara Cristina Pinto^{3*}

Abstract

Background: The potential attraction from 1-octen-3-ol for sandflies has been documented; however, studies using other primary alcohols are limited.

Findings: We used a wind tunnel to compare the activation and attractive behaviors in male and female *Lutzomyia longipalpis* using 1-octen-3-ol and three additional alcohols, 1-octanol, 1-heptanol and 1-nonanol at three different concentrations: neat (100%) and diluted in hexane (10% and 50%). The compounds 1-octen-3-ol and 1-nonanol induced a clear concentration-dependent activation and attraction response in females. In males, 1-octen-3-ol, 1-nonanol and 1-heptanol yielded the same results.

Conclusions: *L. longipalpis* is attracted to 1-octen-3-ol, 1-nonanol and 1-heptanol, which are found in many plant volatiles.

Keywords: Sandflies, Phlebotomine, Kairomone, Octenol, Octanol, Heptanol, Nonanol, Attraction, Wind tunnel

Findings

Background

Volatile compounds used as haematophagous insect lures may improve the efficacy of traps for surveillance and control of disease vectors. For the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), which is the major *Leishmania infantum* vector in South America, previous investigations into attractive lures have focused on male pheromones [1] and kairomones [2].

The kairomone 1-octen-3-ol (hereafter octenol) is a volatile component of bovine [3] and human breath [4]. Its potential role as an attractant has been documented for different haematophagous insect species, such as mosquitoes [5] and tsetse flies [3]. For the New World sandfly species, octenol has previously been used with light traps and found to be relatively attractive to *Psathyromyia shannoni* (Dyar) (= *Lutzomyia shannoni*) [6] and, in a concentration-

dependent manner, to *Nyssomyia neivai* (Lutz & Neiva) (= *Lutzomyia intermedia*) [7]. For *L. longipalpis*, octenol elicited significant olfactory responses in electrophysiological experiments [8], but it showed a weak attractive response at 0.5 mg/h associated with light traps under field conditions [2].

Unlike octenol, studies on the potential attractiveness of other primary alcohols, namely, 1-octanol, 1-heptanol, 1-nonanol (hereafter, octanol, heptanol and nonanol), for haematophagous insects are limited. These alcohols were identified at small levels in incubated human sweat [9]. Only nonanol has been demonstrated as relatively attractive to *Aedes aegypti* (Linnaeus) compared with a control [10]. No studies have been reported on attractiveness of these alcohols to sandflies.

The aim of this study was to evaluate *L. longipalpis* male and female responses to octenol, octanol, heptanol and nonanol at different concentrations using the wind tunnel method.

* Correspondence: marap@fcar.unesp.br

³Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Methods

Insects

Sandflies were collected in Ipecaetá (12°18'00"S 39°18'28"W), Bahia State and kept in a colony at the Laboratory of Veterinary Infectious Diseases (Federal University of Bahia) for 18 generations. The insects were maintained in netting cages using standard methods with access to a 50% sucrose solution at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and 80–90% humidity. The sandfly species names are presented using the Galati classification system [11] followed by the corresponding Young and Duncan nomenclature [12] in brackets when cited for the first time.

Bioassay protocol in the wind tunnel

Each bioassay was performed from 9:00 to 19:00 in a transparent acrylic wind tunnel (length 200 cm, width 20 cm and height 20 cm) as previously described [13]. For each test, three male or female *L. longipalpis* were placed inside a releasing chamber for 30 min for acclimation before each test. The insects were 3–6 days old and received only sugar meal. Females had not received a blood meal. The chamber was then placed inside the wind tunnel 50 cm downwind from the odor source. Each trial was 2 min long, and we recorded the sandfly activation and attraction behaviors. The activation behavior was demonstrated through the number of sandflies that left the releasing chamber. The attraction behavior was demonstrated through the number of sandflies that reached the odor source. Thirty insect specimens were used for each concentration per compound.

The compounds used for the experiments were octenol, octanol, heptanol and nonanol (98.0%, Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) at three different concentrations: neat (100%) and diluted in hexane (10% and 50%). Each concentration was released by placing 200 μL onto filter paper (4×4 cm) in the wind tunnel entrance. The controls were 200 μL of hexane on filter paper (4×4 cm) before each trial.

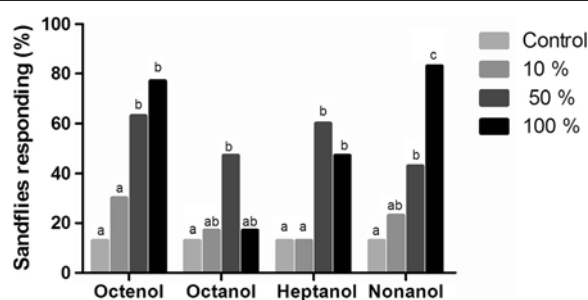


Figure 1 Activation of female *L. longipalpis*. Percentage of female *L. longipalpis* activated by octenol, octanol, heptanol and nonanol (three different concentrations) in the wind tunnel. Bars with different letters were significantly different in pairwise comparisons ($p < 0.05$).

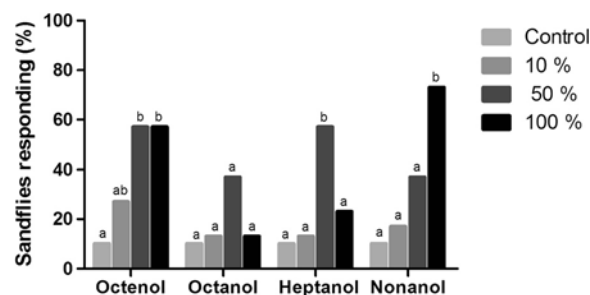


Figure 2 Attraction of female *L. longipalpis*. Percentage of female *L. longipalpis* attracted by octenol, octanol, heptanol and nonanol (three different concentrations) in the wind tunnel. Bars with different letters were significantly different in pairwise comparisons ($p < 0.05$).

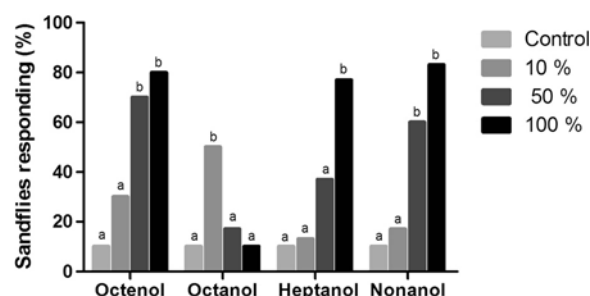
Statistical analysis

Chi square tests were used to evaluate the different proportions of males and females activated and attracted by each compound. Initially, the test was conducted for all four groups simultaneously. Thereafter, if a significant difference was verified, each of the two groups was compared separately. The statistical analyses were performed using BioEstat (version 5.0; Mamirauá/CNPq, Belém, PA, Brazil).

Results

Female responses

Octenol and nonanol induced a clear concentration-dependent activation and attraction response within the dosage range evaluated. For octenol, the activation and attraction responses were significantly different at the 50% concentration compared with the control ($p < 0.05$), but the 50% and 100% concentrations were not different ($p > 0.05$). For nonanol, the activation response was statistically different from the 50% concentration compared with the control; however, there was a significantly different attraction response only at the 100% concentration ($p < 0.05$) (Figures 1 and 2).



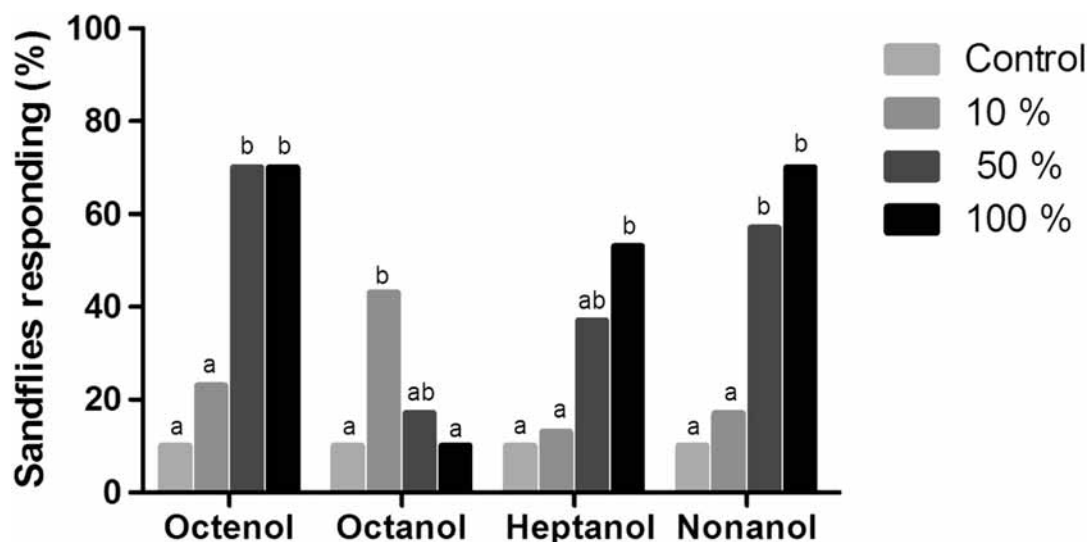


Figure 4 Attraction of male *L. longipalpis*. Percentage of male *L. longipalpis* attracted by octenol, octanol, heptanol and nonanol (three different concentrations) in the wind tunnel. Bars with different letters were significantly different in pairwise comparisons ($p < 0.05$).

The female activation and attraction response to octanol did not yield a concentration-dependent pattern. The only statistical difference detected was for activation at the 50% concentration compared with the control ($p < 0.05$).

For heptanol, the female activation responses were concentration-dependent; the 100% response was greater than at 50% compared with the control ($p < 0.05$). However, only the 50% concentration yielded a significantly different insect attraction response compared with the control ($p < 0.05$); the 100% concentration was not different from the control ($p > 0.05$).

Male responses

The male sandfly responses followed a similar pattern as the females for octenol, nonanol and heptanol (i.e., a concentration-dependent response).

For octanol, similar to the females, the males did not exhibit a concentration-dependent response; however, the only significant difference detected in the activation and

attraction response was at the 10% concentration compared with the control ($p < 0.05$). For heptanol, although the males presented the same pattern as the females, the best activation and attraction responses were at the highest concentration (100%) compared with the control ($p < 0.05$) (Figures 3 and 4).

Discussion

Our results show that in addition to octenol, other alcohols evoke sandfly responses and should also be investigated. Octenol and nonanol elicited the highest responses from *L. longipalpis* females, and octenol, heptanol and nonanol elicited the highest responses from males. Further, not all mosquito species respond equally to octenol [5], and whether different groups of alcohols would increase attractant activity for such species has been discussed [10]. However, a clear structure-activity relationship has not been demonstrated [14].

Octenol's role as a kairomone has been extensively evaluated in haematophagous insects because it is found

Table 1 Reports of haematophagous insect responses to octanol, heptanol and nonanol

Compounds	Sources of compounds	Insects	References
Experimental design responses			
1-octanol	Commercial (Aldrich)	<i>Simulium arcticum</i>	Sutcliffe et al. [18]
		Field Negative attractiveness	
1-heptanol	Metasternal glands of <i>Triatoma brasiliensis</i>	<i>Triatoma brasiliensis</i>	Vitta et al. [19]
		CG- EAD	
		No response	
1-nonanol	Volatiles from cattle headspace and urine	<i>Haematobia irritans</i> <i>Stomoxys calcitrans</i>	Birkett et al. [20]
		CG-EAG Positive response	

in different sources, such as bovine [3] and human breath [15]. Octenol's role in attracting sandflies is controversial, but our results showed a clear dose-dependent response with weak attractiveness at a low concentration (10%). These results may explain the poor results from *L. longipalpis* captures in the field when octenol was used at a low concentration (0.5 mg/h) [2].

Nevertheless, primary alcohols, such as octanol, heptanol and nonanol, have not been well-investigated for haematophagous insects, and this is the first report of such a study using sandflies. Such alcohols are not directly associated with vertebrate breath or skin odors, which may be the basis for the lack of interest in their potential role as an attractant for disease vectors. Nonetheless, those alcohols were detected at small levels in human sweat after incubation for 42-52 h, and nonanol presented the highest levels compared with octanol and heptanol [9]. Heptanol was also observed in chicken feather hydrolysate [16], which is relevant for sandflies because they are present at high levels in chicken sheds. Such bird shelters are the putative breeding sites for *L. longipalpis* [17]. The literature reports on haematophagous insect responses to octanol, heptanol and nonanol are summarized in Table 1 [18-20].

Floral volatiles are composed of various substances that have been shown to be attractive to mosquitoes [21]. The primary alcohols herein were identified in several mushrooms species [22] and other herbaceous plants [23]. From an environmental perspective, it is noteworthy that primary alcohols are in plants, which are generally sandfly feed sources. Both male and female sandflies require carbohydrates for energy, which are acquired through feeding directly on plant tissues in the field [24].

Herein, we observed similarities and distinctions between the insect sexes considering their biological responses to the primary alcohols evaluated. Although both males and females require plant sap to survive and specific variation in attraction to their constituent compounds is expected, it is difficult to explain such events through reports on morphological aspects. Differences were also observed in the number of sensilla on the second palpal segment in females (2-6) compared with males (1-2). However, an equal number of sensilla were observed in the third segment of the maxillary palps (Newstead's sensilla) for *L. longipalpis* males and females [25].

A dose-dependent response to octenol in female *L. longipalpis* was previously observed through electrophysiological recordings [8]. The female behavioral responses to octenol herein are consistent with such studies. Although no studies have investigated male electrophysiological responses to octenol, they were both activated and attracted in the wind tunnel.

Plant-specific emissions are important for attracting sandflies, and further studies with plant volatiles may be a potential approach to improve sandfly lures.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JMJ, SM, AC and MP conceived the study and drafted the manuscript. MJM, MP, FS and VM conducted the bioassay experiments. JG provided statistical analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação para o Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia-FAPESB (Programa de Apoio a Núcleos Emergentes-Pronem; Apoio à Formação e Articulação de Redes de Pesquisa no Estado da Bahia; and scholarship for MJM). MP received a grant from the International Foundation for Science (IFS) to build the wind tunnel.

Author details

¹Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinárias, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, 40170-000 Salvador, BA, Brazil. ²Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil. ³Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil. ⁴Departamento de Estatística Matemática Aplicada E Computação Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Geociências e Ciências Exatas de Rio Claro, v 24 A, 1515, Bela Vista, 13506-970 Rio Claro, SP, Brazil.

Received: 7 November 2013 Accepted: 31 January 2014

Published: 6 February 2014

References

- Bray D, Bandi K, Brazil R, Oliveira A, Hamilton J: Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. *J Med Entomol* 2009, **46**:428-434.
- Andrade AJ, Andrade MR, Dias ES, Pinto MC, Eiras AE: Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, **103**(4):337-343.
- Hall D, Beevor P, Cork A, Nesbitt B, Vale G: A potent olfactory stimulant and attractant for tsetse isolated from cattle odours. *Insect Sci Appl* 1984, **5**:335-339.
- Bernier UR, Kline DL, Barnard DR, Schreck CE, Yost RA: Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry: 2: identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Analyt Chem* 2000, **72**(4):747-756.
- Essen PV, Kemme J, Ritchie S, Kay B: Differential responses of *Aedes* and *Culex* mosquitoes to octenol or light in combination with carbon dioxide in Queensland, Australia. *Med Vet Entomol* 1994, **8**(1):63-67.
- Mann RS, Kaufman PE, Butler JF: *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) response to olfactory attractant and light emitting diode-modified Mosquito Magnet X (MM-X) traps. *J Med Entomol* 2009,

12. Young DG, Duran MA: **Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae).** In *DTIC Document*; 1994.
13. Pinto MC, Bray DP, Eiras AE, Carvalheira HP, Puertas CP: **Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector Nyssomyia neivai (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel.** *Parasit Vectors* 2012, **5**(1):210.
14. Cilek J, Ikediobi C, Hallmon C, Johnson R, Onyeozili E, Farah S, Mazu T, Latinwo L, Ayuk-Takem L, Bernier U: **Semi-field evaluation of several novel alkenol analogs of 1-octen-3-ol as attractants to adult aedes albopictus and culex quinquefasciatus.** *J Am Mosq Control Assoc* 2011, **27**(3):256–262.
15. Xue R, Dong L, Zhang S, Deng C, Liu T, Wang J, Shen X: **Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008, **22**(8):1181–1186.
16. DeMilo A, Lee CJ, Levi V, Moreno D: **Volatile components of a chicken feather hydrolystate that is highly attractive to the West Indian and Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae).** *J Entomol Sci* 1997, **32**:245–256.
17. Casanova C, Andrighetti MT, Sampaio SM, Marcoris ML, Colla-Jacques FE, Prado AP: **Larval breeding sites of lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern Brazil.** *PLoS Negl Trop Dis* 2013, **7**(9):e2443.
18. Sutcliffe JF, Shemanchuk JA, McKeown DB: **Preliminary survey of odours that attract the black fly, Simulium arcticum (Malloch)(IIS-10.11)(Diptera: Simuliidae) to its cattle hosts in the Athabasca region of Alberta.** *Insect Sci Appl* 1994, **15**(4):487–494.
19. Vitta AC, Bohman B, Unelius CR, Lorenzo MG: **Behavioral and electrophysiological responses of Triatoma brasiliensis males to volatiles produced in the metasternal glands of females.** *J Chem Ecol* 2009, **35**(10):1212–1221.
20. Birkett M, Agelopoulos N, Jensen K, Jespersen JB, Pickett J, Prijs H, Thomas G, Trapman J, Wadhams L, Woodcock C: **The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies.** *Med Vet Entomol* 2004, **18**(4):313–322.
21. Jhumur US, Dötterl S, Jürgens A: **Floral odors of Silene otites: their variability and attractiveness to mosquitoes.** *J Chem Ecol* 2008, **34**(1):14–25.
22. Jong S, Birmingham J: **Mushrooms as a source of natural flavor and aroma compounds.** In *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Edited by Chang ST, Chang ST, Buswell JA, Chiu SW. ; 1993:345–366.
23. Yang Y, Nan H, Wang G, Yang W, Xu J: **Comparative determination of the volatile components of prunella vulgaris L: from different geographical origins by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry.** *Anal Lett* 2013, **46**(13):2001–2016.
24. Schlein Y, Muller G: **Assessment of plant tissue feeding by sandflies (Diptera: Psychodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae).** *J Med Entomol* 1995, **32**(6):882–887.
25. Spiegel CN, Oliveira SM, Brazil RP, Soares MJ: **Structure and distribution of sensilla on maxillary palps and labella of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) sandflies.** *Microsc Res Tech* 2005, **66**(6):321–330.

doi:10.1186/1756-3305-7-60

Cite this article as: Magalhães-Junior et al.: A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *Parasites & Vectors* 2014 **7**:60.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Araraquara, 15 de janeiro de 2015.

De acordo,

Vicente Estevam Machado

Mara Cristina Pinto