

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia

Flávia Benini da Rocha Silva

Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com
***Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida:**
Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae)

Araraquara, SP
2018

Flávia Benini da Rocha Silva

**Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com
Leishmania (Viannia) braziliensis (Kinetoplastida:
Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Araraquara, SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S586i

Silva, Flavia Benini da Rocha

Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) / Flavia Benini da Rocha Silva. – Araraquara, 2018.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Parasitologia.

Orientadora: Mara Cristina Pinto.

Coorientador: Danilo Ciccone Miguel.

1. Flebotomíneos. 2. Cairomônios. 3. Leishmaniose. 4. Atratividade. 5. Volume de sangue. I. Pinto, Mara Cristina, orient. II. Miguel, Danilo Ciccone, coorient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440

CAPES: 40300005

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

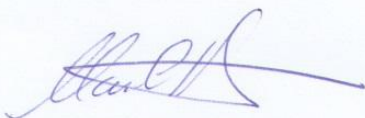
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae)

AUTORA: FLÁVIA BENINI DA ROCHA SILVA

ORIENTADORA: MARA CRISTINA PINTO

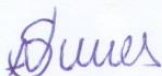
COORIENTADOR: DANILO CICCONE MIGUEL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: PARASITOLOGIA pela Comissão Examinadora:

A handwritten signature in blue ink, belonging to Mara Cristina Pinto, is positioned above her name and affiliation.

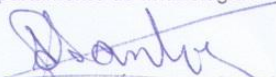
Profa. Dra. MARA CRISTINA PINTO

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

A handwritten signature in blue ink, belonging to Anderson de Sá Nunes, is positioned above his name and affiliation.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES

Departamento de Imunologia / Instituto de Ciências Biomédicas da USP

A handwritten signature in blue ink, belonging to André Gonzaga dos Santos, is positioned above his name and affiliation.

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 19 de janeiro de 2018

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, Cidinha e Marcelo, por sempre me apoiarem na minha caminhada e sempre me incentivarem a buscar meus objetivos.

À professora e orientadora Mara, essencial para a realização do trabalho. Obrigada pela dedicação, confiança, paciência, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao professor e coorientador Danilo Ciccone Miguel, pelo suporte durante a realização do trabalho.

Ao professor e parceiro Christiann Davis Tosta, por proporcionar a parceria com o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) de Matão, tornando possível a realização de parte importante do trabalho.

Aos grandes amigos do laboratório de flebs Thais, Vicente, Wanderson e Camila, por tornarem o laboratório o lugar mais divertido de todos. Obrigada por toda a ajuda e companheirismo.

Aos melhores amigos Estela, Fer, Jhan e Bia, por se tornarem minha segunda família e estarem sempre presentes me dando força ao longo dos anos juntos. Com certeza não seria a mesma coisa sem vocês.

Ao professor João Aristeu da Rosa e aos amigos de laboratório Aline, Ju, Lola, Lucas, Jader e Tiago, pelo conhecimento compartilhado e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo nº 2015/21100-9) e ao CNPq (Processo nº 134406/2015-0).

Muito obrigada!

RESUMO

SILVA, F. B. R. **Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae).** 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, transmitidos por insetos hematófagos denominados flebotomíneos. Dentre as espécies de flebotomíneos, *Nyssomyia neivai* está entre os principais transmissores do agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no estado de São Paulo, sendo incriminado como vetor da LTA também em outras áreas da América do Sul. Para localização dos hospedeiros e realização do repasto sanguíneo, os insetos hematófagos utilizam compostos voláteis emanados pelos mesmos, denominados cairomônios. Embora existam evidências de que a *Leishmania* possa influenciar a quantidade de sangue ingerida e a frequência de alimentação sanguínea dos flebotomíneos, aumentando a taxa de transmissão, não se sabe ao certo como o parasita pode afetar o comportamento dos insetos frente a hospedeiros infectados. O objetivo deste estudo foi investigar se camundongos BALB/c não infectados e infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresentam diferença na atratividade para *Ny. neivai*, e nos voláteis emitidos; além disso, buscou-se avaliar o volume de sangue ingerido por *Ny. neivai* nos camundongos infectados e não infectados. Para avaliação de uma possível diferença de atratividade dos flebotomíneos frente a hospedeiros infectados ou não, foram realizados três modelos de teste: (a) preferência alimentar dos flebotomíneos quando colocados dois camundongos na mesma gaiola e com auxílio do corante azul de Evans como marcador para ajudar na identificação da fonte de alimentação de cada flebotomíneo; (b) utilizando os camundongos como fonte de odor em túnel de vento e (c) em tubo em Y. Para os testes realizados em gaiolas, as fêmeas alimentadas foram individualizadas em microtubos, maceradas e homogeneizadas para leitura da absorbância a 540 e 620 nm. Tal leitura permitiu estimar o volume de sangue ingerido por cada fêmea, a partir de curvas analíticas de absorbância *versus* volume de sangue obtidas previamente após realização de ajustes nas diluições. Não houve diferença entre a ingestão de sangue para os dois grupos. Para os testes realizados em túnel de vento, nenhuma fêmea respondeu ao estímulo e para o tubo em Y houve uma resposta de ativação, porém não houve diferença significativa na atratividade dos flebotomíneos para camundongos infectados e não infectados. Para a identificação dos compostos voláteis presentes nos camundongos infectados e não infectados foi utilizada a técnica de microextração em fase sólida, utilizando-se como amostra 100 mg de pelos retirados da região dorsal de cada animal avaliado. Após padronização para seleção da fibra e tempo de extração, as amostras de pelos foram submetidas a uma temperatura de 90°C em *vials* de 20 mL lacrados e a extração foi realizada por 30 minutos com fibra revestida por polidimetilsiloxano/divinilbenzeno. Os compostos voláteis emitidos pelos camundongos infectados e não infectados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A partir dos resultados obtidos não houve diferença entre o perfil cromatográfico qualitativo de compostos voláteis dos dois grupos de animais, sendo identificados 38 dos 65 compostos voláteis presentes, com auxílio de bibliotecas de espectros de massas de compostos (NIST

08, NIST 98v101, Wiley MS 229 e FFNSC 1.3) e comparação dos índices de retenção.

Palavras-chave: Flebotomíneos. Cairomônios. Leishmaniose. Atratividade. Volume de sangue.

ABSTRACT

SILVA, F. B. R. **Study on attractiveness of infected host with *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae).** 2018. 80 f. Dissertation (Master degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

Leishmaniasis are zoonosis caused by flagellated protozoa of *Leishmania* genus, transmitted by hematophagous insects called sand flies. Among sand flies species, *Nyssomyia neivai* is one of the main vectors or etiological agent of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in the state of São Paulo, being incriminated as vector of ACL also in other areas of South America. For location of hosts and blood meal, hematophagous insects use volatiles compounds released by the hosts, called kairomones. Although there are evidences that *Leishmania* may influence the quantity of blood ingested and the frequency of blood meal of the sand flies, increasing transmission rate, it is not known how the parasite can affect the behaviour of these insects against infected hosts. The aim of this study was to investigate if uninfected and *Leishmania (Viannia) braziliensis* infected BALB/C mice presents any difference of attractiveness to *Ny. neivai*, and in the released volatiles; besides that, was evaluated the blood volume ingested by *Ny. neivai* on infected and uninfected mice. To evaluate the attractiveness of sand flies to infected and not infected hosts, three types of trials were performed: (a) food preference of sand flies when placed two anesthetized mice in the same cage and Evans blue dye as a marker to help identification of the blood meal source of each sand fly; (b) mice as odour source in wind tunnel and (c) in Y-tube olfactometer. For the trials in the cages, feed females were individualized in micro tubes, macerated and homogenized for absorbance reading at 540 and 620 nm. Such reading allowed estimate the blood volume ingested for each feed female, from standard curves of absorbance versus blood volume previously obtained after adjustments on dilutions. There was no difference on the blood ingested by insects from the two groups of mice. For the trials in wind tunnel, no females respond to stimulus and for the Y-tube olfactometer there was an activation response. However, there was no significant difference on attractiveness of sand flies to infected and uninfected mice. To identify volatiles presented by the two groups of animals was used solid phase micro extraction technique, with an amount of 100 mg of hair from dorsal region of each mouse. After standardization for selection of the fiber coating and time of extraction, the hair samples were submitted to a temperature of 90°C in 20 mL sealed vials and extraction was realized for 30 minutes with fiber coated with polydimethylsiloxane/divinylbenzene. Volatiles released by the infected and uninfected mice were evaluated by gas chromatography-linked mass spectrometry, and there was no difference on the chromatographic profile of volatiles released by the two groups of animals. Of 65 compounds obtained, 38 were identified by libraries (NIST 08, NIST 98v101, Wiley MS 229 and FFNSC 1.3) and retention index.

Keywords: Sand flies. Kairomones. Leishmaniasis. Attractiveness. Blood volume.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral de fibra para SPME.	18
Figura 2. Cronograma geral das etapas realizadas durante a execução experimental do estudo.....	22
Figura 3. (A) Fêmea ingurgitada e (B) macho de <i>Ny. neivai</i>	22
Figura 4. Pata posterior esquerda com edema observado no sítio de infecção por <i>L. (V.) braziliensis</i>	24
Figura 5. Camundongos injetados com corante azul de Evans e PBS.....	25
Figura 6. Esquema de túnel de vento utilizado em testes de atratividade em laboratório.	26
Figura 7. Tubo em Y com camundongo infectado (I) e não infectado (NI) testados simultaneamente em um mesmo sistema.	27
Figura 8. Conjuntos de tubo em Y com camundongos infectado (I) e não infectado (NI) testados simultaneamente de forma isolada com o ar como controle (C).	28
Figura 9. Diluição seriada para obtenção das curvas padrão. (A) sangue+PBS; (B) sangue+azul de Evans.	29
Figura 10. Fêmeas ingurgitadas de <i>Ny. neivai</i> : (A) sangue + corante azul de Evans; (B) sangue + PBS.....	30
Figura 11. Caixa de acrílico utilizada para a extração dos voláteis dos camundongos. Seta indica local de inserção das fibras para realização da extração.	32
Figura 12. Fibras de SPME utilizadas para padronização da extração dos voláteis dos camundongos. Da esquerda para a direita: DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB; CAR/PDMS e PA.....	33
Figura 13. Vial de <i>headspace</i> com pelos de camundongo sob aquecimento para extração dos voláteis.....	34
Figura 14. Vials de <i>headspace</i> aquecidos para extração dos voláteis dos diferentes grupos, da esquerda para a direita: branco, camundongo não infectado e camundongo infectado.	35
Figura 15. Evolução de lesão na pata posterior esquerda de camundongos Balb/C infectados com promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> . As barras representam o desvio padrão entre a média de cinco animais.....	37
Figura 16. Número de fêmeas atraídas por cada um dos camundongos apresentados individualmente no teste em tubo em Y.....	39
Figura 17. Curvas analíticas de absorbância versus volume de sangue: (A) sangue + PBS; (B) sangue + corante azul de Evans.	40
Figura 18. Volume de sangue ingerido por fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> ingurgitadas com sangue + PBS e com sangue + corante azul de Evans (EB) ($p=0,69$).	40
Figura 19. Estimativa do volume de sangue ingerido por fêmeas ingurgitadas com sangue + PBS e com sangue + corante azul de Evans (EB) para verificação das curvas padrão.....	41
Figura 20. Curvas analíticas de absorbância versus volume de sangue após ajuste da diluição: (A) sangue + PBS; (B) sangue + corante azul de Evans.....	42

Figura 21. Estimativa do volume de sangue ingerido por fêmeas ingurgitadas com sangue + PBS e com sangue + corante azul de Evans (EB) após o ajuste da diluição ($p = 0,0760$).....	43
Figura 22. Estimativa do volume de sangue ingerido por fêmeas ingurgitadas que se alimentaram em camundongos infectados e não infectados ($p = 0,8303$).	43
Figura 23. Cromatogramas obtidos nas extrações realizadas em caixa de acrílico e fibra DVB/CAR/PDMS por 90 min.	44
Figura 24. Número de picos totais obtidos para as diferentes fibras testadas.	45
Figura 25. (A) Número de picos totais e (B) área total dos picos para os diferentes tempos de extração.....	46
Figura 26. Cromatogramas obtidos para as três extrações realizadas: (A) controle negativo, (B) camundongo não infectado e (C) camundongo infectado. Picos identificados numerados, excluindo-se os contaminantes (*).	47
Figura 27. Análise de componentes principais (PCA) dos compostos voláteis identificados a partir das amostras de pelos de camundongos BALB/c não infectados e infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> . I1, I2 e I3: camundongos infectados; NI1, NI2 e NI3: camundongos não infectados.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos diferentes tipos de fibras de SPME utilizadas no presente estudo.....	18
Tabela 2. Número de fêmeas alimentadas em cada um dos camundongos quando injetado corante azul de Evans em camundongo não infectado (n=30) (p = 0,2462).	38
Tabela 3. Número de fêmeas alimentadas em cada um dos camundongos quando injetado corante azul de Evans em camundongo infectado (n=30) (p = 0,8541).....	38
Tabela 4. Valores de absorbância obtidos para as fêmeas não alimentadas (nos dois comprimentos de onda), fêmeas alimentadas em camundongo injetado com PBS e fêmeas alimentadas em camundongo injetado com corante azul de Evans.	41
Tabela 5. Valores de absorbância obtidos para as fêmeas não alimentadas (nos dois comprimentos de onda), fêmeas alimentadas em camundongo injetado com PBS e fêmeas alimentadas em camundongo injetado com corante azul de Evans após o ajuste da diluição.....	42
Tabela 6. Compostos tentativamente identificados, em ordem crescente de tempo de retenção (t_R), seus respectivos índices de retenção (IR) e área relativa média (AR). IR da literatura foram obtidos por meio da biblioteca online WebNIST.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Leishmanioses	12
1.2	Flebotomíneos	13
1.3	Cairomônios	14
1.4	Cairomônios em hospedeiros infectados	16
1.5	Microextração em fase sólida	17
1.6	Justificativa	20
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Flebotomíneos	22
3.2	Infecção dos camundongos	23
3.2.1	Confirmação da infecção	23
3.3	Avaliação da atratividade dos camundongos para flebotomíneos	24
3.3.1	Preferência alimentar	24
3.3.2	Alocados em túnel de vento	26
3.3.3	Alocados em tubo em Y	27
3.3.3.1	Camundongos apresentados simultaneamente	27
3.3.3.2	Camundongos apresentados isoladamente	27
3.4	Obtenção de curvas analíticas e estimativa do volume de sangue ingerido pelos insetos	28
3.4.1	Ajuste da diluição	30
3.4.2	Estimativa do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos	31
3.5	Identificação dos voláteis emitidos pelos animais	31
3.5.1	Caixa de acrílico	31
3.5.2	Padronização da metodologia de extração	32
3.5.2.1	Seleção da fibra de SPME	33
3.5.2.2	Tempo de extração	34
3.5.3	Extração dos voláteis por aquecimento	35
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
3.7	ÉTICA	36
4	RESULTADOS	37

4.1 Infecção dos camundongos	37
4.1.1 Confirmação da infecção	37
4.2 Avaliação da atratividade dos camundongos para flebotomíneos	37
4.2.1 Preferência alimentar	37
4.2.2 Alocados em túnel de vento	38
4.2.3 Alocados em tubo em Y	38
4.3 Obtenção de curvas analíticas e avaliação do volume de sangue ingerido pelos insetos	39
4.3.1 Ajuste da diluição	42
4.3.2 Estimativa do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos	43
4.4 Identificação dos voláteis emitidos pelos animais	44
4.4.1 Caixa de acrílico	44
4.4.2 Padronização da metodologia de extração	44
4.4.2.1 Seleção da fibra de SPME	44
4.4.2.2 Tempo de extração	45
4.4.3 Extração dos voláteis por aquecimento	46
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	55
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	64
APÊNDICE A – Parecer de aprovação da CEUA/FCF/CAR	64
APÊNDICE B – Cromatogramas obtidos para os diferentes revestimentos das fibras testadas durante a etapa de padronização da metodologia de extração dos compostos voláteis. (A) PA; (B) CAR/PDMS; (C) DVB/CAR/PDMS; (D) PDMS/DVB.	65
APÊNDICE C – Cromatogramas obtidos para os diferentes tempos testados durante a etapa de padronização da metodologia de extração dos compostos voláteis com fibra revestida por PDMS/DVB. (A) 18 minutos; (B) 30 minutos; (C) 40 minutos.	67
APÊNDICE D – Cromatogramas obtidos na diferentes réplicas para as três amostras. (A) controle negativo; (B) e (C) camundongo não infectado; (D) e (E) camundongo infectado.	68
APÊNDICE E – Estruturas moleculares dos compostos voláteis identificados e comparação dos espectros de massas dos compostos (superiores) com as	

bibliotecas utilizadas (inferiores). Porcentagens indicam o grau de similaridade dos compostos e os contaminantes identificados encontram-se sinalizados (*). 70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que são divididos nos subgêneros *Leishmania* Saf'Janova, 1982, *Viannia* Lainson & Shaw, 1987, *Sauroleishmania* Ranque, 1973 e *Mundinia* n. subgen. Shaw, Camargo & Teixeira, 2016 (WHO, 2017; ESPINOSA et al., 2016). Dentre tais subgêneros, apenas os parasitas dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e uma espécie de *Mundinia*, na Tailândia, são capazes de infectar os seres humanos (AKHOUNDI et al., 2016; STEVERDING, 2017).

Apesar das leishmanioses causarem manifestações patológicas relevantes para o ser humano, o mesmo não apresenta importância na manutenção do ciclo do parasita na natureza, uma vez que é considerado um hospedeiro acidental (CONTIJO & DE CARVALHO, 2003), com exceção de infecções por *Leishmania (Leishmania) donovani* Laveran & Mesrui, 1903 no subcontinente indiano, para as quais não se conhecia nenhum reservatório silvestre ou doméstico (LAINSON, 1988; URANW et al., 2013). Estudos recentes tem demonstrado uma alteração nesse perfil, com uma pequena taxa de animais infectados por *L. (L.) donovani* na Índia, tais como cabras (SINGH et al., 2013) e cães domésticos (JAMBULINGAM et al., 2017).

Clinicamente, as leishmanioses se apresentam como: visceral e tegumentar. Endêmicas em 97 países e distribuídas mundialmente, as leishmanioses são consideradas doenças tropicais negligenciadas e estimam-se cerca de 50 a 90 mil novos casos na forma visceral e 0,6 a 1 milhão na forma tegumentar por ano, com um bilhão de pessoas vivendo em áreas com risco de transmissão (WHO, 2017).

Apesar de estar amplamente distribuída pelo mundo, aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral estão concentrados em seis países (Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil) e quase 75% dos casos de leishmaniose cutânea estão concentrados em apenas 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Sudão, Peru e Síria (ALVAR et al., 2012).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) pode manifestar-se de três formas: cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. Acomete principalmente a pele,

mucosas e cartilagens, podendo produzir deformidades e apresentar impactos nos campos social e econômico devido ao seu envolvimento psicológico (BRASIL, 2007).

No Brasil, observou-se um aumento no número de casos de LTA registrados a partir da década de 80, quando passou a ser considerada de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde, além de uma expansão com a confirmação de casos autóctones em todos os estados do país a partir do ano de 2003, tendo como principal agente etiológico a *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 (BRASIL, 2007).

No período entre 1990 e 2016 foram registrados 687.780 casos de LTA, com oscilações ao longo dos anos e uma média de 25.473 casos anuais e com 12.690 casos no ano de 2016 (BRASIL, 2017).

As leishmanioses são transmitidas por insetos hematófagos denominados flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).

1.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos de pequeno porte (2-3 mm de comprimento), apresentam o corpo recoberto por cerdas, são holometábolos e além de utilizarem carboidratos como fonte de energia, as fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para maturação de seus ovos (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Durante o repasto sanguíneo, a saliva dos flebotomíneos gera uma grande reação inflamatória, tornando suas picadas um fator de incômodo, principalmente em áreas endêmicas, além de ser capaz de causar uma exacerbação na infecção por *Leishmania* (SACKS; KAMHAWI, 2001; ABDELADHIM et al., 2014).

A quantidade de sangue ingerida durante o repasto sanguíneo é capaz de determinar diferentes fatores importantes para a sobrevivência dos insetos, tais como número de ovos produzidos, frequência da busca por um hospedeiro e da quantidade de picadas, além de influenciar na quantidade que determinados patógenos podem ser adquiridos a partir de um hospedeiro infectado (BRIEGEL et. al., 1979).

Atualmente, existem quase 1.000 espécies de flebotomíneos descritas no mundo, das quais 530 ocorrem nas Américas e aproximadamente 20 espécies são consideradas como vetores das leishmanioses no Novo Mundo (BRAZIL et al., 2015; SHIMABUKURO et al., 2017).

Dentre as espécies de flebotomíneos, *Nyssomyia neivai* Pinto, 1926 está entre os principais transmissores da LTA no estado de São Paulo, podendo ser encontrado em 42 municípios do estado, dos quais 93% apresentam casos notificados da doença (SHIMABUKURO et al., 2010). Além de estar presente na região de Araraquara (MARCONDES et al., 1998; ANDRADE FILHO et al., 2007; PINTO et al., 2011), *Ny. neivai* já foi encontrado naturalmente infectado por *Leishmania (Viannia)* spp no Brasil (MARCONDES et al., 2009; PITA-PEREIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011) e tem sido incriminado como vetor da LTA nas Américas do Sul e Central (READY, 2013; BRAZIL et al., 2015).

Além de ter se mostrado susceptível à infecção por *L. (V.) braziliensis*, reafirmando seu papel como vetor da LTA (DINIZ et al., 2014), o comportamento alimentar oportunista das fêmeas de *Ny. neivai* demonstra a sua importância no ciclo de transmissão da doença, principalmente em áreas peridomiciliares em que estão presentes possíveis reservatórios do parasita (DIAS-SVERSUTTI et al., 2007; MARASSÁ et al., 2013).

1.3 Cairomônios

A ecologia química é responsável pelo estudo das interações mediadas por compostos químicos, sejam elas intra ou interespecíficas. Tais substâncias responsáveis por essas interações são denominadas semioquímicos, que são subdivididos em feromônios (intraespecíficos) e aleloquímicos (interespecíficos) (ZARBIN et al., 2009).

Dentre os aleloquímicos, os cairomônios são compostos voláteis liberados por um organismo que desencadeiam uma resposta benéfica para organismos de outra espécie (PITTS et al., 2014). No caso dos insetos hematófagos, esses voláteis são utilizados para sinalizar a presença dos hospedeiros (HAMILTON, 2008). O desenvolvimento de iscas atrativas utilizando os compostos identificados pode ter aplicação no monitoramento e/ou controle desses insetos, principalmente em áreas endêmicas da doença onde estão presentes os vetores em maior densidade (LOGAN; BIRKETT, 2007).

A partir da identificação de cairomônios, tais compostos podem ser testados em aparatos utilizados para mensurar a atratividade de insetos, tais como os olfatômetros e túneis de vento. Nesses aparatos, a fonte de estímulo é colocada distante do inseto e, geralmente, há a presença de fluxo de ar que direciona os

voláteis para o inseto (OMRANI et al., 2010). Nesse tipo de experimento, no caso de insetos hematófagos, avalia-se a preferência dos insetos por voláteis dos hospedeiros e infere-se, indiretamente, que houve uma escolha para a hematofagia. Entretanto, quando o objetivo é avaliar, em hospedeiros colocados lado a lado em um mesmo ambiente, se além da escolha pelos voláteis, haverá a efetivação do processo hematofágico é uma maneira de diferenciar a fonte de alimentação de cada inseto.

Dentro dessa perspectiva, MACIEL et al. (2014) padronizaram e validaram uma metodologia para *Aedes aegypti* onde um dos animais é inoculado intravenosamente com corante Azul de Evans para discriminação da alimentação sanguínea em animais de laboratório, quando estes são colocados no mesmo ambiente. O corante se liga à albumina plasmática de maneira irreversível tornando possível diferenciar visualmente a fonte de alimentação de cada inseto.

Além de permitir a distinção da fonte de alimentação, o corante não interfere na atratividade dos insetos, contribuindo para avaliar a eficácia de repelentes ou de atrativos. No presente trabalho, foi utilizada a mesma técnica de MACIEL et al. (2014) com adaptações para flebotomíneos.

Com relação aos trabalhos envolvendo cairomônios para flebotomíneos, são focados principalmente: CO₂, ácido láctico e 1-octen-3-ol, seja em estudos de campo ou em testes de atratividade em laboratório.

A atratividade dos flebotomíneos ao CO₂ está diretamente relacionada ao tamanho dos hospedeiros. Quando avaliados hospedeiros de diferentes tamanhos, foi observada uma maior atratividade de hospedeiros de maior tamanho para *Lu. longipalpis* (QUINNELL et al., 1992) e *Phlebotomus duboscqi* (KASILI et al., 2009).

Quando comparada a atratividade do CO₂ com a do ser humano em situação de campo para *Ny. whitmani* e *Ny. intermedia*, o CO₂ foi capaz de atrair um número equivalente a aproximadamente 50% dos insetos que foram atraídos pelo ser humano (PINTO et al., 2001).

Para *Ph. papatasi*, o CO₂ demonstrou ser mais atrativo do que o octenol para coletas realizadas em campo (BEAVERS et al., 2004), principalmente quando associado a luz ultravioleta (MÜLLER et al., 2015).

O octenol é um cairomônio que apresenta uma boa taxa de atratividade para *Lu. longipalpis* e *Ny. neivai*, tanto em campo (ANDRADE et al., 2008; PINTO et al., 2011) quanto em testes em laboratório com túnel de vento (PINTO et al., 2012;

MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014b), sendo observada uma resposta dose-dependente de tal composto.

Já para o ácido láctico, foram obtidas respostas de atratividade muito baixas para *Lu. longipalpis* em campo (ANDRADE et al., 2008) e para *Ny. neivai* em testes realizados em túnel de vento (PINTO et al., 2012).

1.4 Cairomônios em hospedeiros infectados

Alguns estudos têm mostrado que hospedeiros infectados por parasitas podem liberar compostos diferentes daqueles não infectados, influenciando assim na atratividade de tais hospedeiros para insetos hematófagos. Diferentes espécies de culicídeos transmissores da malária apresentaram uma maior atração por hospedeiros contaminados com *Plasmodium* spp (LACROIX et al., 2005; CORNET et al., 2013a; BATISTA et al., 2014; DE MORAES et al., 2014).

DE MORAES et al. (2014) também identificaram cinco compostos presentes em maior quantidade (ácido hexanóico, 2-fenil-etanol, ácido 2-metil butanoico, ácido 3-metil butanoico e tridecano) e um composto presente em menor quantidade (benzotiazol) em camundongos na fase crônica de infecção por *Plasmodium chabaudii*, agente etiológico da malária em roedores. Quando avaliada a atração de *Anopheles stephensi* frente a esses compostos, somente o 2-fenil-etanol não gerou um aumento da resposta dos insetos. Em contrapartida, o benzotiazol gerou uma redução na resposta dos insetos.

Além da diferença dos voláteis presentes em camundongos infectados e não infectados, também foi constatado que a presença de gametócitos no hospedeiro infectado também é capaz de aumentar a atratividade desses hospedeiros (LACROIX et al., 2005; BATISTA et al., 2014; DE MORAES et al., 2014).

Para flebotomíneos, embora existam evidências de que a *Leishmania* possa manipular a quantidade de sangue ingerida e a frequência de alimentação sanguínea dos insetos, aumentando a taxa de transmissão (ROGERS; BATES, 2007; ROGERS, 2012), não se sabe ao certo se, ou como, a *Leishmania* pode afetar o comportamento dos insetos frente a hospedeiros contaminados.

Ao avaliar a resposta de *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor do agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas do Sul e Central, frente a

hospedeiros infectados ou não por *Leishmania infantum chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas, sugere-se que a maior atração do inseto pelo hospedeiro contaminado ocorra devido a uma alteração dos odores do hospedeiro mediada pelo parasita (O'SHEA et al., 2002), porém não foram identificados os compostos que poderiam estar envolvidos nessa maior atratividade.

Em um estudo recente, foi avaliada a atração de *Lu. longipalpis* frente aos odores extraídos de hamsters antes da infecção e após um período de latência de infecção por *L. infantum chagasi*. Em tais testes realizados em tubo em Y (um dos tipos de olfatômetros), os flebotomíneos apresentaram uma preferência pelos odores extraídos dos hamsters após as manifestações clínicas da doença, reforçando a presença de uma maior atratividade de hospedeiros infectados (NEVATTE et al., 2017).

Quando avaliados os compostos voláteis presentes em amostras de pelos de cães infectados ou não por *L. infantum chagasi*, foram identificados seis compostos que podem ser considerados como potenciais biomarcadores de infecção pelo parasita: octanal, nonanal, β -hidroxietil fenil éter, decanal, heptadecano e 2-etil-hexil salicilato (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014a).

1.5 Microextração em fase sólida

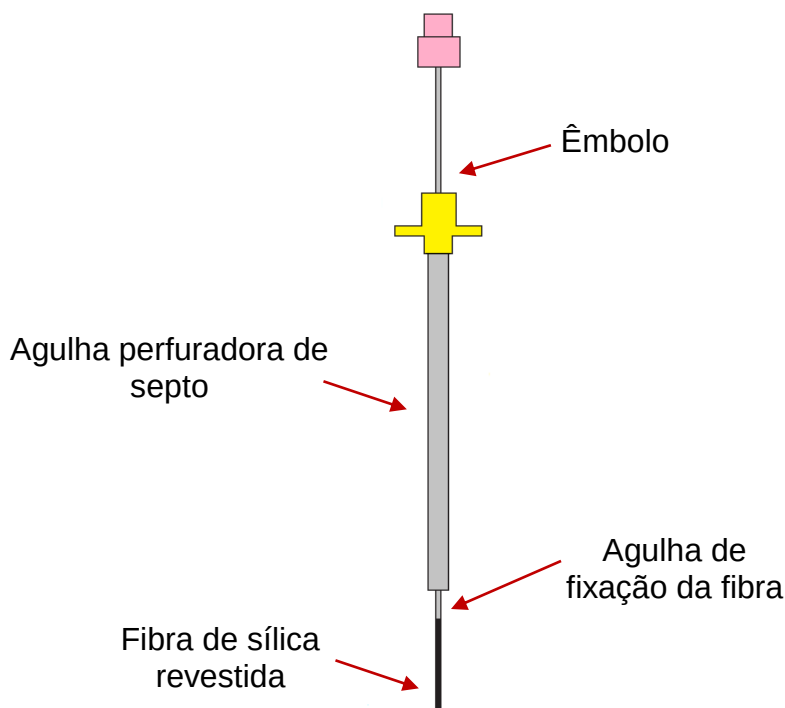
O sistema de microextração em fase sólida (Solid Phase Microextraction – SPME) para o preparo de amostras foi desenvolvido inicialmente para a determinação de poluentes do ar atmosférico (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990). O princípio da técnica baseia-se na adsorção de voláteis em polímeros específicos e a posterior dessorção desses compostos para análise química.

Além de não envolver o uso de solventes para extração das amostras voláteis, o sistema de SPME reduz o tempo de preparação das amostras e aumenta a sensibilidade das análises, sendo associado principalmente a detectores de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) (ZHANG; LI, 2010) para posterior separação e identificação dos analitos.

A técnica de SPME é realizada por meio de uma fibra de sílica protegida por um tubo hipodérmico e presa a um êmbolo (Figura 1). A fibra de sílica é responsável por adsorver os compostos voláteis presentes na amostra, sendo exposta somente no momento da extração da amostra e da injeção no cromatógrafo para análise (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Os compostos da amostra a ser analisada podem ser extraídos por meio de extração direta ou *headspace* (mais utilizada). Na extração direta a fibra é colocada em contato direto com a amostra e na extração por *headspace* os voláteis são extraídos do espaço existente entre a amostra e o local onde a fibra é inserida (PAWLISZYN, 2012).

Figura 1. Esquema geral de fibra para SPME.



Adaptado de: SHIREY RE, 2012. SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. In: PAWLISZYN J. Handbook of Solid Phase Microextraction. Elsevier. 4: 99-133.

As fibras de SPME disponíveis comercialmente podem apresentar diferentes tipos de revestimentos da fibra de sílica, cada um com diferentes características (Tabela 1) (SHIREY, 2012; SUPELCO INC., 2017a).

Tabela 1. Características dos diferentes tipos de fibras de SPME utilizadas no presente estudo.

Revestimento	Espessura	Polaridade	Temperatura de dessorção recomendada (°C)
CAR/PDMS	85 µm	bipolar	250 – 310
PDMS/DVB	65 µm	bipolar	200 – 270
PA	85 µm	polar	220 – 300
DVB/CAR/PDMS	50/30 µm	bipolar	230 – 270

CAR: Carboxen™; PDMS: polidimetilsiloxano; DVB: divinilbenzeno; PA: poliacrilato.

Além dos revestimentos da Tabela 1, também estão disponíveis comercialmente fibras revestidas por CAR/PDMS (75 µm), PDMS (7, 30 e 100 µm), PDMS/DVB (60 µm), PEG (60 µm).

Quando o perfil da amostra a ser analisada é desconhecido, diferentes tipos de fibras devem ser avaliadas para encontrar a mais eficiente na extração dos voláteis de tal amostra, uma vez que cada um dos revestimentos irá ser mais compatível com determinadas classes de compostos químicos (SUPELCO INC., 2017b).

Com a expansão do uso da técnica de SPME, podem ser obtidas amostras de compostos voláteis de produtos naturais (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2007), de cães (DE OLIVEIRA et al., 2008; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014a), de urina de camundongos (KWAK et al., 2009) e até mesmo de seres humanos (GALLAGHER et al., 2008; DORMONT et al., 2013).

Para insetos hematófagos, a técnica de SPME já foi empregada para a identificação de compostos presentes nas fezes de *Cimex lectularius* (OLSON et al., 2015), em glândulas de *Triatoma dimidiata* (MAY-CONCHA et al., 2015) e de *Triatoma infestans* (GONZÁLEZ AUDINO et al., 2006).

Em outras classes de insetos, a SPME foi utilizada principalmente para avaliação de voláteis de pragas agrícolas, tais como para a análise química da secreção adesiva de *Nicrophorus vespilloides*, *Nicrophorus nepalensis*, *Sagra femorata* e *Gromphadorhina portentosa* (GERHARDT et al., 2016) e de *Schistocerca gregaria* (REITZ et al., 2015), identificação de feromônios sexuais de *Ancistrotermes dimorphus* (WEN et al., 2015) e de *Eurytoma amygdali* (MAZOMENOS et al., 2004), feromônio de agregação de *Diocalandra frumenti* (VACAS et al., 2016) e de feromônio de *Heliothis virescens* e *Heliothis subflexa* (LIEVERS; GROOT, 2016).

1.6 Justificativa

Como salientado anteriormente, para culicídeos, transmissores de *Plasmodium* spp, os dados de literatura apontam para uma maior atratividade dos hospedeiros infectados. Para os flebotomíneos e *Leishmania* spp, somente três artigos tratam desse assunto: dois com hamsters infectados e outro com pelos de cães infectados ou não.

No entanto, tais trabalhos envolvendo flebotomíneos e hospedeiros infectados foram realizados com *Lu. longipalpis* e *L. infantum chagasi*, que são o vetor e o agente etiológico da leishmaniose visceral, não havendo portanto nenhum conhecimento a respeito da atratividade de hospedeiros infectados por nenhum dos agentes etiológicos da LTA.

Além da pequena quantidade de estudos sobre o tema, apenas o trabalho realizado com pelos de cães infectados ou não identificou os voláteis emitidos pelos diferentes grupos de cães, conseguindo inclusive identificar um determinado grupo de biomarcadores de infecção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Investigar diferenças na atratividade de camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. (V.) braziliensis* para fêmeas de *Ny. neivai*.

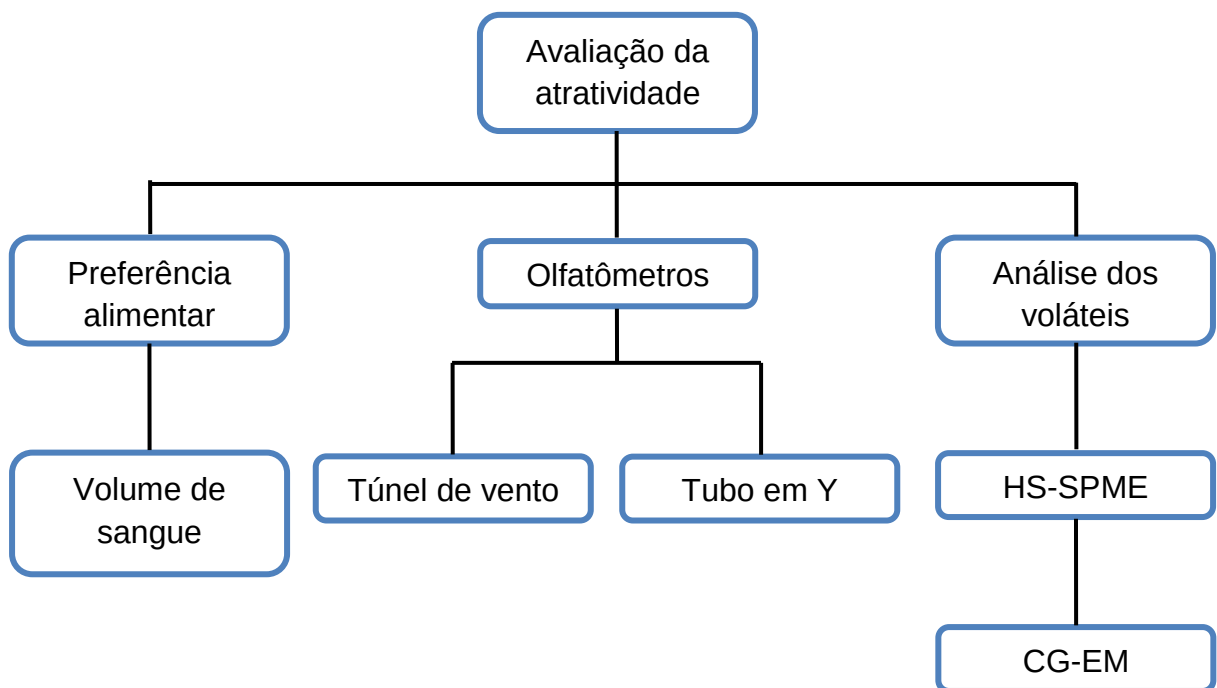
2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar possíveis diferenças nos volumes de sangue ingerido por *Ny. neivai* nos camundongos não infectados e infectados.
- ✓ Identificar por CG-EM os voláteis presentes em camundongos não infectados e infectados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em diferentes etapas para a verificação da atratividade de hospedeiros infectados ou não para *Ny. neivai* e para a análise dos compostos voláteis emitidos pelos animais infectados e não infectados, conforme esquematizado abaixo (Figura 2).

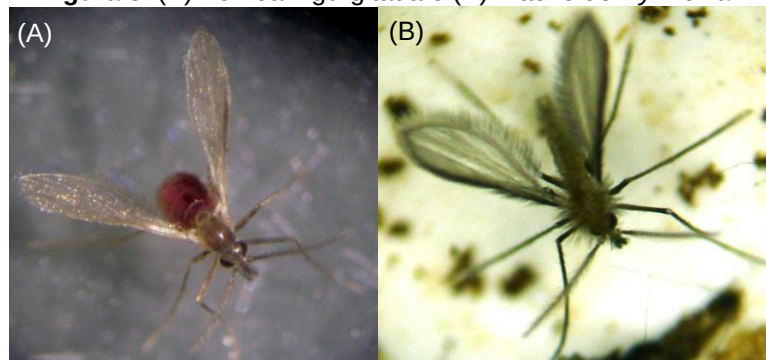
Figura 2. Cronograma geral das etapas realizadas durante a execução experimental do estudo.



3.1 Flebotomíneos

Os flebotomíneos utilizados nos testes foram coletados previamente por meio de captura manual em área com predominância de *Ny. neivai* (PINTO et al., 2011) e são mantidos em laboratório de acordo com metodologia estabelecida por GOULART et al. (2015; 2017a).

Figura 3. (A) Fêmea ingurgitada e (B) macho de *Ny. neivai*.



Fonte: Thais Marchi Goulart.

3.2 Infecção dos camundongos

A cepa de *L. (V.) braziliensis* – MHOM/BR/94/H3227, isolada de um paciente cearense com leishmaniose cutânea, foi gentilmente cedida pelas Dra. Maria Jânia Teixeira (UFC) e Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana (USP).

Tal cepa vem sendo mantida no Laboratório de Estudos de Biologia da Infecção por Leishmania (LEBIL) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelo Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel, conforme descrito em MIGUEL et al. (2007), para utilização em infecções experimentais de camundongos.

Para inoculação dos parasitas, 10 µL de solução salina contendo 1×10^5 promastigotas de fase estacionária foram injetados subcutaneamente na pata posterior de camundongos BALB/c fêmeas (ZAULI et al., 2012; CARREGARO et al., 2013).

Os camundongos foram infectados no laboratório do Dr. Danilo Ciccone Miguel e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/UNESP) e para a realização dos testes foram anestesiados via intramuscular de acordo com o peso de cada animal, sendo a dose composta por ketamina 10% ($0,001 \text{ mL g}^{-1}$) + xilazina 2% ($0,00025 \text{ mL g}^{-1}$) (ERHARDT et al., 1984).

3.2.1 Confirmação da infecção

Os animais foram utilizados nos experimentos após um período para o qual é observado edema no sítio da infecção (Figura 4). Para confirmação da infecção previamente à utilização dos animais, o edema pode ser medido com auxílio de um paquímetro e tal medição comparada ao tamanho da pata medido em um camundongo sem infecção. Tal medição foi realizada ao longo de nove semanas após a infecção dos animais.

Figura 4. Pata posterior esquerda com edema observado no sítio de infecção por *L. (V.) braziliensis*.



Fonte: Danilo Ciccone Miguel.

Após a realização dos testes, a confirmação da infecção dos animais pode ser realizada por meio da reobtenção do parasita do sítio da infecção.

Os camundongos utilizados nos testes foram eutanasiados e tiveram as patas que foram previamente infectadas borrifadas com álcool iodado. Após assepsia, as patas foram isoladas por excisão com tesoura e a área da lesão raspada com lâmina de bisturi em placa de petri. Após a separação da pele, o tecido foi isolado e transferido com pipeta Pasteur estéril para frasco de cultura contendo M199 completo (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 5% de urina masculina humana estéril, além de 1% penicilina/estreptomicina (100 U mL^{-1} penicilina e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ estreptomicina) e gentamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

As culturas foram mantidas a 26°C para observação diária em microscópio invertido e visualização de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

3.3 Avaliação da atratividade dos camundongos para flebotomíneos

3.3.1 Preferência alimentar

Tendo em vista que os dois camundongos, não infectado e infectado, foram colocados simultaneamente em uma gaiola de *voil* para alimentação das fêmeas, foi utilizado como marcador para diferenciação da fonte de alimentação de cada fêmea o corante azul de Evans. Tal metodologia foi baseada em testes padronizados por MACIEL et al. (2014), na qual os camundongos, com e sem repelente, estavam na mesma gaiola e foram expostos aos mesmos culicídeos para observação de uma possível repelência.

Inicialmente, o corante foi diluído em solução de tampão PBS em uma proporção de 20 mg mL^{-1} , de tal forma que ao injetar no animal o corante correspondesse a uma dose de 200 mg kg^{-1} . Dessa maneira, para cada grama de peso do camundongo eram injetados $0,01 \text{ mL}$ da solução de corante diluído em PBS.

Primeiramente, dois camundongos (um infectado e um não infectado) foram anestesiados conforme descrito anteriormente. Em seguida foram injetados intravenosamente pelo plexo orbital tampão PBS puro em um camundongo infectado e corante azul de Evans diluído em tampão PBS em um camundongo não infectado. Os dois camundongos foram colocados dentro de uma gaiola de tecido *voil* ($30 \times 30 \times 30 \text{ cm}$) contendo 30 casais de flebotomíneos com idade entre 5-7 dias e sem alimentação sanguínea prévia, onde foram mantidos por uma hora para alimentação das fêmeas (Figura 5). Para evitar uma possível interferência do corante na atratividade, o mesmo processo foi repetido, porém com o camundongo infectado sendo injetado com o corante azul de Evans, de modo que os dois tratamentos (camundongo infectado ou não) recebessem o corante. Em cada uma das repetições foram utilizados camundongos e insetos diferentes.

Figura 5. Camundongos injetados com corante azul de Evans e PBS.



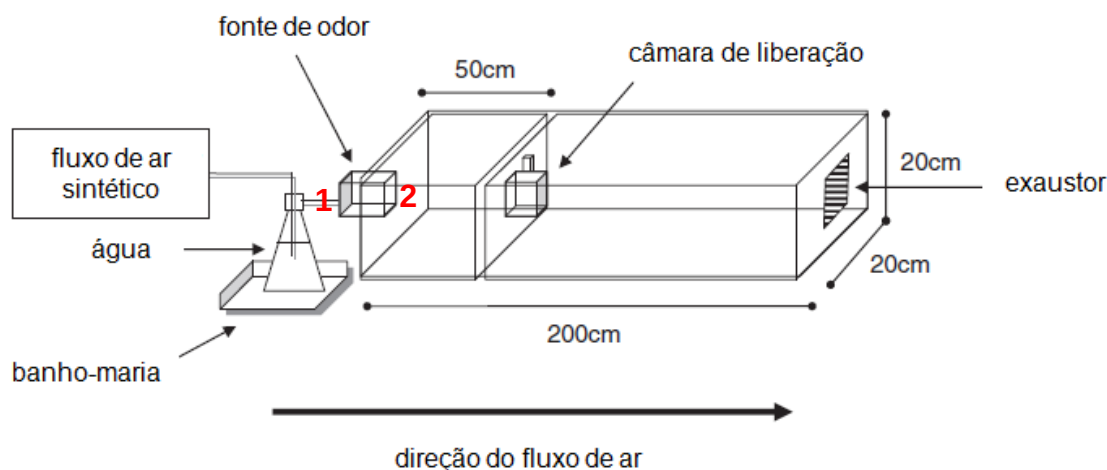
Fonte: autoria própria.

Após cada teste, os flebotomíneos foram retirados da gaiola e colocados em congelador para futura avaliação da quantidade de fêmeas alimentadas em cada um dos camundongos e estimativa do volume de sangue ingerido por cada fêmea alimentada (item 3.4).

3.3.2 Alocados em túnel de vento

Devido à baixa taxa de alimentação das fêmeas pela metodologia com auxílio do corante azul de Evans, foram realizados testes de atratividade complementares em túnel de vento (Figura 6).

Figura 6. Esquema de túnel de vento utilizado em testes de atratividade em laboratório.



Adaptado de: PINTO et al., 2012. Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. Números 1 e 2 representam as posições onde os camundongos foram colocados em cada um dos testes.

Para avaliação da atratividade das fêmeas, uma cuba de vidro foi conectada previamente ao túnel de vento (Figura 6 - posição 1). O camundongo infectado ou não infectado foi então inserido nessa cuba de vidro como fonte de estímulo para as fêmeas.

Em um segundo teste no túnel de vento, o camundongo infectado ou não infectado foi imobilizado e colocado em frente à saída de ar do túnel como fonte de estímulo (Figura 6 - posição 2).

Em ambos os testes, foram utilizadas 15 fêmeas para cada um dos camundongos e hexanol (composto sabidamente atrativo para as fêmeas) (MACHADO et al., 2015) como controle positivo da resposta das fêmeas, todos com fluxo de ar de $0,5 \text{ L min}^{-1}$.

Para tais testes, foram avaliadas as respostas de ativação e atração dos insetos. A ativação ocorre quando o inseto sai da gaiola de liberação e a atração quando o inseto chega até a fonte de liberação do odor.

3.3.3 Alocados em tubo em Y

3.3.3.1 Camundongos apresentados simultaneamente

Para o teste com o tubo em Y com camundongos apresentados simultaneamente, um camundongo infectado foi colocado em um dos lados do tubo e um camundongo não infectado foi colocado do outro lado como estímulo, com o tubo conectado ao sistema de ar sintético com fluxo de $1,5 \text{ L min}^{-1}$ (Figura 7). Foram utilizadas 40 fêmeas testadas individualmente e foram avaliadas as respostas de ativação e atração dos insetos.

Figura 7. Tubo em Y com camundongo infectado (I) e não infectado (NI) testados simultaneamente em um mesmo sistema.

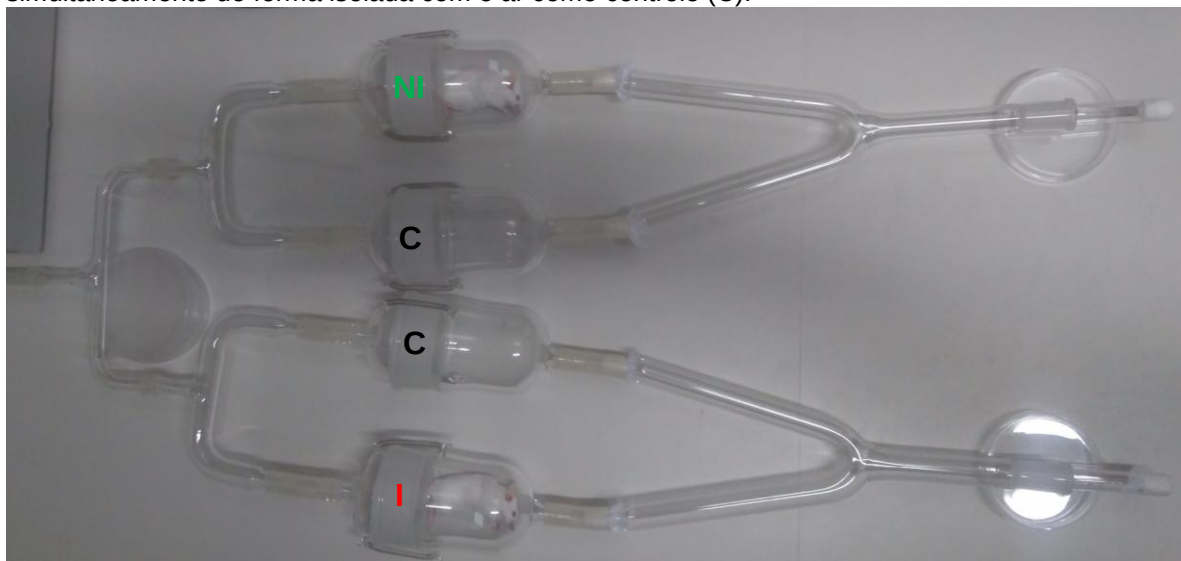


Fonte: autoria própria.

3.3.3.2 Camundongos apresentados isoladamente

Em um segundo momento, dois conjuntos de tubo em Y foram utilizados simultaneamente, porém, cada um deles continha um camundongo anestesiado de um dos lados como estímulo, com fluxo de ar de $2,0 \text{ L min}^{-1}$. O outro lado foi considerado controle, contendo apenas o fluxo de ar (Figura 8). Para cada um dos camundongos, foram testadas 90 fêmeas individualmente e foram avaliadas as respostas de ativação e atração dos insetos.

Figura 8. Conjuntos de tubo em Y com camundongos infectado (I) e não infectado (NI) testados simultaneamente de forma isolada com o ar como controle (C).



Fonte: autoria própria.

3.4 Obtenção de curvas analíticas e estimativa do volume de sangue ingerido pelos insetos

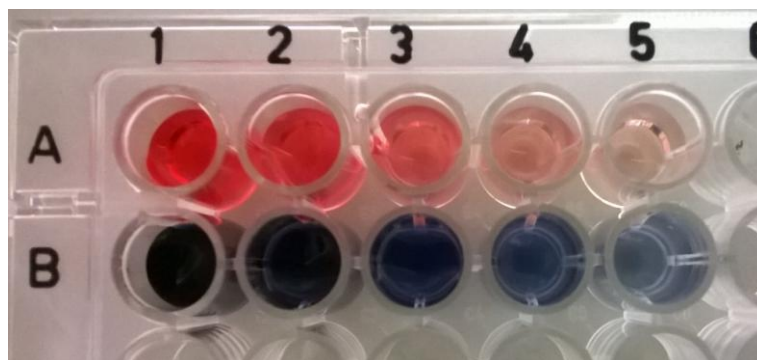
Para a obtenção das curvas padrão utilizadas para o cálculo do volume de sangue ingerido pelos insetos, foram utilizados dois camundongos, um injetado com uma solução de corante azul de Evans e outro injetado com tampão PBS.

De acordo com o peso do animal, foi injetado um volume da solução do corante diluído em PBS de tal forma que o mesmo ficasse em uma dose de 200mg kg^{-1} . Para o camundongo injetado com o tampão PBS, também foi injetado um valor proporcional ao peso, onde para cada grama de peso do camundongo foram injetados 0,01 mL de PBS.

Após 10 minutos das injeções, foram retirados através da veia caudal 20 μL de sangue de ambos os camundongos, que foram diluídos em 500 μL de H_2O deionizada cada um.

Com metade do volume de sangue diluído de cada camundongo foi realizada diluição seriada em H_2O deionizada (1:2) e 200 μL de cada diluição foram transferidos para uma placa de 96 poços para leitura da absorbância a 540 e 620 nm, comprimentos de onda em que se obtém as absorbâncias máximas da hemoglobina e do azul de Evans, respectivamente (Figura 9) (MACIEL et al., 2014).

Figura 9. Diluição seriada para obtenção das curvas padrão. (A) sangue+PBS; (B) sangue+azul de Evans.



Fonte: autoria própria.

A partir dos valores de absorbância obtidos, foram feitas duas curvas analíticas de absorbância *versus* volume de sangue, que foram utilizadas para estimar o volume de sangue ingerido pelos insetos.

Para a verificação da metodologia para estimar o volume de sangue ingerido pelos insetos, dois camundongos foram oferecidos a 30 fêmeas de *Ae. aegypti* para alimentação sanguínea, sendo um deles injetado com PBS e outro com o corante azul de Evans. Após o período de alimentação, os insetos foram colocados em congelador por 30 minutos e após esse tempo as fêmeas foram individualizadas em microtubos de 1,7 mL contendo 250 μ L de H₂O deionizada. Após maceração com pistão de plástico e homogeneização, 200 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços para leitura das absorbâncias.

O mesmo procedimento foi repetido com camundongos diferentes para a verificação da metodologia para os flebotomíneos.

Apesar de ser possível diferenciar visualmente por meio da coloração a fonte de alimentação dos flebotomíneos e a diferença de volume de sangue ingerido por eles (Figura 10A e B), para uma melhor discriminação foi realizada a leitura da absorbância dos poços da placa a 540 e 620 nm.

A partir dos valores de absorbância obtidos para cada um dos insetos, foi possível estimar o volume de sangue ingerido por cada um deles por meio das equações da reta de cada uma das curvas padrão.

Figura 10. Fêmeas ingurgitadas de *Ny. neivai*: (A) sangue + corante azul de Evans; (B) sangue + PBS.



Fonte: autoria própria.

3.4.1 Ajuste da diluição

Devido ao menor volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos com relação aos *Ae. aegypti*, utilizando-se da mesma diluição estabelecida por Maciel et al. (2014) não foi possível avaliar o volume de sangue ingerido pelos insetos, uma vez que a absorbância dos insetos que se alimentaram ficou muito próxima da absorbância basal medida a partir de insetos que não realizaram alimentação sanguínea.

A partir disso, foi realizado um ajuste da diluição, tanto para as curvas analíticas quanto para a avaliação do volume de sangue ingerido pelos insetos.

Para as curvas analíticas, um camundongo foi injetado com tampão PBS e outro camundongo foi injetado com o mesmo volume do corante azul de Evans diluído em tampão PBS, de acordo com o peso de cada animal (200mg kg^{-1}), conforme já descrito anteriormente (item 3.4). Após 10 minutos, foram retirados $10\text{ }\mu\text{L}$ de sangue de ambos os camundongos, que foram diluídos em $250\text{ }\mu\text{L}$ de H_2O deionizada cada um (metade do volume de sangue e de H_2O utilizados anteriormente).

Com metade do volume de sangue diluído de cada camundongo foi realizada diluição seriada em H_2O deionizada (1:2) e $100\text{ }\mu\text{L}$ de cada diluição foram transferidos para uma placa de 96 poços para leitura da absorbância a 540 e 620 nm.

Para a avaliação do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos, foram alimentados insetos de colônia em camundongos não infectados. Em uma gaiola foi inserido um camundongo injetado com PBS e em outra gaiola um

camundongo injetado com o corante diluído em PBS. Terminado o período de alimentação, cinco fêmeas não alimentadas e cinco fêmeas ingurgitadas de cada uma das gaiolas foram colocadas em congelador por 30 minutos e após esse período foram individualizadas em microtubos de 1,7 mL contendo 125 μ L de H₂O deionizada (metade do volume de H₂O utilizado anteriormente). Após maceração e homogeneização, 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços para leitura das absorbâncias a 540 e 620 nm.

3.4.2 Estimativa do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos

Para avaliação do volume de sangue ingerido por cada fêmea alimentada, depois de cada um dos testes de atratividade os insetos foram colocados em congelador por um período de 30 minutos e o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado (item 3.4.1).

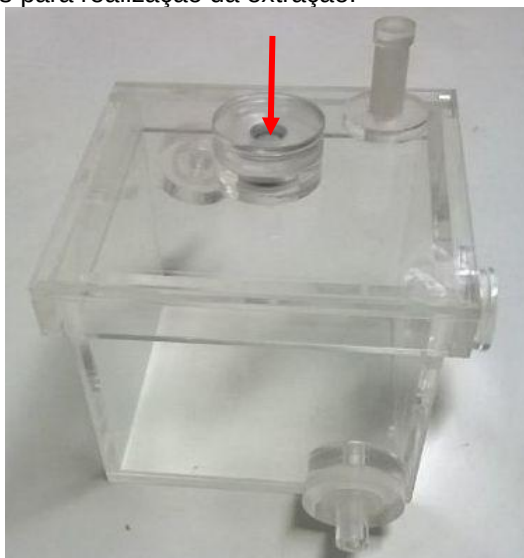
A partir dos valores de absorbância obtidos para cada um dos insetos, o volume de sangue ingerido por eles foi calculado a partir das equações das retas das curvas analíticas obtidas previamente.

3.5 Identificação dos voláteis emitidos pelos animais

3.5.1 Caixa de acrílico

Inicialmente foi realizado um teste piloto para avaliar os voláteis dos camundongos, onde foi utilizada uma caixa de acrílico fechada (10x10x10 cm) com apenas uma entrada para inserção das fibras de SPME (Stableflex™ - Supelco, Bellefonte, PA, USA) para adsorver os compostos voláteis presentes nesse espaço (Figura 11). Cada extração foi realizada com fibra de SPME revestida por DVB/CAR/PDMS, por um período de 90 minutos, e após a extração as fibras foram retraídas e retiradas do recipiente. Foram realizadas extrações de dois camundongos, sendo um infectado e um não infectado, e a caixa de acrílico vazia foi utilizada como controle negativo.

Figura 11. Caixa de acrílico utilizada para a extração dos voláteis dos camundongos. Seta indica local de inserção das fibras para realização da extração.



Fonte: autoria própria.

Todas as extrações foram realizadas dentro de uma estufa com termoperíodo e umidificação (ELETROLab EL212/4), a uma temperatura de 27 °C, para evitar possíveis contaminantes do ambiente externo à caixa de acrílico.

Após cada uma das extrações, as fibras foram inseridas no injetor do cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu GC-MS QP2010 Plus para dessorção dos voláteis por 5 minutos, com temperatura de injeção de 240 °C em modo *splitless* sob fluxo de gás de arraste (He 1 mL min⁻¹) e separados na coluna cromatográfica Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm).

Após a inserção da fibra no injetor do CG-EM, a temperatura da coluna foi programada da seguinte maneira: 70 °C por 2 minutos; 70-120 °C a 2 °C min⁻¹; 120 °C por 20 minutos; 120-250 °C a 4 °C min⁻¹ e 250 °C por 5 minutos. As temperaturas da fonte de íons e da interface foram ajustadas em 250 °C, com varredura de espectros de 40 a 600 m/z e impacto de ionização de 70 eV.

Todas as análises por CG-EM foram realizadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa Analítica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Câmpus Matão (IFSP Matão), em parceria com o Prof. Dr. Christiann Davis Tosta.

3.5.2 Padronização da metodologia de extração

Devido aos resultados obtidos nas extrações realizadas na caixa de acrílico, foi necessário buscar uma alternativa visando uma melhor metodologia para extração dos voláteis dos camundongos. Dessa maneira, a partir de amostras de

pelos de camundongos foi feita uma padronização da metodologia de extração baseada em estudos prévios realizados por MAGALHÃES-JUNIOR et al. (2014a) e TAVARES (2016) para obtenção dos voláteis.

Após cada uma das extrações realizadas nessa etapa de padronização, as fibras foram inseridas no injetor do cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu GC-MS QP2010 Plus para dessorção dos voláteis e análise sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas para a extração na caixa de acrílico (item 3.5.1).

3.5.2.1 Seleção da fibra de SPME

Primeiramente, foi realizada a seleção do melhor revestimento da fibra de SPME para extração dos voláteis dos camundongos. Para essa etapa, foram testadas as seguintes fibras de SPME: 50/30 µm divinilbenzeno/Carboxen[®]/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS – 24 Ga Gray), 65 µm polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB – 24 Ga Pink), 85 µm Carboxen[®]/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS – 24 Ga Lt. Blue) e 85 µm poliacrilato (PA – 24 Ga White).

Figura 12. Fibras de SPME utilizadas para padronização da extração dos voláteis dos camundongos. Da esquerda para a direita: DVB/CAR/PDMS; PDMS/DVB; CAR/PDMS e PA.

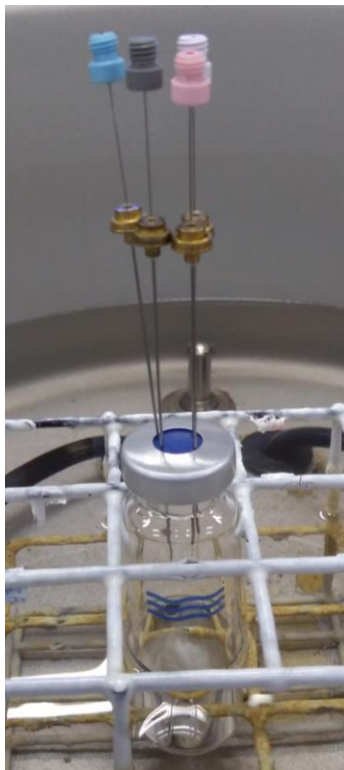


Fonte: autoria própria.

Para extração dos compostos voláteis, um camundongo foi previamente anestesiado e teve 100 mg de pelos retirados da região dorsal com auxílio de uma lâmina de barbear (Wilkinson Sword). Os pelos foram colocados em *vial* de 20 mL específico para *headspace*, que foi aquecido em banho de glicerina a 90 °C por um período de 40 minutos (TAVARES, 2016). Durante o período de aquecimento, as

quatro fibras de SPME com diferentes revestimentos foram inseridas e expostas para extração dos voláteis presentes (Figura 13).

Figura 13. *Vial de headspace* com pelos de camundongo sob aquecimento para extração dos voláteis.



Fonte: autoria própria.

Para seleção da fibra, foi avaliado o número de picos totais e a área total para cada uma das fibras utilizadas.

3.5.2.2 Tempo de extração

Após a etapa de seleção da fibra de SPME, foi realizada a padronização do melhor tempo de extração dos voláteis. Para essa etapa um camundongo previamente anestesiado teve 100 mg de pelos retirados da região dorsal com auxílio de uma lâmina de barbear (Wilkinson Sword).

Os pelos foram colocados em *vial* de 20 mL específico para *headspace*, que foi aquecido em banho de glicerina a 90 °C por três períodos de tempo diferentes: 18 minutos (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014a), 30 minutos (tempo intermediário) e 40 minutos (TAVARES, 2016). Durante o aquecimento, três fibras de SPME revestidas com PDMS/DVB foram inseridas no *vial* e cada uma foi exposta por um dos três diferentes tempos para extração dos voláteis presentes.

Para seleção do tempo de extração, foram avaliados o número de picos totais e área total para cada um dos tempos testados.

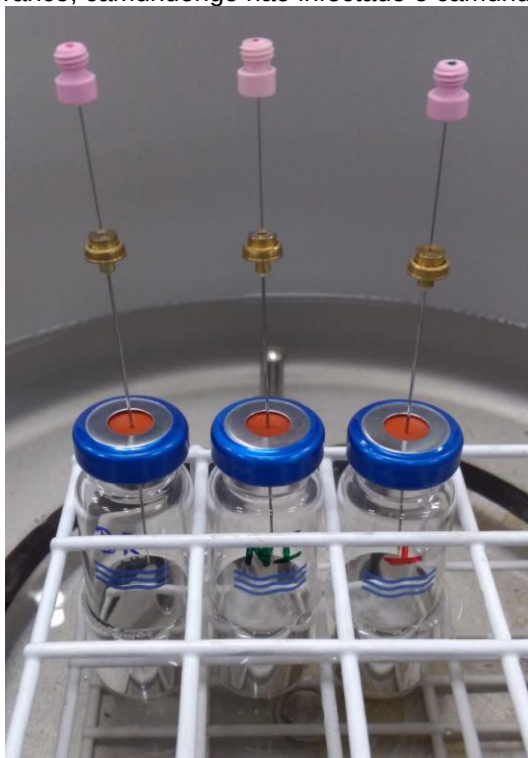
3.5.3 Extração dos voláteis por aquecimento

Após as etapas de padronização, para seleção da melhor fibra e do melhor tempo de extração, foi possível avaliar e comparar os voláteis presentes em pelos de camundongos infectados por *L. (V.) braziliensis* e em camundongos não infectados.

Para avaliar os voláteis presentes nos camundongos, foram utilizados dois grupos de três camundongos, sendo um grupo de não infectados e outro de infectados, onde cada camundongo teve 100 mg de pelos retirados da região dorsal com auxílio de uma lâmina de barbear (Wilkinson Sword).

Os pelos de cada um dos camundongos foram colocados individualmente em *vials* de 20 mL específicos para *headspace*. Esses *vials*, juntamente com três *vials* vazios (brancos), foram aquecidos em banho de glicerina a 90°C por um período de 30 minutos. Durante o período de aquecimento, uma fibra de SPME revestida com PDMS/DVB foi inserida e exposta em cada um dos *vials* para extração dos voláteis presentes (Figura 14).

Figura 14. *Vials* de *headspace* aquecidos para extração dos voláteis dos diferentes grupos, da esquerda para a direita: branco, camundongo não infectado e camundongo infectado.



Fonte: autoria própria.

Após as extrações, as fibras foram recolhidas e levadas para análise em CG-EM, sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas na extração dos voláteis na caixa de acrílico e nas etapas de padronização da metodologia (item 3.5.1).

A partir dos espectros de massas obtidos dos picos dos cromatogramas, a identificação dos compostos foi realizada com auxílio das bibliotecas NIST 08, NIST 98v101, Wiley MS 229 e FFNSC 1.3, considerando similaridade acima de 75%.

Para auxiliar na identificação dos picos, foi injetada uma mistura de *n*-alcanos comercial (C8-C20) para cálculo dos respectivos índices de retenção (IR) de cada um dos compostos, calculados pela equação (Van den Dool and Kratz):

$$IR = 100n + 100 \times \frac{(trX - trZ)}{tr(Z+1) - trZ} \quad \text{onde,}$$

n = número de carbonos do *n*-alcano com o tempo de retenção anterior a composto analisado;

trX = tempo de retenção do composto analisado;

trZ = tempo de retenção do *n*-alcano imediatamente anterior ao composto analisado;

trZ+1 = tempo de retenção do *n*-alcano localizado imediatamente após o composto analisado.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O número de insetos alimentados nos camundongos infectados e não infectados com uso do azul de Evans e o volume de sangue ingerido pelos insetos foram comparados estatisticamente pela realização de teste t-Student (GraphPad Prism 5.03).

A diferença de proporção entre insetos atraídos para camundongos infectados ou não infectados e seu respectivo controle, no teste do tubo em Y, foi realizada pelo teste binomial (Bioestat 5.3).

As áreas relativas dos compostos voláteis identificados foram submetidas à análise de componentes principais (Principal Components Analysis - PCA) (Statistica 10 StatSoft®).

3.7 ÉTICA

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAr/UNESP (Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 52/2015 - Parecer nº 89/2015).

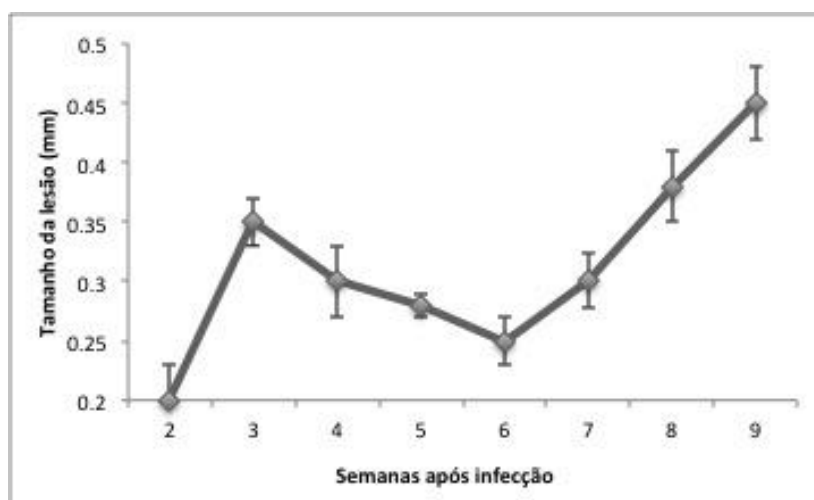
4 RESULTADOS

4.1 Infecção dos camundongos

4.1.1 Confirmação da infecção

A partir da medição do tamanho da lesão (edema) presente nos camundongos infectados, foi possível confirmar a presença de infecção em tais animais utilizados nos experimentos (Figura 15).

Figura 15. Evolução de lesão na pata posterior esquerda de camundongos Balb/C infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. As barras representam o desvio padrão entre a média de cinco animais.



Após a realização dos experimentos e eutanásia dos animais para reobtenção dos parasitas em meio de cultura, foram visualizadas a partir do quarto dia formas promastigotas em divisão de *L. (V.) braziliensis*.

4.2 Avaliação da atratividade dos camundongos para flebotomíneos

4.2.1 Preferência alimentar

De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença significativa entre o número de fêmeas alimentadas em camundongo infectado e o número de fêmeas alimentadas em camundongo não infectado. No entanto, houve uma baixa taxa de alimentação das fêmeas em todas as repetições, sem diferença estatística no total das 16 repetições ($p = 0,4949$) (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Número de fêmeas alimentadas em cada um dos camundongos quando injetado corante azul de Evans em camundongo não infectado (n=30) (p = 0,2462).

Teste	Camundongo infectado	Camundongo não infectado ^{*EB}
1	5	1
2	5	2
3	4	2
4	3	4
5	3	3
6	-	1
7**	6	7
8**	10	4
Total	36	24

*EB = camundongo injetado com corante azul de Evans.

** = camundongos imobilizados.

Tabela 3. Número de fêmeas alimentadas em cada um dos camundongos quando injetado corante azul de Evans em camundongo infectado (n=30) (p = 0,8541).

Teste	Camundongo infectado ^{*EB}	Camundongo não infectado
1	2	-
2	-	2
3	5	2
4	1	1
5	1	5
6	2	2
7**	5	4
8**	7	9
Total	21	23

*EB = camundongo injetado com corante azul de Evans.

** = camundongos imobilizados.

4.2.2 Alocados em túnel de vento

Para o teste utilizando a cuba de vidro, com o camundongo infectado, nenhuma fêmea de *Ny. neivai* das 15 avaliadas deixaram a caixa de liberação; não havendo ativação. No entanto, ao realizar o controle positivo com hexanol, das 15 fêmeas, 80% foram ativadas e 66,6% foram atraídas pelo composto.

Quando o camundongo foi imobilizado e colocado como estímulo na saída de ar do túnel de vento, também não houve resposta das fêmeas (15), ao contrário do controle positivo com hexanol, onde 88,8% das fêmeas foram ativadas e 50% foram atraídas pelo composto.

4.2.3 Alocados em tubo em Y

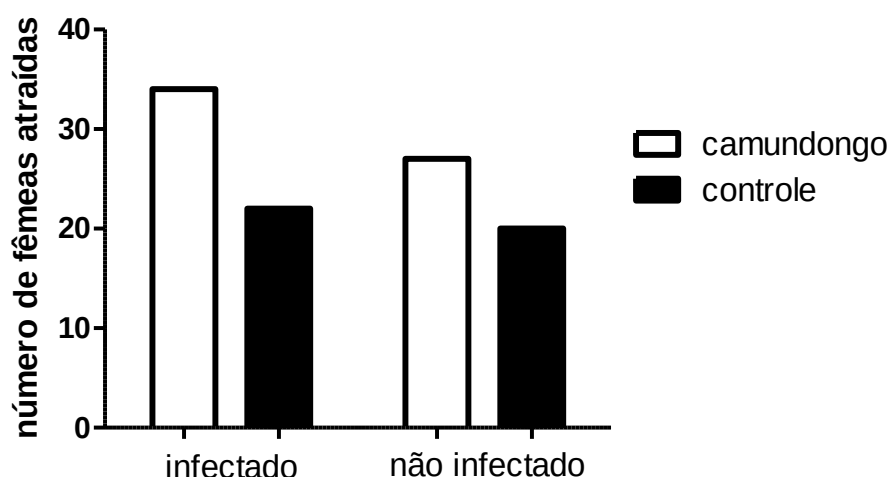
No primeiro teste, onde os camundongos infectados e não infectados foram apresentados simultaneamente em cada um dos lados do tubo em Y, apenas

nove (22,5%) fêmeas de 40 foram ativadas e todas foram atraídas, sendo cinco pelo camundongo infectado e quatro pelo camundongo não infectado.

Quando utilizados dois conjuntos de tubo em Y simultaneamente, cada um com um camundongo de um dos lados como estímulo e ar como controle, houve um aumento da resposta das fêmeas para ambos os camundongos.

Para o camundongo infectado, 64 fêmeas de 90 (71,1%) foram ativadas, sendo que 34 foram atraídas para o lado do camundongo (53,1%) e 22 para o controle (34,7%) ($p = 0,61$). Para o camundongo não infectado, 57 fêmeas foram ativadas (63,3%), sendo que 27 foram atraídas para o lado do camundongo (47,4%) e 20 para o controle (35,1%) ($p = 0,69$) (Figura 16).

Figura 16. Número de fêmeas atraídas por cada um dos camundongos apresentados individualmente no teste em tubo em Y.

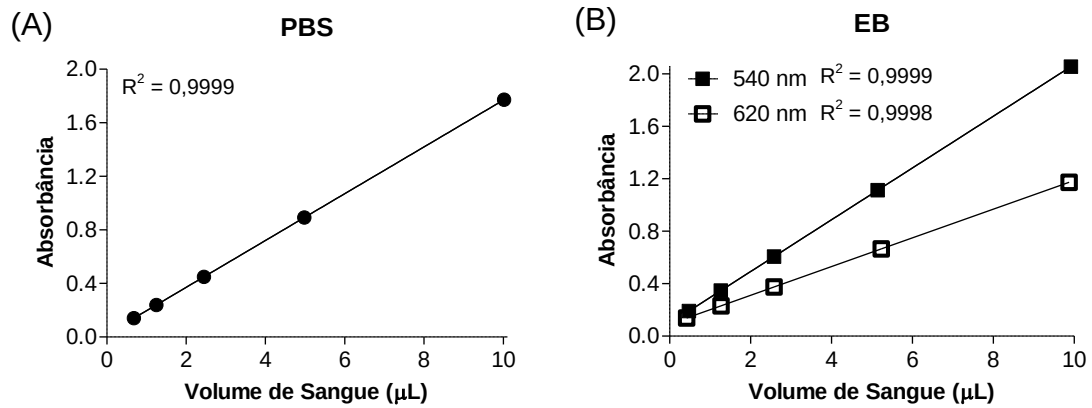


Apesar da resposta dos insetos ser maior quando utilizados dois conjuntos de tubo em Y simultaneamente, não foi possível observar diferença na proporção de insetos atraídos para o camundongo infectado e o não infectado.

4.3 Obtenção de curvas analíticas e avaliação do volume de sangue ingerido pelos insetos

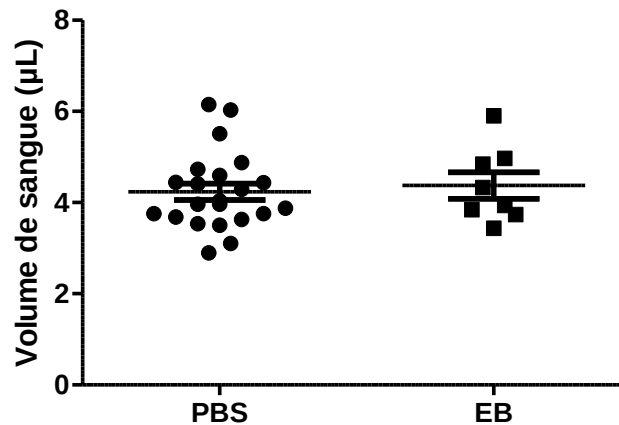
A partir da leitura de absorbância das diluições seriadas, nos comprimentos de onda de 540 e 620 nm em placa de 96 poços, foram obtidas as curvas analíticas de absorbância *versus* volume de sangue para o sangue com PBS (Figura 17A) e para o sangue com corante azul de Evans (Figura 17B).

Figura 17. Curvas analíticas de absorvância *versus* volume de sangue: (A) sangue + PBS; (B) sangue + corante azul de Evans.



A partir das curvas analíticas obtidas, foi realizado o cálculo do volume de sangue ingerido por fêmeas de *Ae. aegypti* para verificação da metodologia, onde foi possível estimar tal volume de sangue (Figura 18).

Figura 18. Volume de sangue ingerido por fêmeas de *Ae. aegypti* ingurgitadas com sangue + PBS e com sangue + corante azul de Evans (EB) ($p=0,69$).



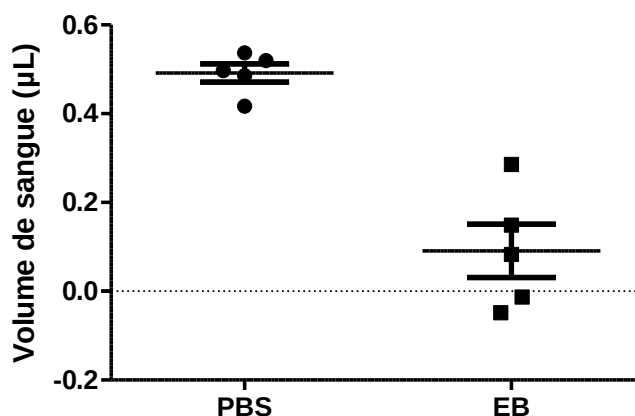
Devido ao menor volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos, a absorvância dos insetos que se alimentaram ficou muito próxima da absorvância basal medida a partir de insetos que não realizaram alimentação sanguínea (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de absorvância obtidos para as fêmeas não alimentadas (nos dois comprimentos de onda), fêmeas alimentadas em camundongo injetado com PBS e fêmeas alimentadas em camundongo injetado com corante azul de Evans.

Insetos	Fêmeas não alimentadas		Alimentadas	Alimentadas
	540 nm	620 nm	PBS (540 nm)	EB (620 nm)
1	0,075	0,087	0,107	0,084
2	0,056	0,050	0,116	0,104
3	0,080	0,053	0,109	0,103
4	0,078	0,063	0,095	0,074
5	0,112	0,106	0,113	0,100

A partir desses valores de absorvância, calculou-se o volume de sangue ingerido por cada inseto para verificação das curvas padrões (Figura 19).

Figura 19. Estimativa do volume de sangue ingerido por fêmeas ingurgitadas com sangue + PBS e com sangue + corante azul de Evans (EB) para verificação das curvas padrão.



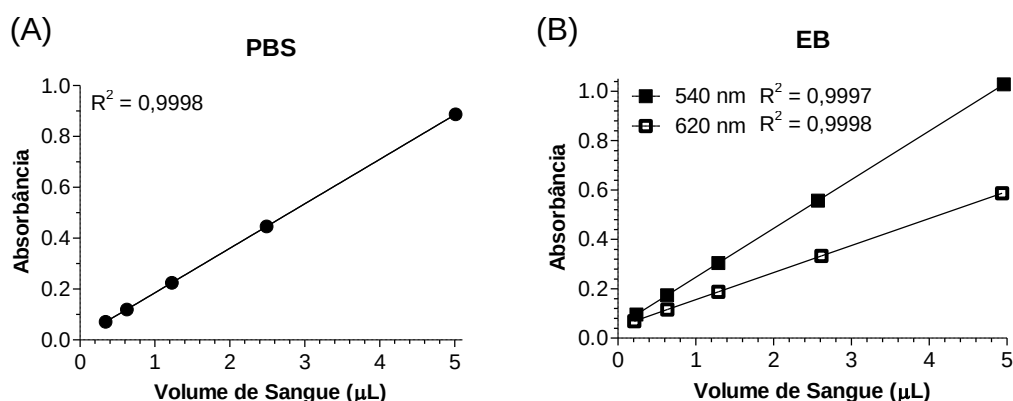
No entanto, não foi possível obter dados precisos para o volume de sangue ingerido pelas fêmeas ingurgitadas, uma vez que alguns dos resultados foram até mesmo negativos para as fêmeas alimentadas no camundongo injetado com o corante (EB).

Dessa maneira, foi necessária a realização de uma nova diluição para obtenção das curvas padrão e posterior avaliação do volume de sangue ingerido pelas fêmeas.

4.3.1 Ajuste da diluição

A partir da leitura de absorbância das diluições seriadas, nos comprimentos de onda de 540 e 620 nm em placa de 96 poços para realização da nova diluição, foram obtidas duas novas curvas analíticas de absorbância *versus* volume de sangue somente do sangue com PBS (Figura 20A) e do sangue com corante azul de Evans (Figura 20B).

Figura 20. Curvas analíticas de absorbância versus volume de sangue após ajuste da diluição: (A) sangue + PBS; (B) sangue + corante azul de Evans.



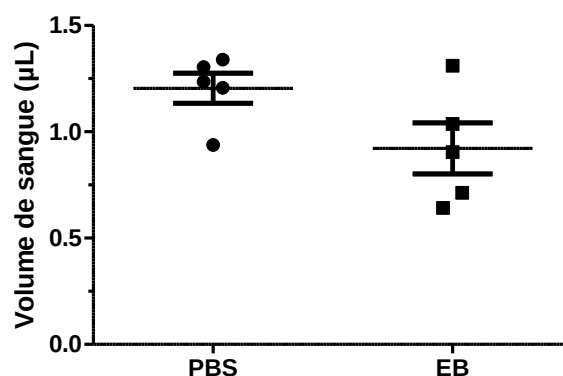
Esse ajuste na diluição permitiu uma diferença entre os valores de absorbância dos insetos que se alimentaram e dos que não se alimentaram (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de absorbância obtidos para as fêmeas não alimentadas (nos dois comprimentos de onda), fêmeas alimentadas em camundongo injetado com PBS e fêmeas alimentadas em camundongo injetado com corante azul de Evans após o ajuste da diluição.

Insetos	Fêmeas não alimentadas		Alimentadas	Alimentadas
	540 nm	620 nm	PBS (540 nm)	EB (620 nm)
1	0,118	0,110	0,227	0,208
2	0,115	0,108	0,245	0,206
3	0,101	0,097	0,222	0,168
4	0,093	0,086	0,175	0,200
5	0,112	0,106	0,239	0,148

A nova diluição permitiu o cálculo do volume de sangue ingerido nos diferentes grupos de insetos a partir dos valores de absorbância obtidos para cada um dos insetos (Figura 21).

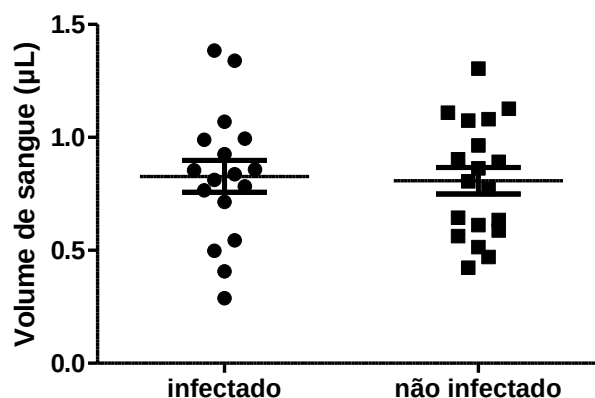
Figura 21. Estimativa do volume de sangue ingerido por fêmeas ingurgitadas com sangue + PBS e com sangue + corante azul de Evans (EB) após o ajuste da diluição ($p = 0,0760$).



4.3.2 Estimativa do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos

Com o ajuste da diluição, foi possível estimar o volume de sangue ingerido pelas fêmeas que se alimentaram nos camundongos não infectados e infectados dos testes de atratividade que foram realizados com os camundongos alocados em gaiolas (Figura 22).

Figura 22. Estimativa do volume de sangue ingerido por fêmeas ingurgitadas que se alimentaram em camundongos infectados e não infectados ($p = 0,8303$).



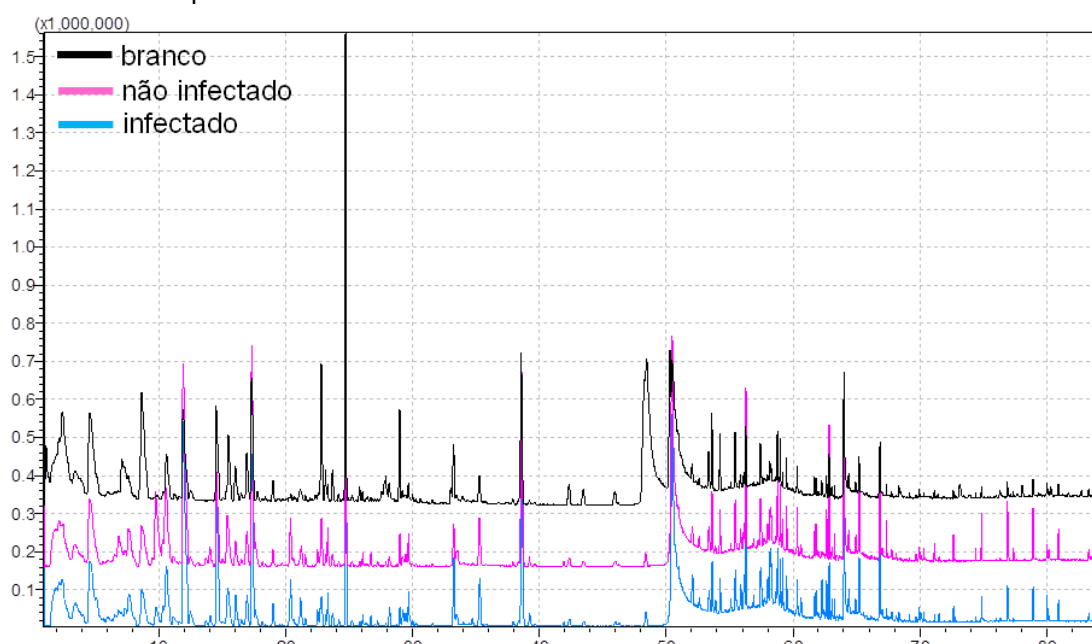
Para tais testes onde foi estimado o volume de sangue ingerido por cada inseto, obteve-se uma média de 0,83 µL para aqueles alimentados em camundongos infectados e de 0,81 µL para os alimentados em camundongos não infectados, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p = 0,8303$).

4.4 Identificação dos voláteis emitidos pelos animais

4.4.1 Caixa de acrílico

Nos testes iniciais onde foram realizadas extrações na caixa de acrílico para o controle negativo (branco), camundongo não infectado e camundongo infectado, utilizando a fibra de SPME revestida por DVB/CAR/PDMS, os cromatogramas dos três grupos apresentaram perfil de voláteis semelhantes (com grande quantidade de contaminantes), variando apenas na intensidade dos picos (Figura 23).

Figura 23. Cromatogramas obtidos nas extrações realizadas em caixa de acrílico e fibra DVB/CAR/PDMS por 90 min.



A partir de tal resultado, os pelos dos camundongos foram utilizados como uma alternativa para realização de uma melhor extração dos voláteis.

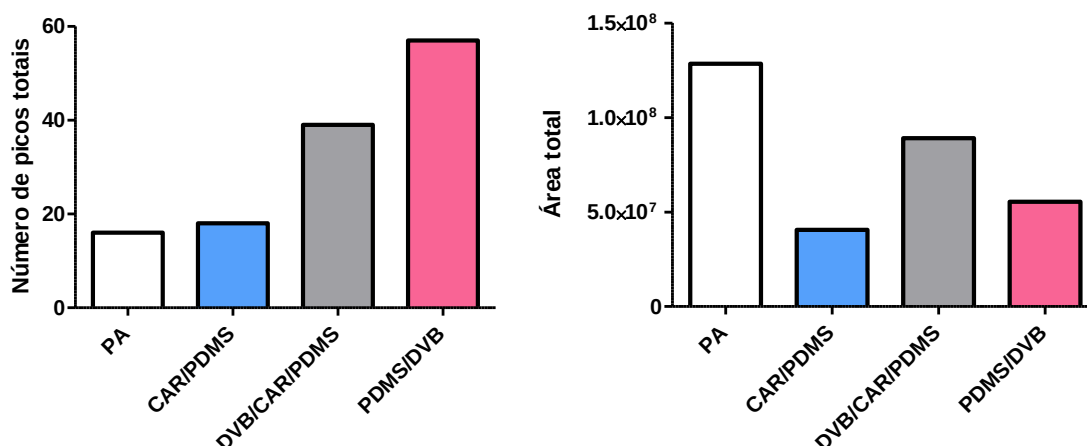
4.4.2 Padronização da metodologia de extração

4.4.2.1 Seleção da fibra de SPME

Após a realização das extrações de voláteis dos pelos dos camundongos e da análise dos cromatogramas para seleção da melhor fibra de SPME, foi avaliado o número de picos totais obtidos para cada uma das fibras.

A fibra revestida com PDMS/DVB apresentou um maior número de picos (57) com relação às fibras revestidas com PA, CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS, que apresentaram 16, 18 e 39 picos, respectivamente (Figura 24).

Figura 24. Número de picos totais obtidos para as diferentes fibras testadas.



Quando analisados os valores de área total dos picos para as diferentes fibras, a fibra revestida por PA apresentou um valor maior de área total, seguida pelas fibras revestidas por DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB e CAR/PDMS.

No entanto, apesar da fibra rosa (PDMS/DVB) ter apresentado um valor de área total menor do que o da fibra branca (PA), ela foi capaz de adsorver um maior número de compostos voláteis diferentes, demonstrando maior sensibilidade para a extração dos compostos voláteis da amostra de pelos.

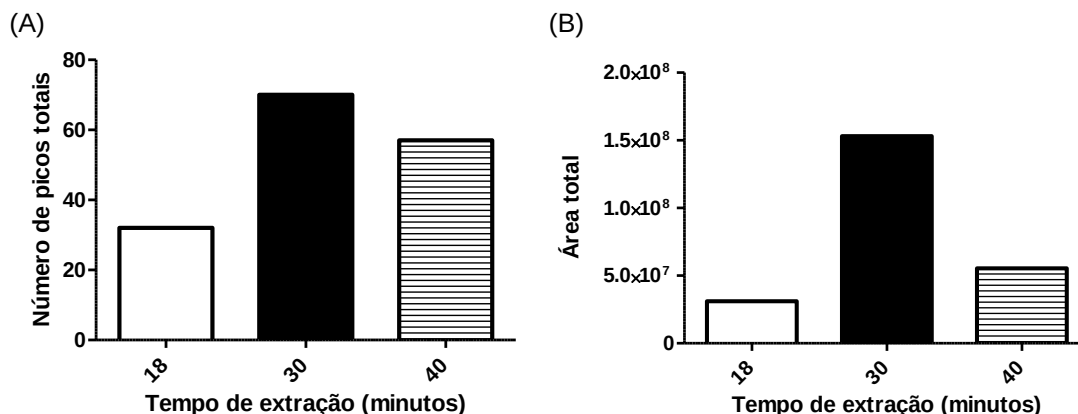
Dessa maneira, a fibra rosa (PDMS/DVB) foi selecionada para as extrações posteriores.

4.4.2.2 Tempo de extração

Após a seleção da fibra rosa como melhor fibra para extração dos voláteis, foi padronizado o tempo de extração necessário para se obter um melhor resultado, para os quais se avaliou o número de picos totais e a área total dos picos obtidos.

Dentre os três tempos diferentes que foram testados, o melhor resultado foi apresentado para a extração realizada pelo período de 30 minutos, que apresentou um maior número de picos totais e uma maior área total dos picos (Figura 25).

Figura 25. (A) Número de picos totais e (B) área total dos picos para os diferentes tempos de extração.



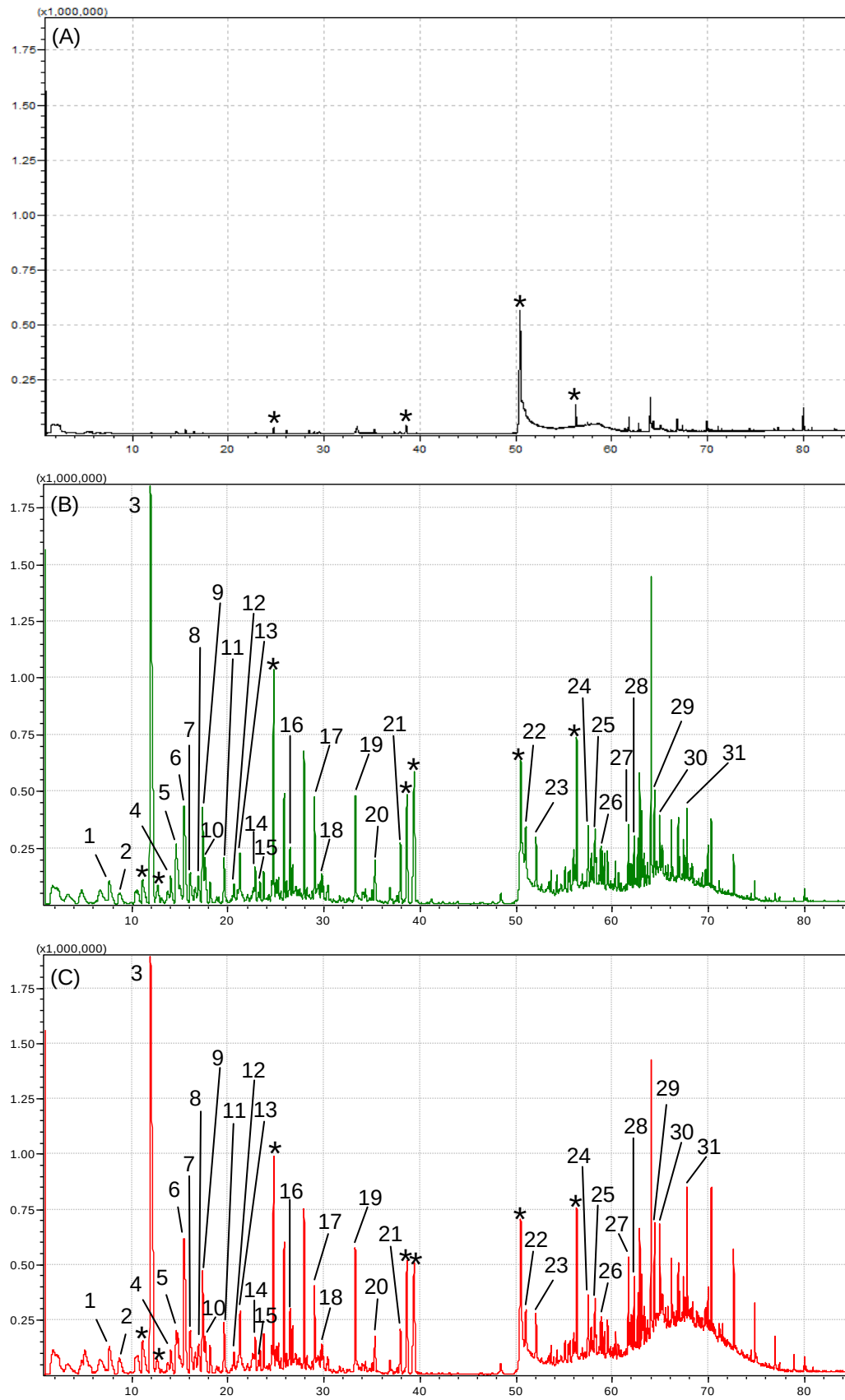
Dessa maneira, ficou estabelecido um tempo de extração de 30 minutos para as análises posteriores dos voláteis presentes em camundongos infectados e não infectados.

4.4.3 Extração dos voláteis por aquecimento

Posteriormente à padronização da metodologia de extração dos voláteis, foram realizadas as extrações dos pelos obtidos dos dois grupos de camundongos (infectados e não infectados).

A partir dos cromatogramas obtidos, foi possível observar o mesmo perfil de picos para os voláteis de camundongo infectado e de camundongo não infectado, variando apenas a área dos picos (Figura 26).

Figura 26. Cromatogramas obtidos para as três extrações realizadas: (A) controle negativo, (B) camundongo não infectado e (C) camundongo infectado. Picos identificados numerados, excluindo-se os contaminantes (*).



Após análise dos espectros de massas obtidos e dos índices de retenção calculados para os 65 picos, foi possível identificar 31 compostos, excluindo-se os contaminantes (Tabela 6).

Tabela 6. Compostos tentativamente identificados, em ordem crescente de tempo de retenção (t_R), seus respectivos índices de retenção (IR) e área relativa média (AR). IR da literatura foram obtidos por meio da biblioteca online WebNIST.

Picos	t_R (minutos)	Composto	IR _{calculado}	IR _{literatura}	AR _i (%)	AR _{Ni} (%)
1	7,67	octanal ^{a, b, c, d, e}	1008	1002	1,87	2,22
2	8,69	limoneno ^d	1036	1034	0,99	1,07
3	11,95	nonanal ^{a, b, c, d, e}	1107	1104	36,25	36,37
4	14,05	cis-verbenol ^e	1150	1145	1,68	3,77
5	14,77	2-nonenal ^{c, d, e}	1163	1163	0,83	1,36
6	15,43	1-nonanol ^e	1175	1172	8,04	7,32
7	16,06	naftaleno ^c	1186	1181	2,93	3,05
8	16,95	(-)-mirtenol	1200	1199	3,28	4,87
9	17,36	decanal ^{a, b, d, e}	1208	1208	5,10	4,81
10	17,62	verbenona ^e	1213	1212	2,16	3,93
11	19,59	carvona	1248	1249	2,64	3,13
12	20,62	trans-2-decenal ^e	1265	1266	0,46	0,58
13	21,29	ácido nonanóico ^e	1276	1278	1,77	0,92
14	22,84	tridecano ^{b, c}	1299	1300	1,18	1,07
15	23,34	undecanal ^{c, d, e}	1308	1306	0,75	0,60
16	26,72	cis-8-undecen-1-al	1364	1365	0,91	0,91
17	29,02	tetradecano ^{b, c, e}	1399	1400	7,21	7,27
18	29,71	dodecanal ^{c, e}	1408	1408	0,61	0,52
19	33,26	geranilacetona ^{d, e}	1450	1455	5,23	3,30
20	35,29	dodecanol ^{c, e}	1471	1473	1,43	1,21
21	37,96	pentadecano ^{b, c, d, e}	1498	1500	2,23	2,07
22	51,00	hexadecano ^{b, c, d, e}	1599	1600	1,87	1,64
23	52,07	tetradecanal ^e	1615	1612	1,21	1,00
24	57,50	heptadecano ^{b, c, e}	1699	1700	1,62	1,31
25	58,20	pentadecanal ^e	1715	1715	0,89	0,77
26	58,80	6-fenildodecano	1730	1725	0,70	0,57
27	61,67	octadecano ^{b, c, e}	1798	1800	1,37	0,89
28	62,28	hexadecanal	1817	1821	0,84	0,55
29	64,38	hexadecanol ^e	1880	1880	1,59	1,13
30	64,96	nonadecano ^{b, c, e}	1898	1900	1,16	0,88
31	67,78	eicosano ^{b, e}	1996	2000	1,20	0,92

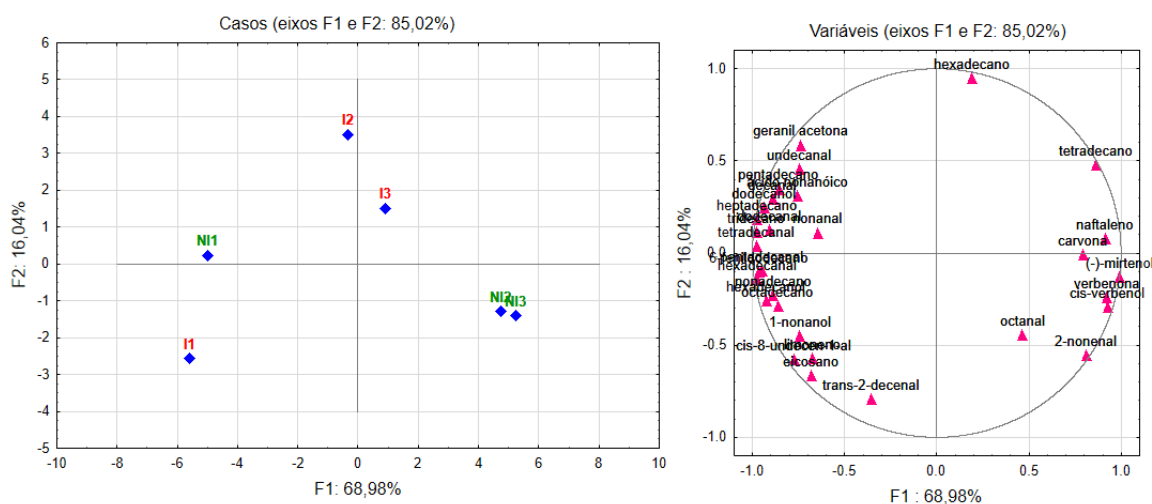
a, b, c, d e e: compostos previamente encontrados em estudos com camundongos (a: Röck et al., 2006), cães (b: Oliveira et al., 2008; c: Magalhães-Junior et al., 2014) e seres humanos (d: Dormont et al., 2013; e: Tavares, 2016).

Além dos compostos identificados apresentados na tabela, foram identificados outros sete compostos: tetrametilpirazina (t_R = 11,13), trans-pinocarveol (t_R = 13,73), dodecametilciclohexasiloxano (t_R = 24,75), tetradecametilcicloheptasiloxano (t_R = 38,62), 4-metil-2,6-di-tert-butilfenol (t_R =

39,38), dietilftalato ($t_R = 50,48$) e hexadecametilciclooctasiloxano ($t_R = 56,31$). Tais compostos são considerados como contaminantes, uma vez que estavam presentes também nas análises realizadas como controles negativos (*vial* vazio).

Dentre os 31 compostos identificados, 11 apresentaram um maior teor (maior área relativa) nos camundongos não infectados e os demais nos camundongos infectados. Para verificar a existência de uma correlação desses compostos com os determinados grupos de camundongos, os valores de áreas relativas dos picos identificados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA)(Figura 27).

Figura 27. Análise de componentes principais (PCA) dos compostos voláteis identificados a partir das amostras de pelos de camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. (V.) braziliensis*. I1, I2 e I3: camundongos infectados; NI1, NI2 e NI3: camundongos não infectados.



A análise das áreas relativas dos picos por meio da PCA mostrou uma correlação de seis compostos com dois dos camundongos não infectados: carvona, (-)-mirtenol, verbenona, *cis*-verbenol, octanal e 2-nonenal. Tais compostos estão entre os 11 que apresentaram uma maior área relativa média nos camundongos não infectados.

5 DISCUSSÃO

Tendo em vista que diversos estudos demonstram uma diferença na atratividade hospedeiros infectados por parasitas do gênero *Plasmodium* para culicídeos não infectados (LACROIX et al., 2005; CORNET et al., 2013a; DE MORAES et al., 2014; BATISTA et al., 2014), o presente estudo buscou avaliar uma possível diferença na atratividade de hospedeiros infectados e não infectados para *Ny. neivai*.

No entanto, não foi observada diferença na atratividade de camundongos infectados por *L. (V.) braziliensis* e camundongos não infectados para *Ny. neivai*, bem como não houve diferença no volume de sangue ingerido pelos insetos que se alimentaram nos dois grupos de camundongos.

Tal diferença de atratividade comprovada para culicídeos é apresentada estando o vetor infectado ou não com os parasitas do gênero *Plasmodium*, conforme descrito para *Anopheles gambiae* s.s. infectado por *Plasmodium falciparum* (SMALLEGANGE et al., 2013) e para *Culex pipiens* infectados ou não por *Plasmodium relictum*, agente etiológico da malária aviária (CORNET et al., 2013b).

Para flebotomíneos, apesar da baixa quantidade de estudos nessa área, foi encontrada uma diferença na atratividade de hamsters infectados por *L. infantum chagasi* para *Lu. longipalpis* (O'SHEA et al., 2002; NEVATTE et al., 2017).

Contrariamente a isso, em situações onde os flebotomíneos estão infectados por parasitas do gênero *Leishmania* é possível observar uma diferença no volume de sangue ingerido por eles com relação a insetos sem a infecção. Essa diferença se dá por meio de mudanças comportamentais causadas pela geração de um gel de proteofosfoglicano secretado por promastigotas de *Leishmania*, fazendo com que ocorra uma menor alimentação dos insetos em um único hospedeiro e o forçando a se alimentar em múltiplos hospedeiros (ROGERS; BATES, 2007; ROGERS, 2012). Tais fatores são capazes de favorecer a transmissão do agente etiológico das leishmanioses.

Um fator que pode ter determinado a ausência de uma diferença de atratividade para *Ny. neivai* pode ser devido a uma diferença na interação vetor-parasita-hospedeiro com relação ao que ocorre para a leishmaniose visceral ou ainda pela diferença individual de atratividade das espécies de hospedeiros (HAMILTON; RAMSOONDAR, 1994; KNOLS et al., 1995; BERNIER et al., 2002). Nos estudos onde houve resposta diferencial na atratividade o agente etiológico era

L. infantum chagasi, o vetor *Lu. longipalpis* e o hospedeiro hamsters. No presente estudo foram utilizados: *L. braziliensis*, *Ny. neivai* e camundongos.

Além disso, diferentes cepas podem ser responsáveis por respostas distintas na atratividade, como é o caso do *Plasmodium falciparum*, onde culicídeos infectados por uma cepa sensível à cloroquina apresentaram uma maior atração (SMALLEGANGE et al., 2013) e culicídeos infectados por uma cepa isolada de pacientes infectados no Marrocos não apresentaram diferença na atração aos odores humanos de voluntários saudáveis (NGUYEN et al., 2017).

Somada à diferença na atratividade, *Plasmodium* spp também é responsável por gerar uma diferença no padrão de voláteis emitidos por camundongos e por humanos infectados (DE MORAES et al., 2014; DE BOER et al., 2017). Além disso, glóbulos vermelhos em cultura infectada por *P. falciparum* são capazes de produzir um precursor que é responsável por um aumento na produção de CO₂, aldeídos e monoterpenos, aumentando a atratividade e a susceptibilidade de infecção para o *An. gambiae* (EMAMI et al., 2017). Alguns desses terpenos já haviam sido identificados previamente em culturas celulares infectadas por *P. falciparum* e demonstrado maior resposta eletrofisiológica para *An. gambiae* (KELLY et al., 2015).

Em hospedeiros infectados por *L. infantum chagasi* também já foi demonstrado um perfil de voláteis diferente entre hospedeiros infectados e não infectados (O'SHEA et al., 2002; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014a).

O'SHEA et al. (2002) observaram por meio de cromatografia gasosa acoplada à detector por ionização em chama (GC-FID) dez picos de compostos presentes somente em hamster infectados por *L. infantum chagasi*, porém esses voláteis não foram identificados.

Para cães infectados ou não por *L. infantum chagasi*, foram analisados voláteis de três grupos de animais: os que apresentavam sinais clínicos da doença, cães infectados sem a presença de sinais clínicos e cães não infectados e, por meio de microextração em fase sólida com análise por CG-EM, foram identificados seis biomarcadores de infecção (octanal, nonanal, β -hidroxietil fenil éter, decanal, heptadecano e 2-etil-hexil salicilato). Os resultados sugerem que a alteração dos voláteis seja mediada pelo parasita como forma de aumentar a atratividade do vetor por esses hospedeiros para favorecer a transmissão e manutenção do ciclo do

parasita, uma vez que os cães são considerados como reservatórios do parasita (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014a).

O presente estudo também não demonstrou uma diferença no padrão de compostos voláteis emitidos pelos camundongos infectados por *L. (V.) braziliensis* e camundongos não infectados.

Apesar das diferenças individuais que possam existir na emissão de voláteis, procurou-se no presente estudo minimizar essas possíveis distorções por meio de utilização de animais isogênicos, mantidos com a mesma alimentação e tendo a mesma idade. De acordo com a literatura, a comparação dos voláteis de diferentes camundongos é possível por não haver diferença no padrão de compostos presentes em animais de uma mesma faixa de idade (OSADA et al., 2003).

Testes iniciais onde as extrações de voláteis foram realizadas em caixa de acrílico para o controle negativo (branco), camundongo infectado e camundongo não infectado apresentaram uma grande contaminação, principalmente por siloxanos presentes no ambiente do laboratório devido ao gesso utilizado nos potes de criação para manutenção da colônia (GOULART et al., 2017b).

Após esses testes, foi possível padronizar a metodologia de extração dos voláteis dos camundongos por meio de aquecimento de uma alíquota de pelos dos animais e identificar tais compostos presentes nos animais.

A fibra selecionada na padronização da metodologia (PDMS/DVB) foi a mesma selecionada para identificação de biomarcadores de infecção por *L. infantum chagasi* em cães (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014a) e para identificação do perfil de voláteis em seres humanos residentes de região endêmica da LTA (TAVARES, 2016), com tempo de extração intermediário aos dois estudos citados (30 minutos).

Dentre os 38 compostos identificados, alguns já foram relatados anteriormente em camundongos (RÖCK et al., 2006), em cães (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014a) e em seres humanos (BERNIER et al., 2000; DORMONT et al., 2013a, 2013b; TAVARES, 2016) (Tabela 6).

Também é possível observar a presença de alguns compostos considerados como metabólitos secundários de plantas, tais como limoneno, *cis*-verbenol, (-)-mirtenol, verbenona e carvona.

Embora não houve diferença no perfil de voláteis encontrados nos animais infectados e não infectados, excluindo-se os contaminantes, apenas os

compostos octanal, limoneno, nonanal, *cis*-verbenol, 2-nonenal, naftaleno, (-)-mirtenol, verbenona, carvona, *trans*-2-decenal e tetradecano estão presentes em maior teor (maior área relativa média) nos camundongos não infectados. Todos os demais compostos apresentaram maior área relativa média nos camundongos infectados.

Dentre os compostos presentes em maior abundância nos camundongos não infectados, o *cis*-verbenol e a verbenona possuem certa atividade repelente para *An. gambiae*, um dos principais vetores da malária (OMOLO et al., 2004; INNOCENT et al., 2010).

Mesmo os camundongos não apresentando diferenças na atratividade e no perfil de voláteis, vários dos compostos identificados nos animais apresentam resultados de atratividade para diferentes espécies de insetos de importância médica ou agrícola.

Em estudo realizado por GUERENSTEIN; GUERIN (2001) foi demonstrada uma resposta de *Triatoma infestans* frente aos compostos octanal e nonanal por meio de eletroantenografia (EAG). FONTAN et al. (2002) também demonstraram resposta de machos e fêmeas de *T. infestans* frente a octanal, nonanal, decanal, undecanal e dodecanal por EAG, além de uma resposta comportamental de machos frente à baixas doses de nonanal.

O nonanal já foi identificado como possível feromônio de oviposição para *Culex quinquefasciatus*, principal vetor da *Wulchereria bancrofti* (agente etiológico da filariose) e, em testes de campo, foi obtida uma captura significativa de fêmeas grávidas em armadilhas utilizando tal composto, sendo a resposta de captura dose-dependente (LEAL et al., 2008).

Para estudos em campo realizados com *An. gambiae*, o dodecanol em associação com uma armadilha comercial já utilizada para o monitoramento dessa espécie de culicídeo foi responsável por um aumento na captura de culicídeos nessas armadilhas (MWERESA et al., 2016).

Em estudos envolvendo flebotomíneos, o nonanol apresentou uma resposta de ativação, porém não de atração, tanto para *Lu. longipalpis* quanto para *Ny. neivai* (MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2014b; MACHADO et al., 2015).

O conhecimento dos voláteis emitidos por hospedeiros vertebrados e de uma possível ação atrativa dos mesmos pode ser aplicado no monitoramento e/ou

controle de insetos envolvidos na transmissão de doenças (LOGAN; BIRKETT, 2007).

Possivelmente, testes futuros podem ser realizados para identificação dos compostos voláteis dos hospedeiros e para avaliação da atratividade de *Ny. neivai* frente a hospedeiros infectados alterando-se o modelo animal utilizado ou até mesmo a cepa e/ou espécie de *Leishmania*.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Para os testes de atratividade, não foi possível verificar a existência de uma diferença na atratividade de *Ny. neivai* frente a hospedeiros não infectados e infectados com *L. (V.) braziliensis*, tanto nos testes realizados com os camundongos alocados em gaiolas, quanto para os testes no tubo em Y.
- ✓ Apesar dos resultados não demonstrarem diferença na atratividade de *Ny. neivai* frente aos camundongos infectados e não infectados, dentre os testes de atratividade foi obtido um melhor resultado para os testes realizados no tubo em Y.
- ✓ Após ajuste de diluição, não foi observada diferença na quantidade de sangue ingerido pelas fêmeas alimentadas nos camundongos infectados e não infectados.
- ✓ O perfil de voláteis apresentado pelos camundongos infectados e não infectados não demonstrou diferença entre os compostos presentes nos dois grupos de animais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora não fizessem parte dos objetivos iniciais do trabalho, destacamos algumas padronizações que se mostraram necessárias para o desenvolvimento do mesmo: padronização das metodologias para avaliação do volume de sangue ingerido pelos flebotomíneos e avaliação do melhor tempo de extração da fibra de SPME assim como o revestimento mais adequado.

Devido ao menor volume ingerido pelos flebotomíneos, após determinados reajustes na diluição inicialmente estabelecida para avaliação do volume de sangue ingerido por culicídeos, foi possível padronizar a metodologia para avaliação do volume de sangue ingerido pelas fêmeas de flebotomíneos em cada um dos grupos de camundongos.

Para avaliação dos compostos voláteis emitidos pelos camundongos infectados e não infectados, após a padronização da metodologia de extração de voláteis dos pelos aquecidos de camundongos com auxílio das fibras de SPME foi possível estabelecer um tempo de extração de 30 minutos e a utilização da fibra revestida por PDMS/DVB.

REFERÊNCIAS

- ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infect Genet Evol.** v. 28, p. 691-703, 2014.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 10, n 3, p. e0004349, 2016.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.** v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANDRADE FILHO, J. D. et al. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 102, n. 4, p. 481-487, 2007.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal Chem.** v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.
- BATISTA, E. P. et al. *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) displays increased attractiveness to infected individuals with *Plasmodium vivax* gametocytes. **Parasit Vectors.** v. 7, p. 251, 2014.
- BERNIER, U. R. et al. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). **Anal Chem.** v. 72, n. 4, p. 747-756, 2000.
- BERNIER, U. R. et al. 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.** v. 18, n. 3, p. 186-195, 2002.
- BRASIL. **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas.** 1990 a 2016. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. setembro 2017. Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf> >.
- BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana /** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 180 p.: il. 2007. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1270-5. Disponível em: < http://www.crmv-mt.org.br/images/bt-arise/Artigos/manual_lta_2ed.pdf >.
- BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. Em: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil.** Rio de Janeiro: Fiocruz. v. 4, p. 257-274, 2003.
- BRAZIL, R. P. et al. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas – A mini review. **Entomol Ornithol Herpetol.** v. 4, n. 2, p. 144, 2015.

BRIEGEL, H. et al. Hemoglobinometry as a method for measuring blood meal sizes of mosquitoes (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.** v. 15, n. 3, p. 235-238, 1979.

CARREGARO, V. et al. Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. **BMC Microbiol.** v. 13, p. 102, 2013.

CONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

CORNET, S. et al. Malaria infection increases bird attractiveness to uninfected mosquitoes. **Ecol Lett.** v. 16, n. 3, p. 323-329, 2013a.

CORNET, S. et al. Both infected and uninfected mosquitoes are attracted toward malaria infected birds. **Malar J.** v. 12, p. 179, 2013b.

DE BOER, J. G. et al. Odours of *Plasmodium falciparum*-infected participants influence mosquito-host interactions. **Sci Rep.** v. 7, n. 1, p. 9283, 2017.

DE MORAES, C. M. et al. Malaria-induced changes in host odors enhance mosquito attraction. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 111, n. 30, p. 11079-11084, 2014.

DE OLIVEIRA, L. S. et al. Headspace solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry combined to chemometric analysis for volatile organic compounds determination in canine hair: a new tool to detect dog contamination by visceral leishmaniasis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 875, n. 2, p. 392-398, 2008.

DIAS-SVERSUTTI, A. C. et al. Estudo preliminar da preferência alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em Área Rural do Paraná. **Neotrop Entomol.** v. 36, n. 6, p. 953-959, 2007.

DINIZ, M. M. et al. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. **Parasit Vectors.** v. 7, p. 139, 2014.

DORMONT, L. et al. Human skin volatiles: a review. **J Chem Ecol.** v. 39, n. 5, p. 569-578, 2013a.

DORMONT, L. et al. New methods for field collection of human skin volatiles and perspectives for their application in the chemical ecology of human-pathogen-vector interactions. **J Exp Biol.** v. v216, Pt 15, p. 2783-2788, 2013b.

EMAMI, S. N. et al. A key malaria metabolite modulates vector blood seeking, feeding, and susceptibility to infection. **Science.** v. 355, n. 6329, p. 1076-1080, 2017.

ERHARDT, W. et al. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). **Res Exp Med.** v. 184, n. 3, p. 159-169, 1984.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**. v. 15, p. 1-13, 2016.

FONTAN, A. et al. Attractant volatiles released by female and male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of chagas disease: chemical analysis and behavioral bioassay. **J Med Entomol**. v. 39, n. 1, p. 191-197, 2002.

GALLAGHER, M. et al. Analyses of volatile organic compounds from human skin. **Br J Dermatol**. v. 159, n. 4, p. 780-791, 2008.

GERHARDT, H. et al. Insect Adhesion Secretions: Similarities and Dissimilarities in Hydrocarbon Profiles of Tarsi and Corresponding Tibiae. **J Chem Ecol**. v. 42, n. 8, p. 725-738, 2016.

GONZÁLEZ AUDINO, P. et al. Volatile compounds secreted by Brindley's glands of adult *Triatoma infestans*: identification and biological activity of previously unidentified compounds. **J Vector Ecol**. v. 32, n. 1, p. 75-82, 2007.

GOULART, T. M. et al. Breeding protocol for the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in laboratory conditions. **Acta Trop**. v. 174, p. 102-105, 2017a.

GOULART, T. M. et al. Techniques to improve the maintenance of a laboratory colony of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae). **Parasit Vectors**. v. 8, n. 1, p. 423, 2015.

GOULART, T. M. et al. Solid phase microextraction, sand flies, oviposition pheromones, plaster of Paris and siloxanes-What is in common? **Acta Trop**. v. 168, p. 50-53, 2017b.

GUERENSTEIN, P. G.; GUERIN, P. M. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. **J Exp Biol**. v. 204, Pt 3, p. 585-597, 2001.

HAMILTON, J. G. Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs. **Parasite**. v. 15, n. 3, p. 252-256, 2008.

HAMILTON, J. G.; RAMSOONDAR, T. M. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. **Med Vet Entomol**. v. 8, n. 4, p. 375-380, 1994.

INNOCENT, E. et al. Constituents of the essential oil of *Suregada zanzibariensis* leaves are repellent to the mosquito, *Anopheles gambiae* s.s. **J Insect Sci**. v. 10, p. 57, 2010.

JAMBULINGAM, P. et al. Domestic dogs as reservoir hosts for *Leishmania donovani* in the southernmost Western Ghats in India. **Acta Trop**. v. 171, p. 64-67, 2017.

KELLY, M. et al. Malaria parasites produce volatile mosquito attractants. **MBio**. v. 6 n. 2, p. e00235-15, 2015.

KNOLS, B. G. et al. Differential attractiveness of isolated humans to mosquitoes in Tanzania. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 89, n. 6, p. 604-606, 1995.

KWAK, J. et al. Major histocompatibility complex-regulated odortypes: peptide-free urinary volatile signals. **Physiol Behav.** v. 96, n. 1, p. 184-188, 2009.

LACROIX, R. et al. Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. **PLoS Biol.** v. 3, n. 9, p. e298, 2005.

LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v. 321, n. 1207, p. 389-404, 1988.

LEAL, W. S. et al. Reverse and conventional chemical ecology approaches for the development of oviposition attractants for *Culex* mosquitoes. **PLoS One.** v. 3, n. 8, p. e3045, 2008.

LIEVERS, R.; GROOT, A. T. Disposable Polydimethylsiloxane (PDMS)-coated fused silica optical fibers for sampling pheromones of moths. **PLoS One.** v. 11, n. 8, p. e0161138, 2016.

LOGAN, J. G.; BIRKETT, M. A. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. **Pest Manag Sci.** v. 63, n. 7, p. 647-657, 2007.

MACHADO, V. E. et al. Attraction of the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds in a wind tunnel. **Parasit Vectors.** v. 8, p. 147, 2015.

MACIEL, C. et al. Evans blue as a simple method to discriminate mosquitoes' feeding choice on small laboratory animals. **PLoS One.** v. 9, n. 10, p. e110551, 2014.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. **Anal Bioanal Chem.** v. 406, n. 26, p. 6691-6700, 2014a.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). **Parasit Vectors.** v. 7, p. 60, 2014b.

MARASSÁ, A. M. et al. Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 46, n. 5, p. 547-554, 2013.

MARCONDES, C. B. et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 103, n. 11, p. 1093-1097, 2009.

MARCONDES, C. B. et al. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 31, n. 1, p. 51-58, 1998.

MAY-CONCHA, I. et al. Volatile compound diversity and conserved alarm behaviour in *Triatoma dimidiata*. **Parasit Vectors**. v. 8, p. 84, 2015.

MAZOMENOS, B. E. et al. Evaluation of the major female *Eurytoma amygdali* sex pheromone components, (Z,Z)-6,9-tricosadiene and (Z,Z)-6,9-pentacosadiene for male attraction in field tests. **J Chem Ecol**. v. 30, n. 6, p. 1245-1255, 2004.

MIGUEL, D. C. et al. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalinization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* amastigotes. **J Antimicrob Chemother**. v. 60, n. 3, p. 526-534, 2007.

MWERESA, C. K. et al. Enhancing Attraction of African Malaria Vectors to a Synthetic Odor Blend. **J Chem Ecol**. v. 42, n. 6, p. 508-516, 2016.

NEVATTE, T. M. et al. After infection with *Leishmania infantum*, Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) become more attractive to female sand flies (*Lutzomyia longipalpis*). **Sci Rep**. v. 7, n. 1, p. 6104, 2017.

NGUYEN, P. L. et al. No evidence for manipulation of *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii* and *An. arabiensis* host preference by *Plasmodium falciparum*. **Sci Rep**. v. 7, n. 1, p. 9415, 2017.

OLIVEIRA, D. M. et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in the state of Paraná, southern Brazil, detected by multiplex polymerase chain reaction. **Vector Borne Zoonotic Dis**. v. 11, n. 2, p. 137-143, 2011.

OLSON, J. F. et al. Two compounds in bed bug feces are sufficient to elicit off-host aggregation by bed bugs, *Cimex lectularius*. **Pest Manag Sci**. v. 73, n. 1, p. 198-205, 2017.

OMOLO, M. O. et al. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**. v. 65, n. 20, p. 2797-2802, 2004.

OMRANI, S. M. et al. Fabrication of an olfactometer for mosquito behavioural studies. **J Vector Borne Dis**. v. 47, n. 1, p. 17-25, 2010.

OSADA, K. et al. The scent of age. **Proc Biol Sci**. v. 270, n. 1518, p. 929-933, 2003.

O'SHEA, B. et al. Enhanced sandfly attraction to *Leishmania*-infected hosts. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 96, n. 2, p. 117-118, 2002.

PINTO, M. C. et al. Octenol as attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) in the field. **J Med Entomol**. v. 48, n. 1, p. 39-44, 2011.

PINTO, M. C. et al. Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. **Parasit Vectors**. v. 5, p. 210, 2012.

PITA-PEREIRA, D. et al. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of south Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **Am J Trop Med Hyg**. v. 80, n. 4, p. 593-595, 2009.

PITTS, R. J. et al. The roles of kairomones, synomones and pheromones in the chemically-mediated behaviour of male mosquitoes. **Acta Trop**. v. 132, p. Suppl:S26-34, 2014.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annu Rev Entomol**. v. 58, p. 227-250, 2013.

REITZ, M. et al. Analysis of chemical profiles of insect adhesion secretions by gas chromatography-mass spectrometry. **Anal Chim Acta**. v. 854, p. 47-60, 2015.

RÖCK, F. et al. Comparative analysis of volatile constituents from mice and their urine. **J Chem Ecol**. v. 32, n. 6, p. 1333-1346, 2006.

ROGERS, M. E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host. **Front Microbiol**. v. 3, p. 223, 2012.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathog**. v. 3, n. 6, p. e91, 2007.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**. v. 55, p. 453-483, 2001.

SHIMABUKURO, P. H. F. et al. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys** v. 660, p. 67-106, 2017.

SHIMABUKURO, P. H. et al. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. **Parasit Vectors**. v. 3, p. 121, 2010.

SHIREY, R. E. SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. Em: PAWLISZYN J. **Handbook of Solid Phase Microextraction**. Elsevier. v. 4, p. 99-133, 2012.

SINGH, N. et al. Animal reservoirs of visceral leishmaniasis in India. **J Parasitol**. v. 99, n. 1, p. 64-67, 2013.

SMALLEGANGE, R. C. et al. Malaria infected mosquitoes express enhanced attraction to human odor. **PLoS One**. v. 8, n. 5, p. e63602, 2013.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. **J Biochem Biophys Methods**. v. 70, n. 2, p. 235-242, 2007.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasit Vectors**. v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

SUPELCO INC. **Solid Phase Microextraction Fiber Assemblies**. 2017a. Disponível em: < https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/1/t794123.pdf >

SUPELCO INC. **Selection guide for Supelco SPME fibers**. 2017b. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/selecting-spme-fibers.html> >

TAVARES, D. S. Atração de vetores de leishmaniose tegumentar americana por compostos orgânicos voláteis presentes na pele humana. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 109 f.: il. 2016.

URANW, S. et al. An outbreak investigation of visceral leishmaniasis among residents of Dharan town, eastern Nepal, evidence for urban transmission of *Leishmania donovani*. **BMC Infect Dis**. v. 13, p. 21, 2013.

VACAS, S. et al. Identification of the Male-Produced Aggregation Pheromone of the Four-Spotted Coconut Weevil, *Diocalandra frumenti*. **J Agric Food Chem**. v. 65, n. 2, p. 270-275, 2016.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Quím Nova**. v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

WEN, P. et al. Sex-pairing pheromone of *Ancistrotermes dimorphus* (Isoptera: Macrotermitinae). **J Insect Physiol**. v. 83, p. 8-14, 2015.

WHO. **Leishmaniasis Fact sheet nº 375**. 2017 (atualizado em abril de 2017). Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> >.

ZARBIN, P. H. G. et al. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Quím Nova**. v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZAULI, R. C. et al. A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. **Parasit Vectors**. v. 5, p. 11, 2012.

ZHANG, Z.; LI, G. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds **Microchem J**. v. 95, n. 2, p. 127-139, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Parecer de aprovação da CEUA/FCF/CAR.

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 52/2015

Interessada: FLÁVIA BENINI DA ROCHA SILVA

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

Projeto: Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (kinetoplastida: Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae).

Parecer nº 89/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

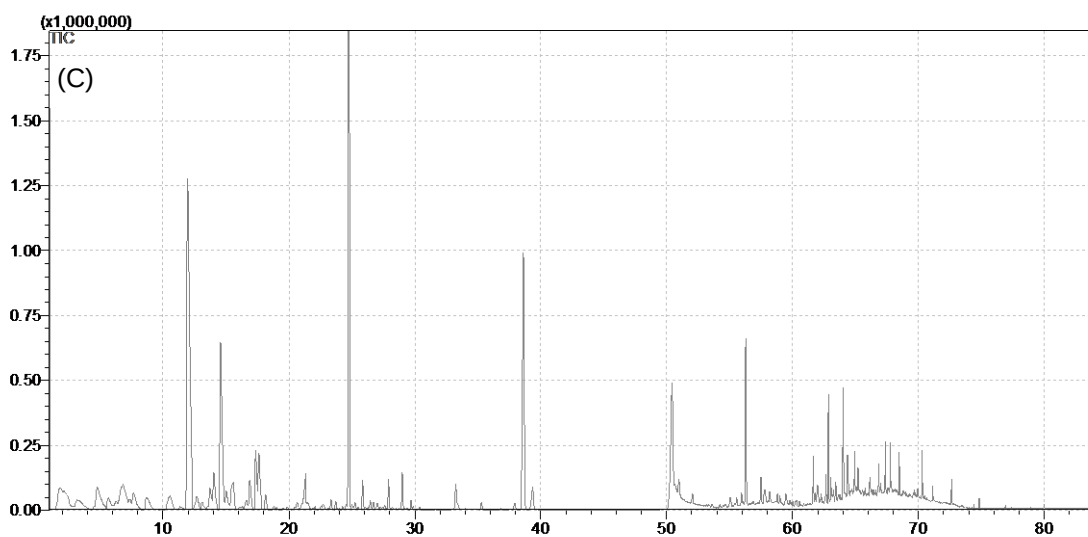
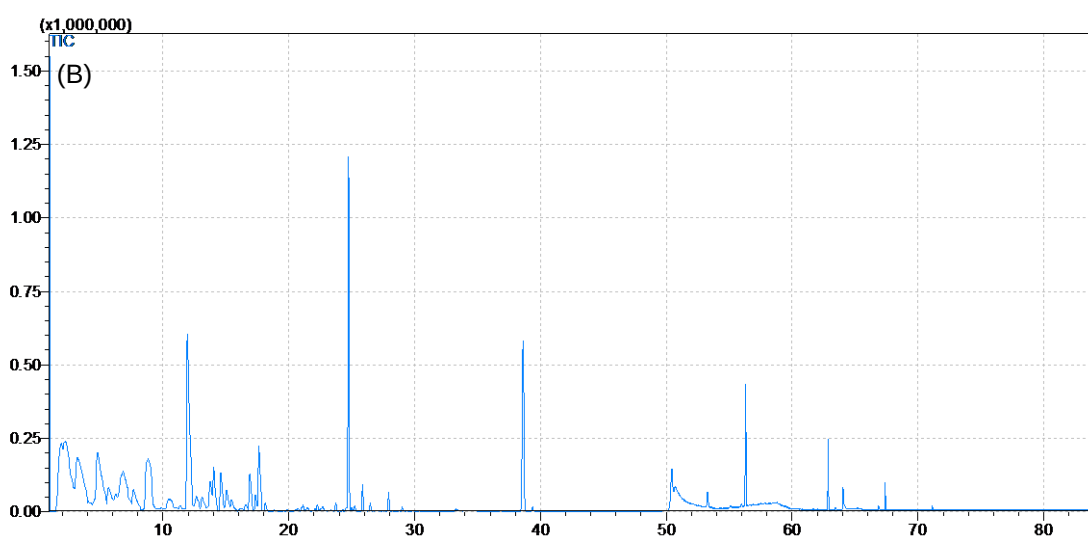
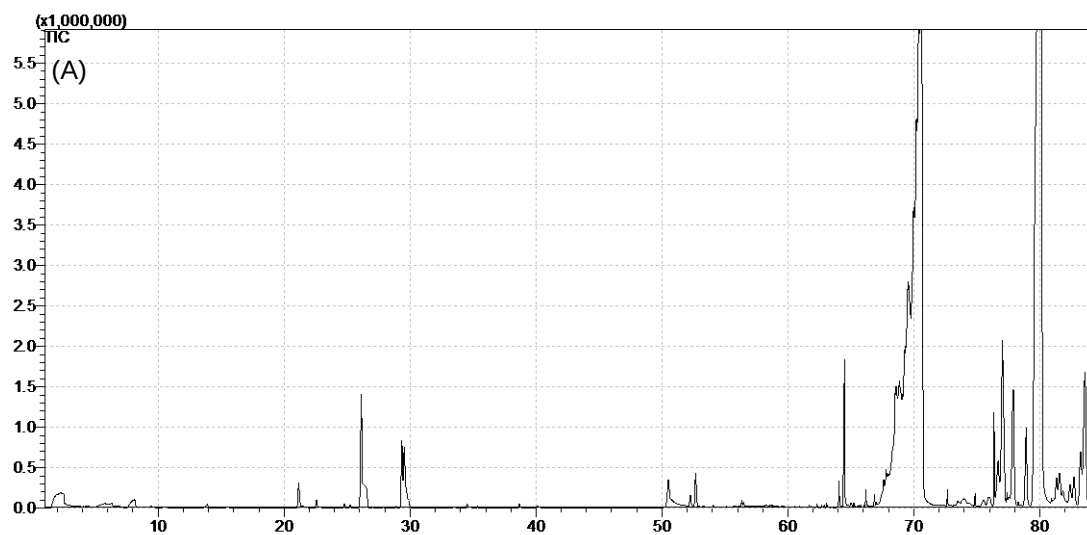
A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 16 de setembro de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Investigação sobre a atratividade de hospedeiros infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (kinetoplastida: Trypanosomatidae) para *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae)", apresentado pela Pós-graduanda FLÁVIA BENINI DA ROCHA SILVA, sob orientação da Professora Doutora Mara Cristina Pinto, do Departamento de Ciências Biológicas desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução. O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em AGOSTO de 2017 em formulário para este fim.

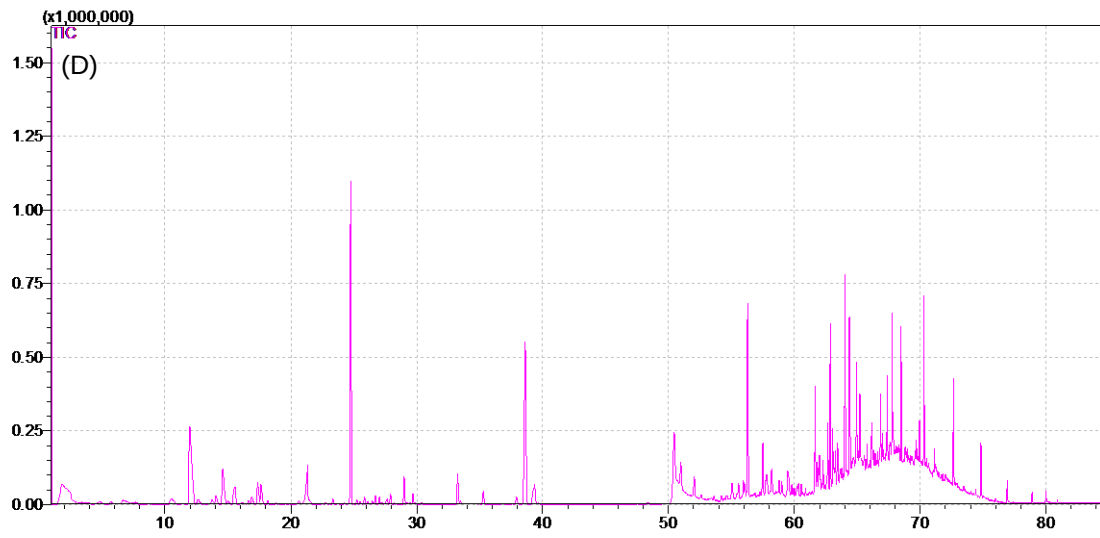
Araraquara, 21 de setembro de 2015.



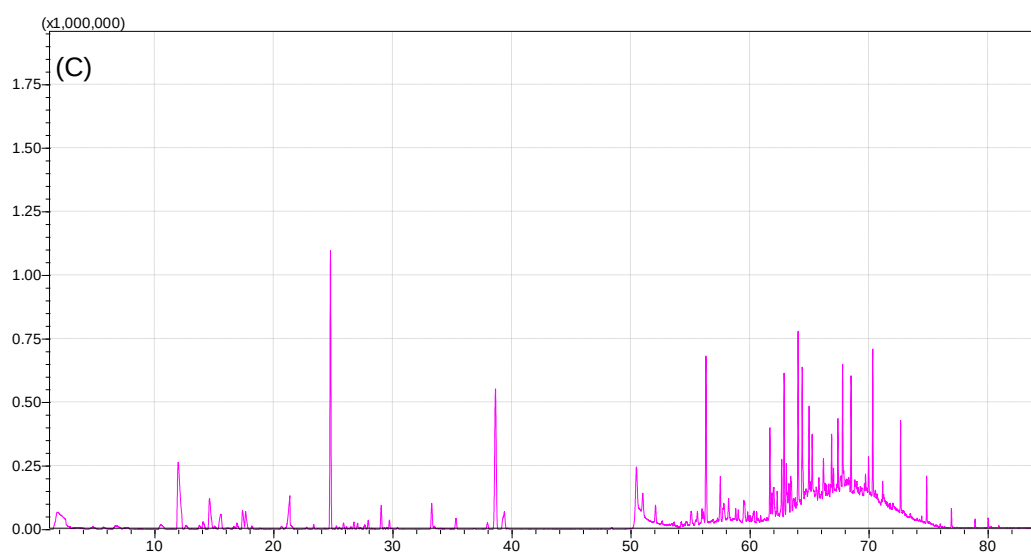
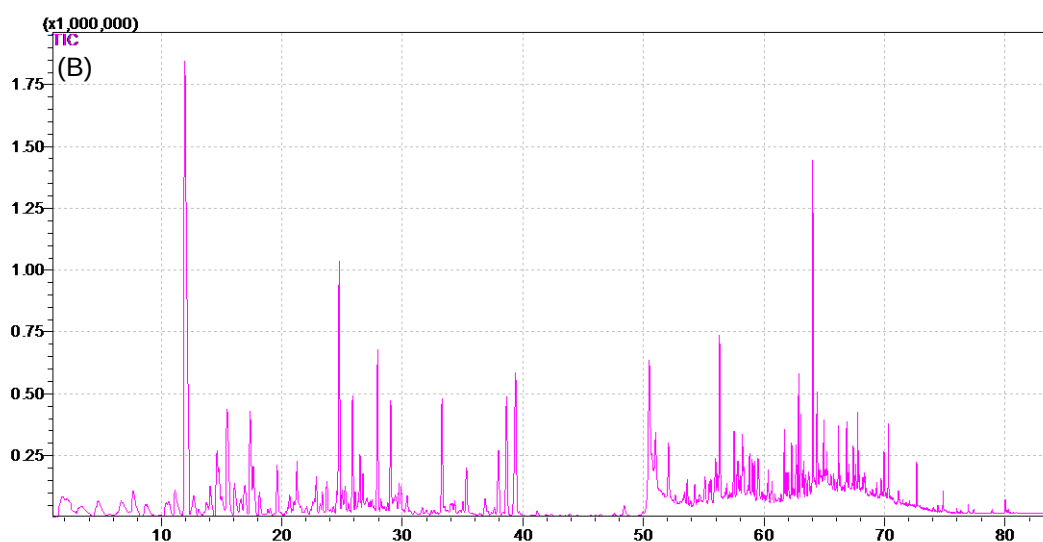
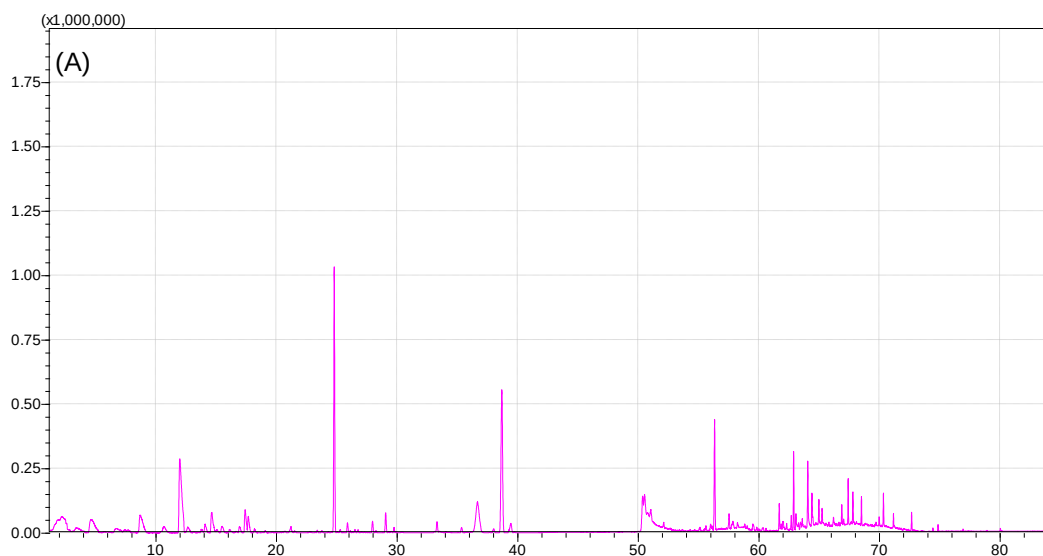
Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

APÊNDICE B – Cromatogramas obtidos para os diferentes revestimentos das fibras testadas durante a etapa de padronização da metodologia de extração dos compostos voláteis. (A) PA; (B) CAR/PDMS; (C) DVB/CAR/PDMS; (D) PDMS/DVB.

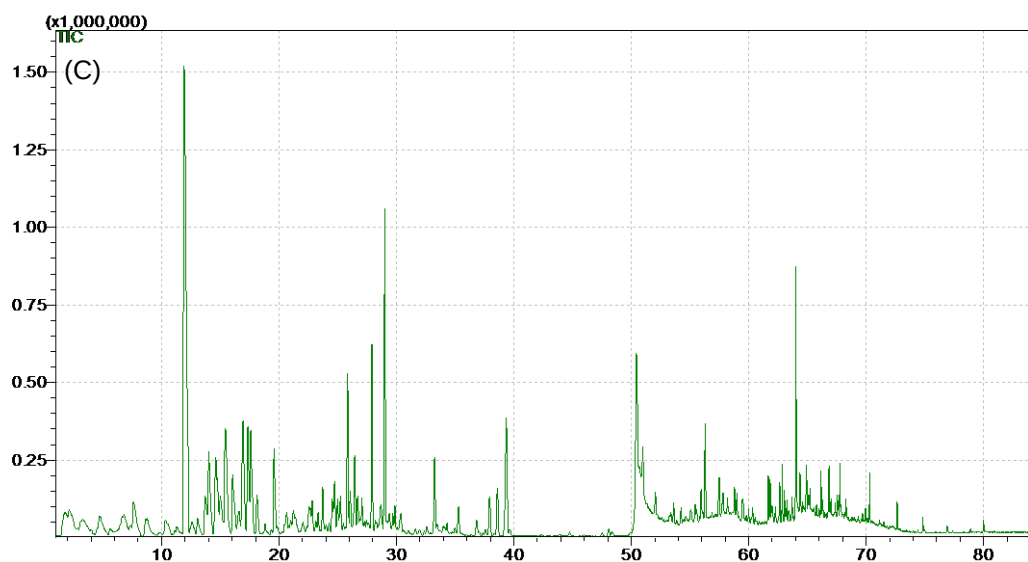
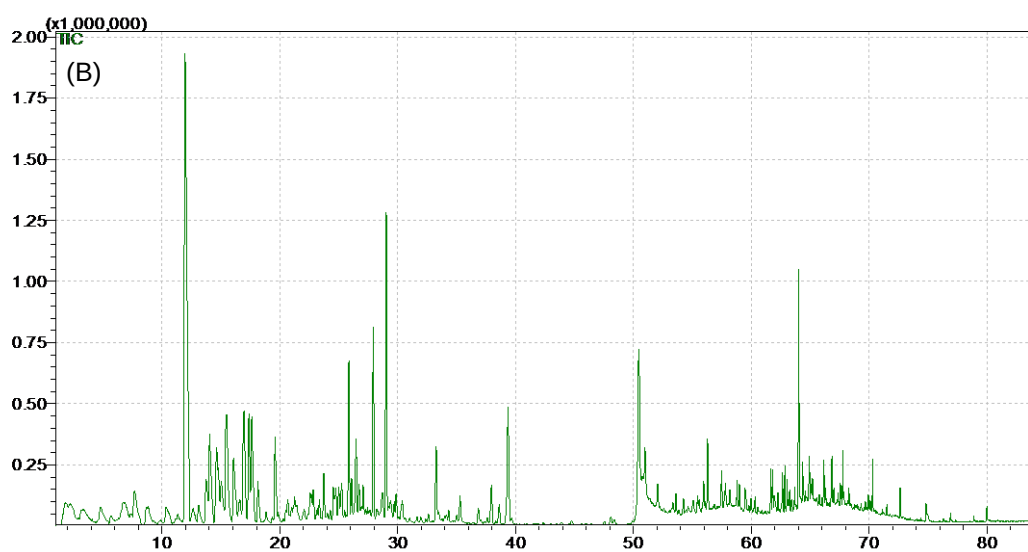
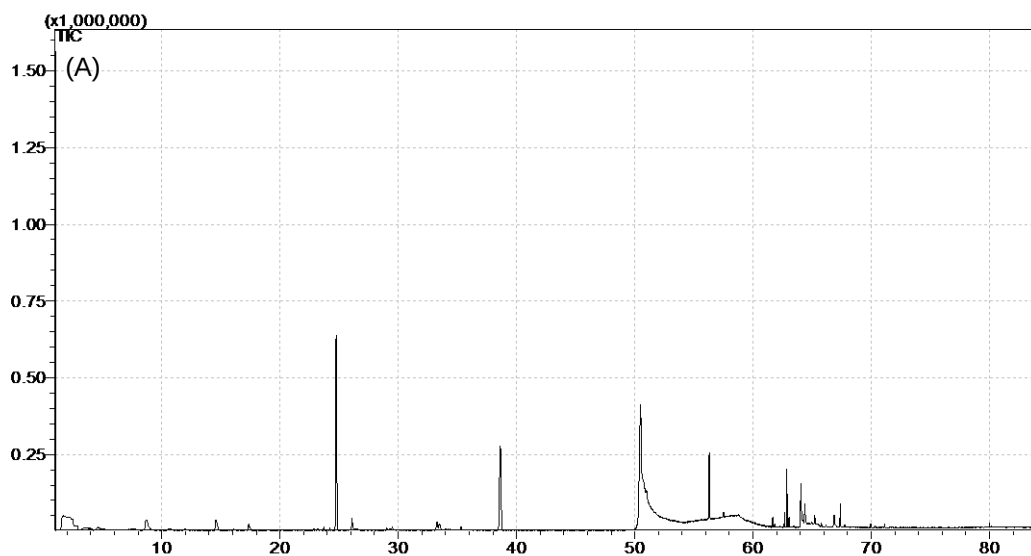


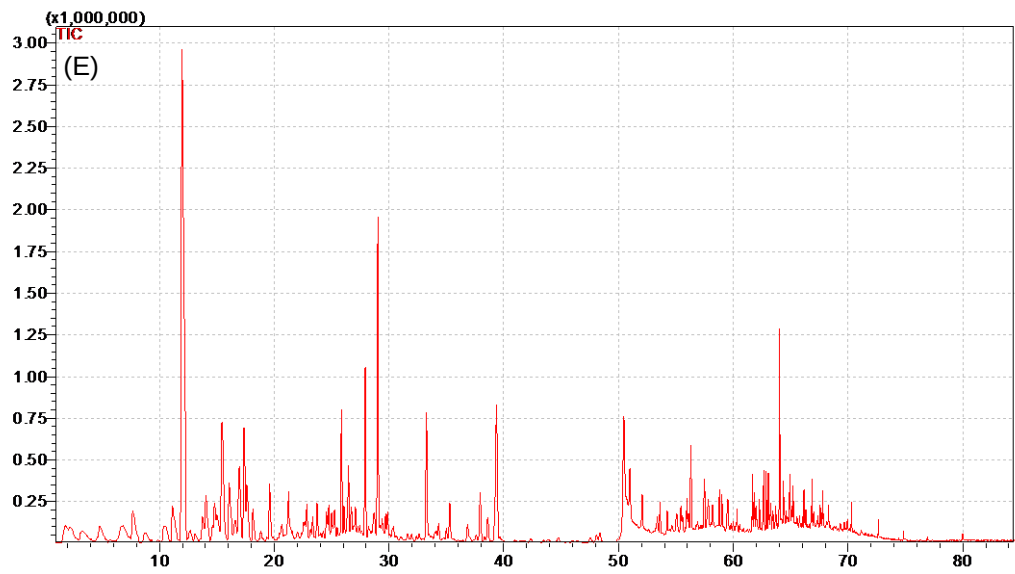
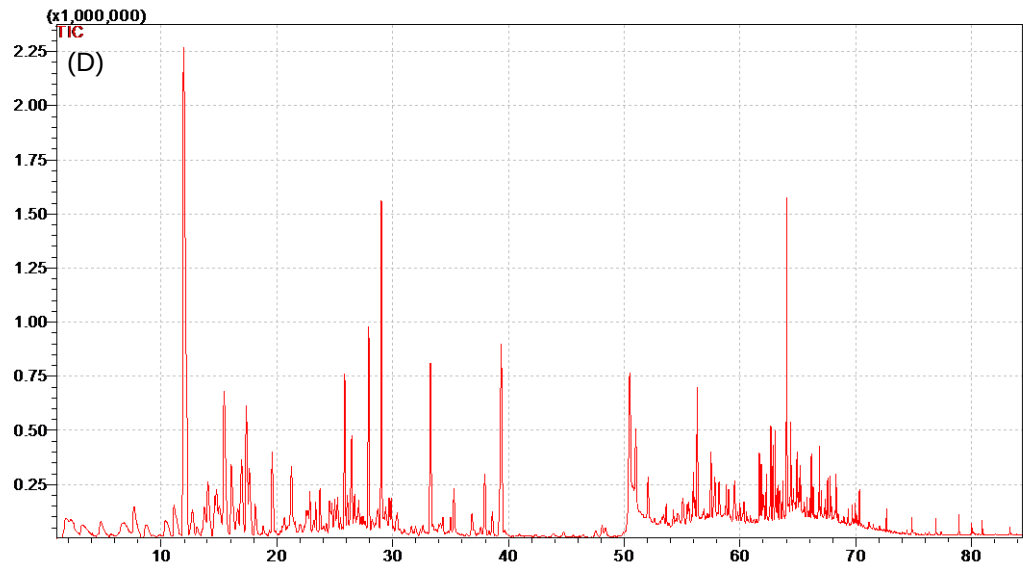


APÊNDICE C – Cromatogramas obtidos para os diferentes tempos testados durante a etapa de padronização da metodologia de extração dos compostos voláteis com fibra revestida por PDMS/DVB. (A) 18 minutos; (B) 30 minutos; (C) 40 minutos.



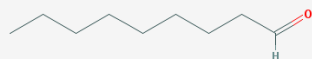
APÊNDICE D – Cromatogramas obtidos na diferentes réplicas para as três amostras. (A) controle negativo; (B) e (C) camundongo não infectado; (D) e (E) camundongo infectado.





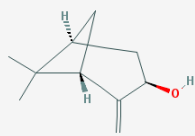
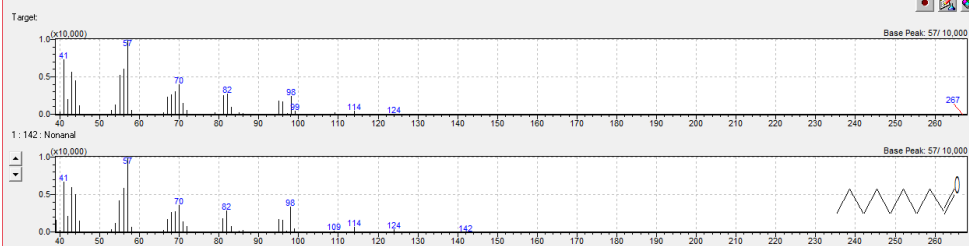
APÊNDICE E – Estruturas moleculares dos compostos voláteis identificados e comparação dos espectros de massas dos compostos (superiores) com as bibliotecas utilizadas (inferiores). Porcentagens indicam o grau de similaridade dos compostos e os contaminantes identificados encontram-se sinalizados (*).

Composto	Espectros de massas																																																																						
<chem>CCCCCCCC=O</chem> octanal – 91%	<table><thead><tr><th>Hit</th><th>Similar</th><th>Regi</th><th>Compound Name</th><th>Mol Wt</th><th>Formula</th><th>Library</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>90</td><td>✓</td><td>Octanal</td><td>128</td><td>C8H16O</td><td>NIST21.LIB</td></tr><tr><td>2</td><td>90</td><td></td><td>Octanal (CAS) n-Octanal \$S n-Octyl \$S Anti</td><td>128</td><td>C8H16O</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>3</td><td>90</td><td></td><td>n-OCTANAL \$S CAPRILIC ALDEHYDE \$S</td><td>128</td><td>C8H16O</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>4</td><td>89</td><td></td><td>OCTANAL \$S</td><td>128</td><td>C8H16O</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>5</td><td>89</td><td></td><td>Octanal</td><td>128</td><td>C8H16O</td><td>NIST21.LIB</td></tr><tr><td>6</td><td>89</td><td></td><td>OCTANAL \$S</td><td>128</td><td>C8H16O</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>7</td><td>89</td><td></td><td>OCTANAL \$S</td><td>128</td><td>C8H16O</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>8</td><td>89</td><td></td><td>Octanal \$S n-Caprylaldehyde \$S n-Octaldehyd</td><td>128</td><td>C8H16O</td><td>NIST107.LIB</td></tr><tr><td>9</td><td>89</td><td></td><td>Octanal <n> \$S Octanal</td><td>128</td><td>C8H16O</td><td>FFNSC1.3.LIB</td></tr></tbody></table> Target: 1: 128: Octanal	Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library	1	90	✓	Octanal	128	C8H16O	NIST21.LIB	2	90		Octanal (CAS) n-Octanal \$S n-Octyl \$S Anti	128	C8H16O	WILEY229.LI	3	90		n-OCTANAL \$S CAPRILIC ALDEHYDE \$S	128	C8H16O	WILEY229.LI	4	89		OCTANAL \$S	128	C8H16O	WILEY229.LI	5	89		Octanal	128	C8H16O	NIST21.LIB	6	89		OCTANAL \$S	128	C8H16O	WILEY229.LI	7	89		OCTANAL \$S	128	C8H16O	WILEY229.LI	8	89		Octanal \$S n-Caprylaldehyde \$S n-Octaldehyd	128	C8H16O	NIST107.LIB	9	89		Octanal <n> \$S Octanal	128	C8H16O	FFNSC1.3.LIB
Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library																																																																	
1	90	✓	Octanal	128	C8H16O	NIST21.LIB																																																																	
2	90		Octanal (CAS) n-Octanal \$S n-Octyl \$S Anti	128	C8H16O	WILEY229.LI																																																																	
3	90		n-OCTANAL \$S CAPRILIC ALDEHYDE \$S	128	C8H16O	WILEY229.LI																																																																	
4	89		OCTANAL \$S	128	C8H16O	WILEY229.LI																																																																	
5	89		Octanal	128	C8H16O	NIST21.LIB																																																																	
6	89		OCTANAL \$S	128	C8H16O	WILEY229.LI																																																																	
7	89		OCTANAL \$S	128	C8H16O	WILEY229.LI																																																																	
8	89		Octanal \$S n-Caprylaldehyde \$S n-Octaldehyd	128	C8H16O	NIST107.LIB																																																																	
9	89		Octanal <n> \$S Octanal	128	C8H16O	FFNSC1.3.LIB																																																																	
<chem>CC1=CCC(CC1)C(=C)C</chem> limoneno – 85%	<table><thead><tr><th>Hit</th><th>Similar</th><th>Regi</th><th>Compound Name</th><th>Mol Wt</th><th>Formula</th><th>Library</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>85</td><td>✓</td><td>LIMONENE \$S</td><td>136</td><td>C10H16</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>2</td><td>83</td><td></td><td>Limonene \$S Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-met</td><td>136</td><td>C10H16</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>3</td><td>83</td><td></td><td>LIMONEN-10-OL \$S</td><td>150</td><td>C10H14O</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>4</td><td>82</td><td></td><td>Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (S)</td><td>136</td><td>C10H16</td><td>NIST21.LIB</td></tr><tr><td>5</td><td>81</td><td></td><td>LIMONENE \$S</td><td>136</td><td>C10H16</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>6</td><td>80</td><td></td><td>LIMONENE \$S</td><td>136</td><td>C10H16</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>7</td><td>80</td><td></td><td>1,7-Octadiene, 3-methylene- \$S 3-Methylene-1</td><td>122</td><td>C9H14</td><td>NIST08.LIB</td></tr><tr><td>8</td><td>80</td><td></td><td>Limonene \$S Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-meth</td><td>136</td><td>C10H16</td><td>FFNSC1.3.LIB</td></tr><tr><td>9</td><td>80</td><td></td><td>1,7-Octadiene, 3-methylene- \$S</td><td>122</td><td>C9H14</td><td>NIST107.LIB</td></tr></tbody></table> Target: 1: 136: LIMONENE \$S	Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library	1	85	✓	LIMONENE \$S	136	C10H16	WILEY229.LI	2	83		Limonene \$S Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-met	136	C10H16	WILEY229.LI	3	83		LIMONEN-10-OL \$S	150	C10H14O	WILEY229.LI	4	82		Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (S)	136	C10H16	NIST21.LIB	5	81		LIMONENE \$S	136	C10H16	WILEY229.LI	6	80		LIMONENE \$S	136	C10H16	WILEY229.LI	7	80		1,7-Octadiene, 3-methylene- \$S 3-Methylene-1	122	C9H14	NIST08.LIB	8	80		Limonene \$S Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-meth	136	C10H16	FFNSC1.3.LIB	9	80		1,7-Octadiene, 3-methylene- \$S	122	C9H14	NIST107.LIB
Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library																																																																	
1	85	✓	LIMONENE \$S	136	C10H16	WILEY229.LI																																																																	
2	83		Limonene \$S Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-met	136	C10H16	WILEY229.LI																																																																	
3	83		LIMONEN-10-OL \$S	150	C10H14O	WILEY229.LI																																																																	
4	82		Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (S)	136	C10H16	NIST21.LIB																																																																	
5	81		LIMONENE \$S	136	C10H16	WILEY229.LI																																																																	
6	80		LIMONENE \$S	136	C10H16	WILEY229.LI																																																																	
7	80		1,7-Octadiene, 3-methylene- \$S 3-Methylene-1	122	C9H14	NIST08.LIB																																																																	
8	80		Limonene \$S Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-meth	136	C10H16	FFNSC1.3.LIB																																																																	
9	80		1,7-Octadiene, 3-methylene- \$S	122	C9H14	NIST107.LIB																																																																	
<chem>CN1C=NC2=C1C(=N2)C</chem> tetrametilpirazina – 89%	<table><thead><tr><th>Hit</th><th>Similar</th><th>Regi</th><th>Compound Name</th><th>Mol Wt</th><th>Formula</th><th>Library</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>89</td><td>✓</td><td>Pyrazine, tetramethyl- (CAS) Tetramethylpyra</td><td>136</td><td>C8H12N2</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>2</td><td>89</td><td></td><td>Liquorice \$S Pyrazine, tetramethyl-</td><td>136</td><td>C8H12N2</td><td>FFNSC1.3.LIB</td></tr><tr><td>3</td><td>88</td><td></td><td>Pyrazine, tetramethyl-</td><td>136</td><td>C8H12N2</td><td>NIST21.LIB</td></tr><tr><td>4</td><td>88</td><td></td><td>Pyrazine, tetramethyl- (CAS) Tetramethylpyrazi</td><td>136</td><td>C8H12N2</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>5</td><td>87</td><td></td><td>Pyrazine, tetramethyl- (CAS) Tetramethylpyrazi</td><td>136</td><td>C8H12N2</td><td>WILEY229.LI</td></tr><tr><td>6</td><td>87</td><td></td><td>Pyrazine, tetramethyl-</td><td>136</td><td>C8H12N2</td><td>NIST21.LIB</td></tr><tr><td>7</td><td>87</td><td></td><td>Pyrazine, tetramethyl- \$S BS Factor \$S Tetram</td><td>136</td><td>C8H12N2</td><td>NIST107.LIB</td></tr><tr><td>8</td><td>87</td><td></td><td>Pyrazine, tetramethyl- \$S BS Factor \$S Tetram</td><td>136</td><td>C8H12N2</td><td>NIST08.LIB</td></tr><tr><td>9</td><td>86</td><td></td><td>2,3,5,6-TETRAMETHYL PYRAZINE \$S</td><td>136</td><td>C8H12N2</td><td>WILEY229.LI</td></tr></tbody></table> Target: 1: 136: Pyrazine, tetramethyl- (CAS) Tetramethylpyrazine \$S BS Factor \$S 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine \$S tetramethyl pyrazine \$S	Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library	1	89	✓	Pyrazine, tetramethyl- (CAS) Tetramethylpyra	136	C8H12N2	WILEY229.LI	2	89		Liquorice \$S Pyrazine, tetramethyl-	136	C8H12N2	FFNSC1.3.LIB	3	88		Pyrazine, tetramethyl-	136	C8H12N2	NIST21.LIB	4	88		Pyrazine, tetramethyl- (CAS) Tetramethylpyrazi	136	C8H12N2	WILEY229.LI	5	87		Pyrazine, tetramethyl- (CAS) Tetramethylpyrazi	136	C8H12N2	WILEY229.LI	6	87		Pyrazine, tetramethyl-	136	C8H12N2	NIST21.LIB	7	87		Pyrazine, tetramethyl- \$S BS Factor \$S Tetram	136	C8H12N2	NIST107.LIB	8	87		Pyrazine, tetramethyl- \$S BS Factor \$S Tetram	136	C8H12N2	NIST08.LIB	9	86		2,3,5,6-TETRAMETHYL PYRAZINE \$S	136	C8H12N2	WILEY229.LI
Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library																																																																	
1	89	✓	Pyrazine, tetramethyl- (CAS) Tetramethylpyra	136	C8H12N2	WILEY229.LI																																																																	
2	89		Liquorice \$S Pyrazine, tetramethyl-	136	C8H12N2	FFNSC1.3.LIB																																																																	
3	88		Pyrazine, tetramethyl-	136	C8H12N2	NIST21.LIB																																																																	
4	88		Pyrazine, tetramethyl- (CAS) Tetramethylpyrazi	136	C8H12N2	WILEY229.LI																																																																	
5	87		Pyrazine, tetramethyl- (CAS) Tetramethylpyrazi	136	C8H12N2	WILEY229.LI																																																																	
6	87		Pyrazine, tetramethyl-	136	C8H12N2	NIST21.LIB																																																																	
7	87		Pyrazine, tetramethyl- \$S BS Factor \$S Tetram	136	C8H12N2	NIST107.LIB																																																																	
8	87		Pyrazine, tetramethyl- \$S BS Factor \$S Tetram	136	C8H12N2	NIST08.LIB																																																																	
9	86		2,3,5,6-TETRAMETHYL PYRAZINE \$S	136	C8H12N2	WILEY229.LI																																																																	

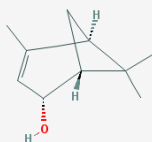
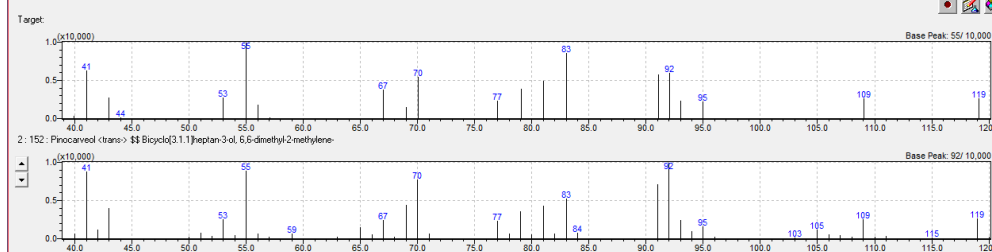


nonanal – 97%

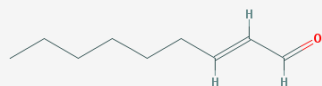
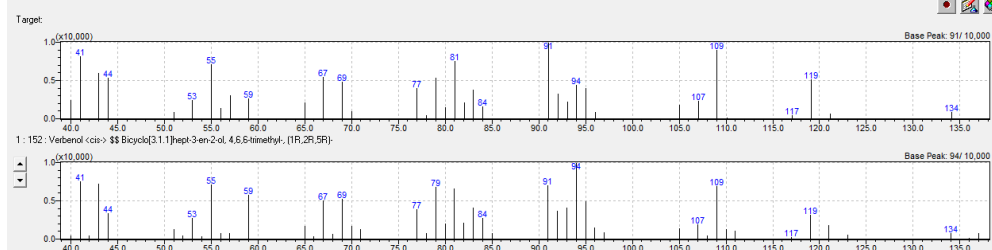
Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	97	✓	Nonanal	142	C ₉ H ₁₈ O	NIST13.LIB
2	97		NONANAL \$S	142	C ₉ H ₁₈ O	WILEY229.LI
3	97		NONANAL \$S	142	C ₉ H ₁₈ O	WILEY229.LI
4	96		Nonanal	142	C ₉ H ₁₈ O	NIST13.LIB
5	96		Nonanal (CAS) n-Nonanal \$S n-Nonylaldehyde	142	C ₉ H ₁₈ O	WILEY229.LI
6	96		Nonanal	142	C ₉ H ₁₈ O	NIST13.LIB
7	95		Nonanal <n> \$S Nonanal	142	C ₉ H ₁₈ O	FFNSC1.3.LIB
8	95		Nonanal \$S n-Nonanal \$S n-Nonanal \$S	142	C ₉ H ₁₈ O	NIST08.LIB
9	95		Nonanal (CAS) n-Nonanal \$S n-Nonylaldehyde	142	C ₉ H ₁₈ O	WILEY229.LI

*trans*-pinocarveol – 84%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	85	✓	Isopropenylcarveol \$S Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6	152	C ₁₀ H ₁₆ O	WILEY229.LI
2	82	✓	Pinocarveol <trans> \$S Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6	152	C ₁₀ H ₁₆ O	FFNSC1.3.LIB
3	83		Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methyl	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST08.LIB
4	83		trans-Pinocarveol \$S Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol	152	C ₁₀ H ₁₆ O	WILEY229.LI
5	83		Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methyl	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST107.LIB
6	83		trans-Pinocarveol \$S Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol	152	C ₁₀ H ₁₆ O	WILEY229.LI
7	83		Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methyl	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST08.LIB
8	83		Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methyl	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST107.LIB
9	82		trans-Pinocarveol \$S Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol	152	C ₁₀ H ₁₆ O	WILEY229.LI

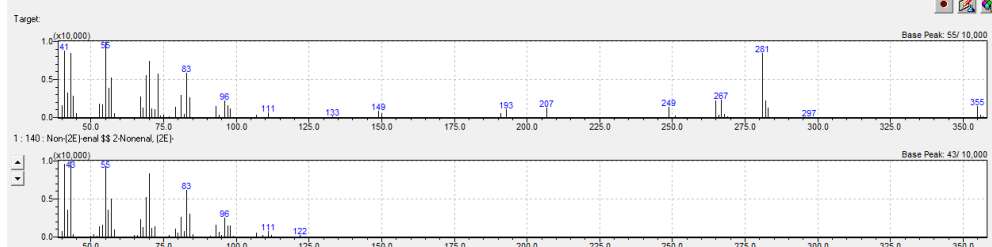
*cis*-verbenol – 89%

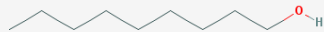
Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	89	✓	Verbenol <cis> \$S Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol	152	C ₁₀ H ₁₆ O	FFNSC1.3.LIB
2	87		Verbenol \$S 4,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept	152	C ₁₀ H ₁₆ O	WILEY229.LI
3	87		Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-trimethyl-, [1	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST08.LIB
4	86		Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-trimethyl-, [1	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST107.LIB
5	86		Verbenol <trans> \$S Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2	152	C ₁₀ H ₁₆ O	FFNSC1.3.LIB
6	86		CIS-VERBENOL \$S	152	C ₁₀ H ₁₆ O	WILEY229.LI
7	84		Verbenol \$S 4,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept	152	C ₁₀ H ₁₆ O	WILEY229.LI
8	84		Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-trimethyl-, \$S	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST107.LIB
9	84		Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-trimethyl-, \$S	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST08.LIB



2-nonenal – 81%

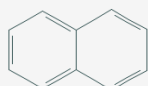
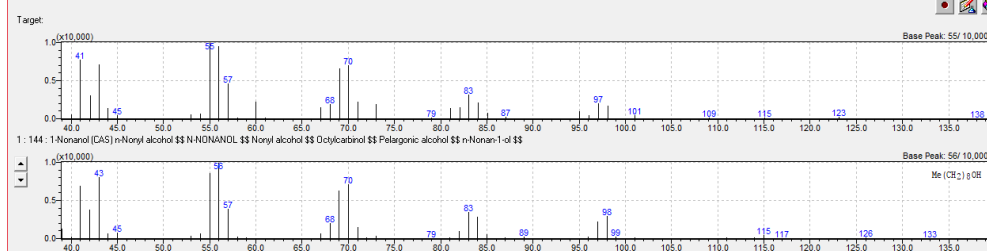
Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	81	✓	Non-(2E)enol \$S 2-Nonenal, (2E)-	140	C ₉ H ₁₆ O	FFNSC1.3.LIB
2	80		2-Nonenal, (E)- \$S (E)-2-Nonenal \$S trans-2-N	140	C ₉ H ₁₆ O	NIST08.LIB
3	80		TRANS-2-NONENAL \$S	140	C ₉ H ₁₆ O	WILEY229.LI
4	80		2-Nonenal, (E)-	140	C ₉ H ₁₆ O	NIST13.LIB
5	79		NONENAL \$S	140	C ₉ H ₁₆ O	WILEY229.LI
6	77		2-Nonenal, (E)-	140	C ₉ H ₁₆ O	NIST13.LIB
7	77		2-Nonenal, (E)- (CAS) trans-2-Nonenal \$S (E)-2	140	C ₉ H ₁₆ O	WILEY229.LI
8	76		2-Tridecenal, (E)- \$S (2E)-2-Tridecenal # \$S	196	C ₁₃ H ₂₄ O	NIST08.LIB
9	76		TRANS-2-TRIDECENAL \$S E-2-tridecenal \$S	196	C ₁₃ H ₂₄ O	WILEY229.LI





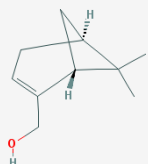
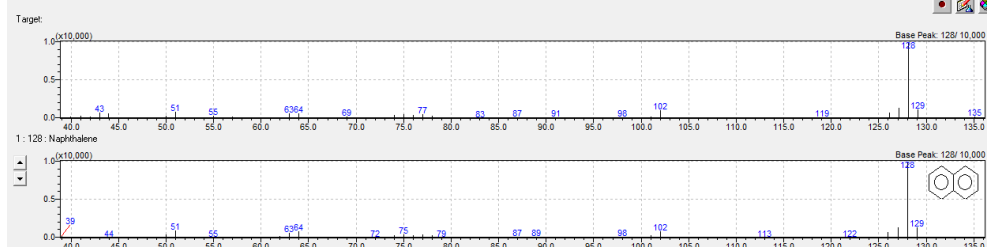
1-nonanol – 91%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	92	✓	1-Nonanol (CAS) n-Nonyl alcohol \$ N-NONA	144	C ₉ H ₂₀ O	WILEY229.LI
2	91	✓	1-Nonanol (CAS) n-Nonyl alcohol \$ N-NONA	144	C ₉ H ₂₀ O	WILEY229.LI
3	91	✓	1-Nonanol	144	C ₉ H ₂₀ O	NIST21.LIB
4	91	✓	Nonanol (CAS) Nonyl alcohol \$	144	C ₉ H ₂₀ O	WILEY229.LI
5	91	✓	1-Nonanol (CAS) n-Nonyl alcohol \$ N-NONA	144	C ₉ H ₂₀ O	WILEY229.LI
6	91	✓	1-Nonanol	144	C ₉ H ₂₀ O	NIST21.LIB
7	91	✓	Nonanol \$ Nonyl alcohol \$	144	C ₉ H ₂₀ O	NIST107.LIB
8	91	✓	Nonanol	144	C ₉ H ₂₀ O	NIST21.LIB
9	91	✓	1-Nonanol \$ Nonyl alcohol \$ n-Nonyl alcoh	144	C ₉ H ₂₀ O	NIST08.LIB



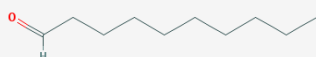
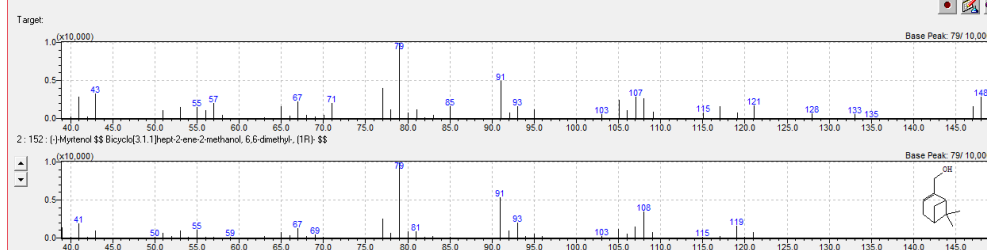
naftaleno – 91%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	91	✓	Naphthalene	128	C ₁₀ H ₈	NIST21.LIB
2	90	✓	Naphthalene	128	C ₁₀ H ₈	NIST21.LIB
3	90	✓	AZULENE \$	128	C ₁₀ H ₈	WILEY229.LI
4	89	✓	Naphthalene (CAS) White tar \$ NAPHTALIN	128	C ₁₀ H ₈	WILEY229.LI
5	89	✓	Azylene (CAS) Cyclopentacycloheptene \$ B	128	C ₁₀ H ₈	WILEY229.LI
6	89	✓	Azylene	128	C ₁₀ H ₈	NIST21.LIB
7	89	✓	Naphthalene (CAS) White tar \$ NAPHTALIN	128	C ₁₀ H ₈	WILEY229.LI
8	88	✓	Azylene \$ Bicyclo[3.3.0]hept-2-ene \$ Cy	128	C ₁₀ H ₈	NIST08.LIB
9	88	✓	Naphthalene \$ Albocarbon \$ Decodorator \$	128	C ₁₀ H ₈	NIST08.LIB



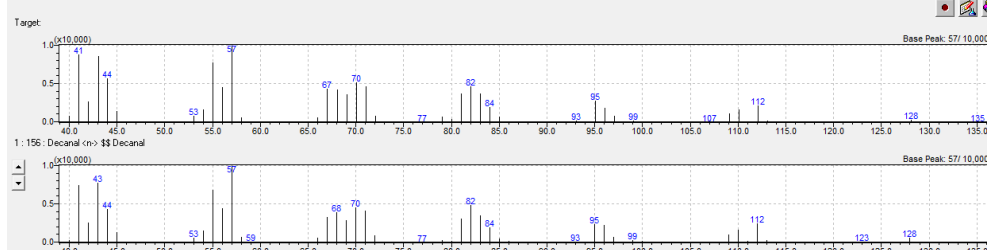
(-)-mirtenol – 82%

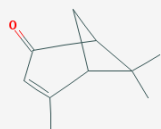
Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	83	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimet	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST21.LIB
2	82	✓	(-)-Mirtenol \$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-met	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST08.LIB
3	81	✓	Myrtene \$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-metha	152	C ₁₀ H ₁₆ O	WILEY229.LI
4	81	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimet	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST21.LIB
5	81	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimet	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST107.LIB
6	81	✓	MYRTENOL \$	152	C ₁₀ H ₁₆ O	WILEY229.LI
7	81	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimet	152	C ₁₀ H ₁₆ O	NIST21.LIB
8	81	✓	Myrtene \$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-metha	152	C ₁₀ H ₁₆ O	WILEY229.LI
9	81	✓	Myrtene \$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-carbox	150	C ₁₀ H ₁₄ O	FFNSC1.3.IB



decanal – 96%

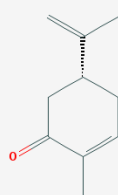
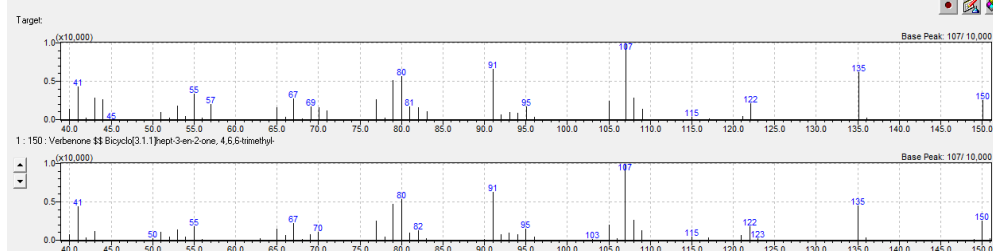
Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	93	✓	Decanal (CAS) \$ Decanal	156	C ₁₀ H ₂₀ O	WILEY229.LI
2	96	✓	DECANAL \$	156	C ₁₀ H ₂₀ O	WILEY229.LI
3	96	✓	DECANAL \$	156	C ₁₀ H ₂₀ O	WILEY229.LI
4	95	✓	Decanal (CAS) n-Decanal \$ Decyl aldehyde	156	C ₁₀ H ₂₀ O	WILEY229.LI
5	95	✓	Decanal	156	C ₁₀ H ₂₀ O	NIST21.LIB
6	95	✓	N-DECANAL \$ CAPRIC ALDEHYDE \$	156	C ₁₀ H ₂₀ O	WILEY229.LI
7	93	✓	Decanal	156	C ₁₀ H ₂₀ O	NIST21.LIB
8	93	✓	Decanal (CAS) n-Decanal \$ Decyl aldehyde	156	C ₁₀ H ₂₀ O	WILEY229.LI
9	93	✓	Decanal \$ n-Decaldehyde \$ n-Decanal \$	156	C ₁₀ H ₂₀ O	NIST08.LIB





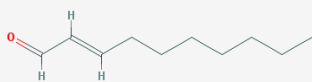
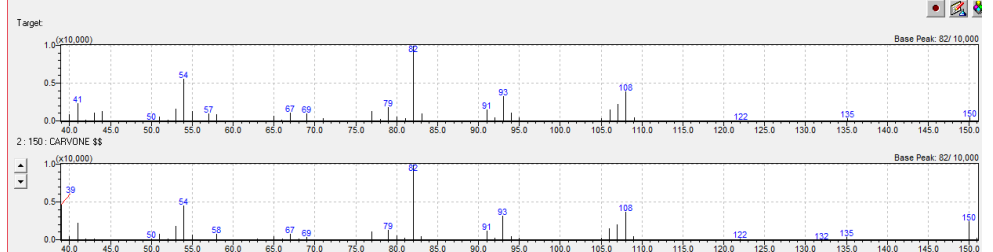
verbenona – 91%

RT	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	91	✓	Verbenone \$S\$ Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one	150	C ₁₀ H ₁₄ O	FFNSC1.3 lib
2	89	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	NIST1.LIB
3	89	✓	VERBENONE \$S\$	150	C ₁₀ H ₁₄ O	WILEY229.LI
4	89	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	NIST107.LIB
5	89	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	WILEY229.LI
6	89	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	NIST08.LIB
7	89	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	NIST1.LIB
8	88	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	NIST107.LIB
9	88	✓	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	NIST08.LIB



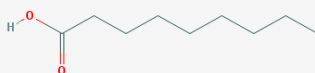
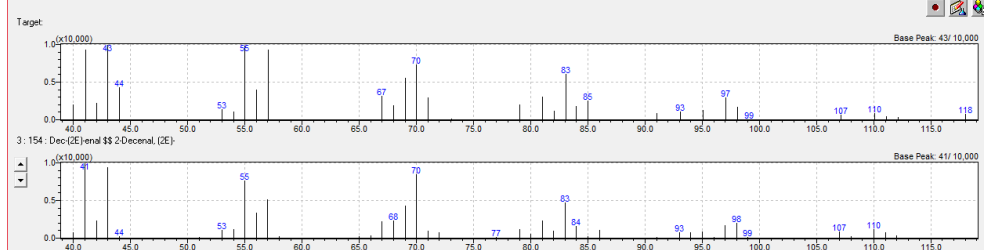
carvona – 92%

RT	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	93	✓	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	NIST1.LIB
2	92	✓	CARVONE \$S\$	150	C ₁₀ H ₁₄ O	WILEY229.LI
3	92	✓	Carvone \$S\$ 2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	FFNSC1.3 lib
4	91	✓	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	NIST1.LIB
5	91	✓	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	WILEY229.LI
6	91	✓	CARVONE \$S\$	150	C ₁₀ H ₁₄ O	WILEY229.LI
7	91	✓	CARVONE \$S\$	150	C ₁₀ H ₁₄ O	WILEY229.LI
8	90	✓	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	WILEY229.LI
9	90	✓	2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	150	C ₁₀ H ₁₄ O	NIST1.LIB



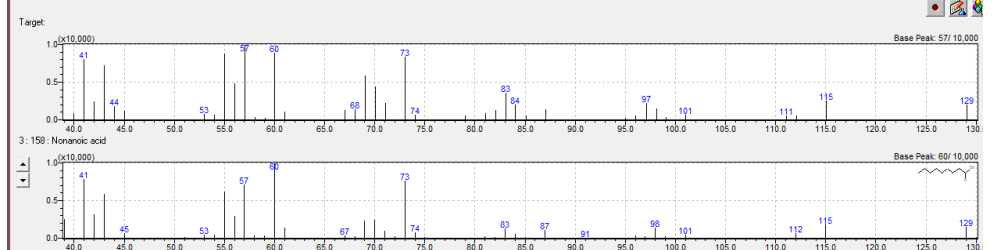
trans-2-decenal – 88%

RT	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	89	✓	Hexadecane, 1-chloro- (CAS) 1-Chlorohexadecane	260	C ₁₆ H ₃₃ Cl	WILEY229.LI
2	89	✓	Hexadecane, 1-chloro-	260	C ₁₆ H ₃₃ Cl	NIST1.LIB
3	88	✓	Dec-2-Enal \$S\$ 2-Decenal, (Z)-	154	C ₁₀ H ₁₈ O	FFNSC1.3 lib
4	88	✓	1-Pentadecene	210	C ₁₅ H ₃₀	NIST1.LIB
5	88	✓	3-Tetradecene, (Z)- (CAS)	196	C ₁₄ H ₂₈	WILEY229.LI
6	88	✓	3-Tetradecene, (Z)- \$S\$	196	C ₁₄ H ₂₈	NIST107.LIB
7	88	✓	3-Tetradecene, (Z)- \$S\$ (Z)-3-Tetradecene #	196	C ₁₄ H ₂₈	NIST08.LIB
8	88	✓	1-Hepadecenal (CAS) n-Hepadecenal \$S\$ He	256	C ₁₇ H ₃₄ O	WILEY229.LI
9	88	✓	1-Dodecene (CAS) Adacene 12 \$S\$ n-Dodec-1	168	C ₁₂ H ₂₄	WILEY229.LI



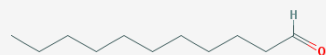
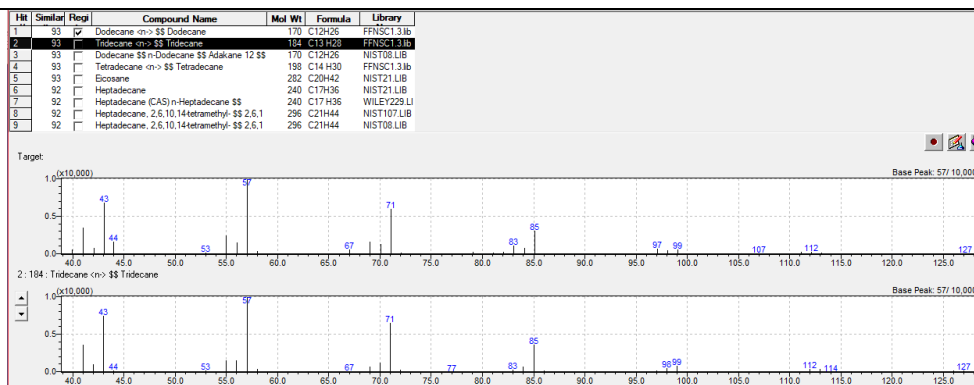
ácido nonanóico – 88%

RT	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	91	✓	9-Octadecenoic acid (Z)- (CAS) Oleic acid \$S\$	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	WILEY229.LI
2	88	✓	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	WILEY229.LI
3	88	✓	Nonanoic acid	158	C ₉ H ₁₈ O ₂	WILEY229.LI
4	88	✓	Nonanoic acid (CAS) Nonanoic acid \$S\$ Nonylic	158	C ₉ H ₁₈ O ₂	WILEY229.LI
5	88	✓	Octadecanoic acid	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	NIST1.LIB
6	88	✓	Hexadecanoic acid (CAS) Palmitic acid \$S\$ Pal	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	WILEY229.LI
7	88	✓	Octadecanoic acid (CAS) Stearic acid \$S\$ n-O	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	WILEY229.LI
8	88	✓	n-Hexadecanoic acid	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	NIST1.LIB
9	87	✓	Docosanoic acid (CAS) Behenic acid \$S\$ Glyc	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	WILEY229.LI

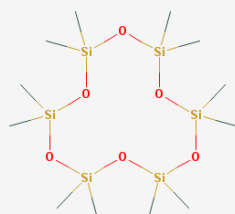
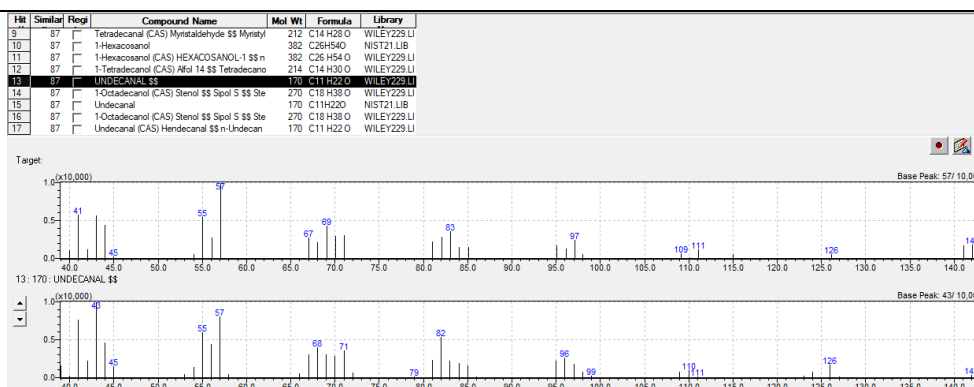
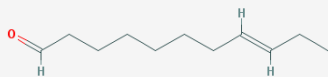
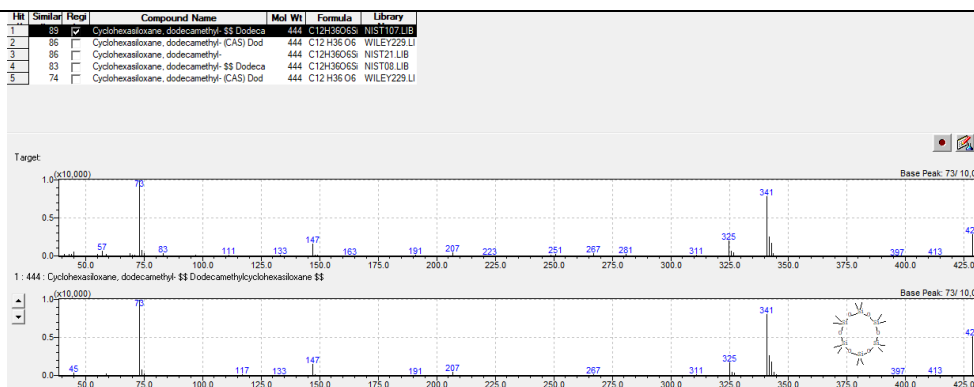




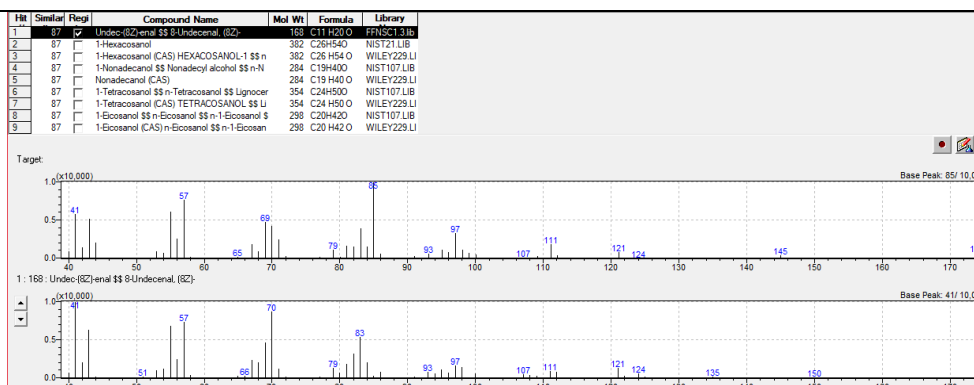
tridecano – 93%



undecanal – 87%

*dodecametilciclohexa
siloxano – 89%

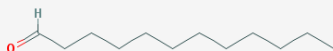
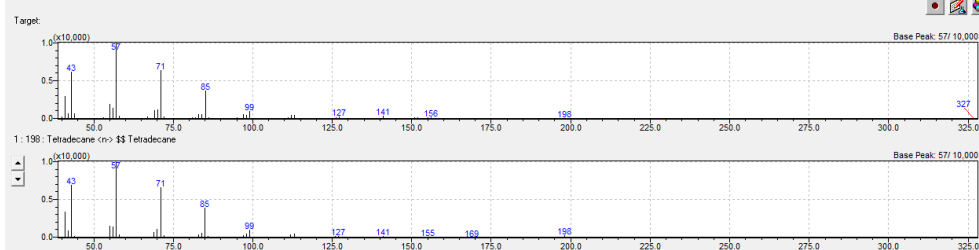
cis-8-undecen-1-al – 87%





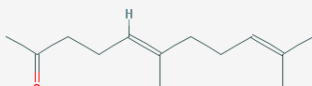
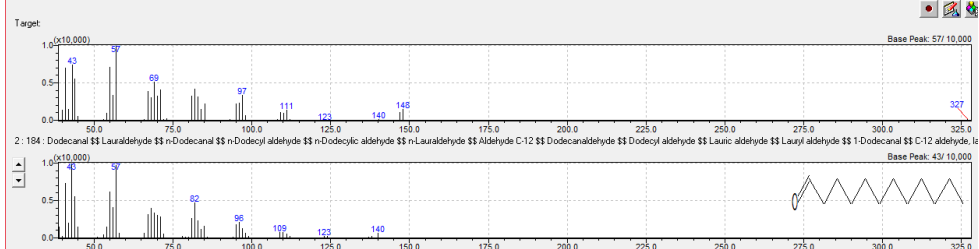
tetradecano – 96%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	96	☒	Tetradecane <=> \$S\$ Tetradecane	198	C14H30	FNNSC13ib
2	95		Pentadecane <=> \$S\$ Pentadecane	212	C15H32	
3	95		Hexadecane <=> \$S\$ Hexadecane	226	C16H34	FNNSC13ib
4	95		Heptadecane <=> \$S\$ Heptadecane	240	C17H36	FNNSC13ib
5	95		1-TETRADECANE \$S\$	198	C14H30	W11E229 ib
6	95		Pentadecane	212	C15H32	NIST17 ib
7	95		Tridecane <=> \$S\$ Tridecane	184	C13H28	
8	95		Tetradecane \$S\$ n-Tetradecane \$S\$	198	C14H30	NIST08 ib
9	95		Tetradecane \$S\$ n-Tetradecane \$S\$ Isotetradecane	198	C14H30	NIST107 ib



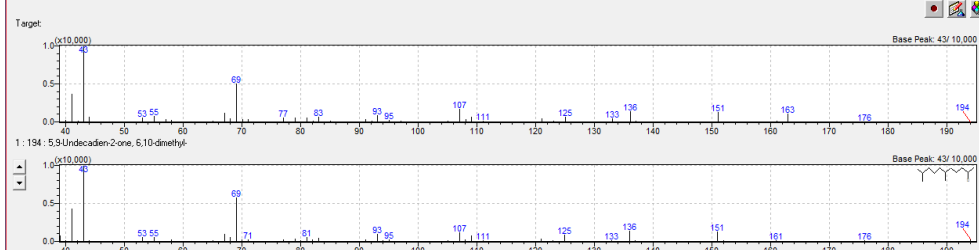
dodecanal – 91%

Id	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	91	☒	Tetradecanal (C14) Methylaldehyde \$S\$ Methyl\$	212	C14 H28 O	WILEY223.LIB
2	91	☐	Dodecane \$S\$ Lauraldehyde \$S\$ n-Dodecane	184	C12H24	NIST1170.LIB
3	91	☐	Dodecane (C12) n-Dodecane \$S\$ 1-Dodecan	184	C12 H24 O	WILEY223.LIB
4	91	☐	DODECANAL \$S\$	184	C12 H24 O	WILEY223.LIB
5	91	☐	Decanal <n> \$S\$ Decanal	156	C10 H20 O	FNIN3113.LIB
6	90	☐	Tetradecanal <n> \$S\$ Tetradecanal	212	C14 H28 O	FNIN3113.LIB
7	90	☐	Dodecane <n> \$S\$ Dodecane	184	C12 H24 O	FNIN3113.LIB
8	90	☐	DODECANAL \$S\$	198	C13 H26 O	FNIN3113.LIB
9	90	☐	Tridecanal	198	C13 H26 O	NIST117.LIB



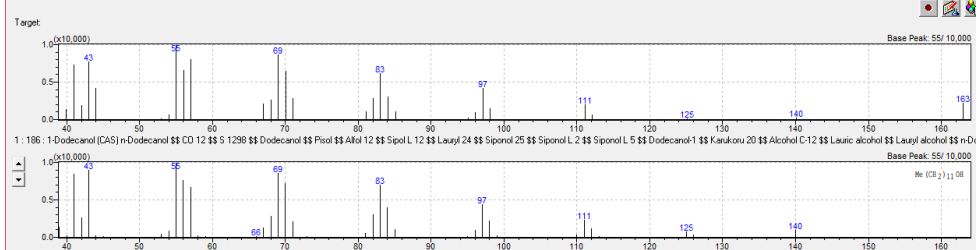
geranil acetona – 94%

Ht	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	94	✓	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-	194	C13H22O	NIST121Lib
2	91		5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (Z)-	194	C13H22O	WILEY225Lib
3	91		5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (Z)-	194	C13H22O	NIST121Lib
4	91		GERANYL ACETONE SS	194	C13H22O	WILEY225Lib
5	91		5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	194	C13H22O	NIST121Lib
6	91		5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	194	C13H22O	WILEY225Lib
7	91		5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E) SS	194	C13H22O	NIST121Lib
8	91		5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E) SS	194	C13H22O	NIST107Lib
9	90		Nonacosane S,S,5,9-Undecadien-2-one, E,10-	194	C13H22O	FNISJLib



dodecanol – 93%

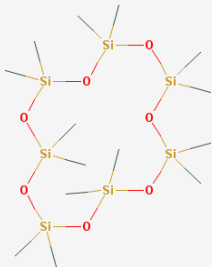
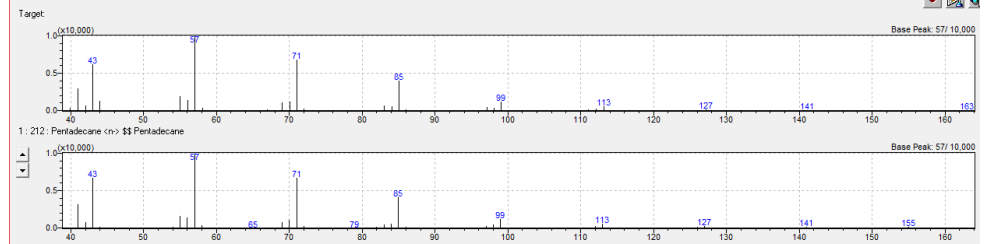
#	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	93	☒	1-Dodecanol (CAS) 11-Dodecanol \$5 CO 12 \$5	186	C12H26O	WILEY228.LIB
2	92	☐	1-Dodecanol	186	C12H26O	NIST121.LIB
3	92	☐	3-Hexadecene, (Z)-	224	C16H32	NIST21.LIB
4	92	☐	3-Hexadecene, (Z)- (CAS) 3-Hexadecene #	224	C16H32	NIST08.LIB
5	92	☐	3-Hexadecene, (Z)- (CAS) 3-Hexadecene	224	C16H32	WILEY228.LIB
6	92	☐	Tridecanol n-13 1-3 Tridecanol	200	C13H28O	FLNAC13a
7	92	☐	Tridecanol (CAS)	185	C12H24	WILEY228.LIB
8	92	☐	Cyclodecane	156	C10H24	NIST21.LIB
9	92	☐	1-Cyclodecanol	142	C16H34O	NIST21.LIB





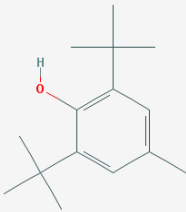
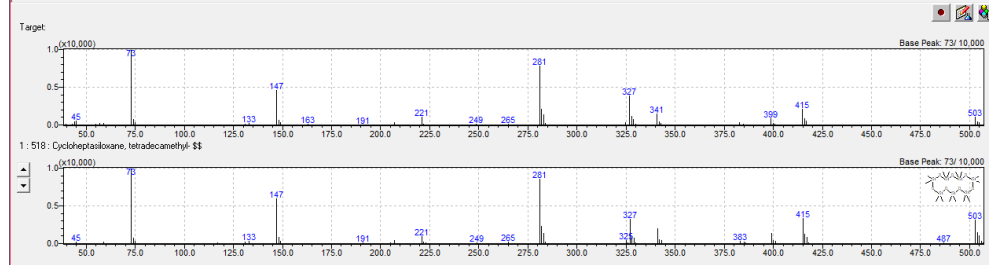
pentadecano – 96%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	96	✓	Pentadecane <n> \$ Pentadecane	212	C ₁₅ H ₃₂	FFNSC1.3.1b
2	96	✓	Hexadecane <n> \$ Hexadecane	226	C ₁₆ H ₃₄	FFNSC1.3.1b
3	95	✓	Heptadecane <n> \$ Heptadecane	240	C ₁₇ H ₃₆	FFNSC1.3.1b
4	95	✓	Tetradecane <n> \$ Tetradecane	198	C ₁₄ H ₃₀	FFNSC1.3.1b
5	95	✓	Tridecane <n> \$ Tridecane	184	C ₁₃ H ₂₈	FFNSC1.3.1b
6	95	✓	Octadecane <n> \$ Octadecane	254	C ₁₈ H ₃₈	FFNSC1.3.1b
7	94	✓	Pentadecane	212	C ₁₅ H ₃₂	NIST11.LIB
8	94	✓	N-TETRADECANE \$	198	C ₁₄ H ₃₀	WILEY229.LI
9	94	✓	Nonadecane <n> \$ Nonadecane	268	C ₁₉ H ₄₀	FFNSC1.3.1b



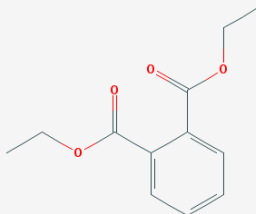
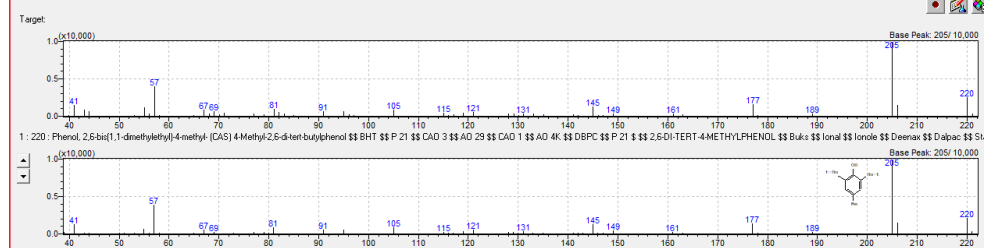
*tetradecametilciclohepta siloxano – 92%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	92	✓	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl- \$	518	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ S	NIST1107.LIB
2	92	✓	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl- \$ 2,2,4,4	518	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ S	NIST1107.LIB
3	92	✓	TETRADECAMETHYLCYCLOHEPTASILLOXA	518	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ S	WILEY229.LI
4	77	✓	3-isopropyl-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-trisiloxane	576	C ₁₈ H ₅₂ O ₇ S	NIST107.LIB
5	77	✓	3-isopropyl-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-trisiloxane	576	C ₁₈ H ₅₂ O ₇ S	NIST107.LIB
6	76	✓	TETRADECAMETHYLCYCLOHEPTASILLOXA	518	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ S	WILEY229.LI
7	74	✓	3-Butyl-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-trisiloxane	590	C ₁₉ H ₅₄ O ₇ S	NIST107.LIB
8	74	✓	3-Butyl-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-trisiloxane	590	C ₁₉ H ₅₄ O ₇ S	NIST107.LIB



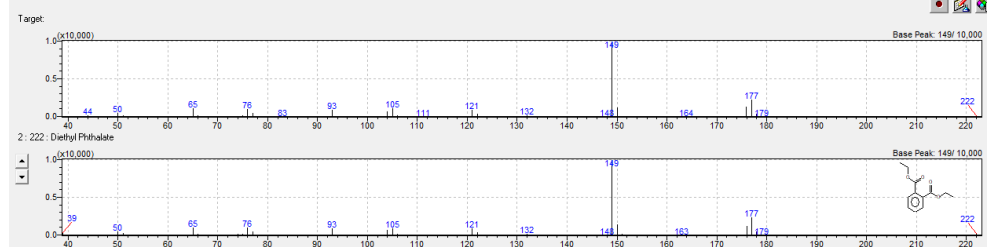
*4-metil-2,6-di-tert-butilfenol – 92%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	92	✓	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- CA	220	C ₁₅ H ₂₄ O	WILEY229.LI
2	90	✓	BHT \$ Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- CA	220	C ₁₅ H ₂₄ O	FFNSC1.3.1b
3	89	✓	Butylated Hydroxytoluene \$ Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- CA	220	C ₁₅ H ₂₄ O	NIST11.LIB
4	89	✓	Butylated Hydroxytoluene \$ Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- CA	220	C ₁₅ H ₂₄ O	NIST107.LIB
5	89	✓	Butylated Hydroxytoluene \$ Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- CA	220	C ₁₅ H ₂₄ O	NIST107.LIB
6	89	✓	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- CA	220	C ₁₅ H ₂₄ O	WILEY229.LI
7	89	✓	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- CA	220	C ₁₅ H ₂₄ O	WILEY229.LI
8	88	✓	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- CA	220	C ₁₅ H ₂₄ O	WILEY229.LI
9	88	✓	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl- CA	220	C ₁₅ H ₂₄ O	WILEY229.LI



*dietilftalato – 97%

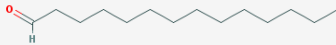
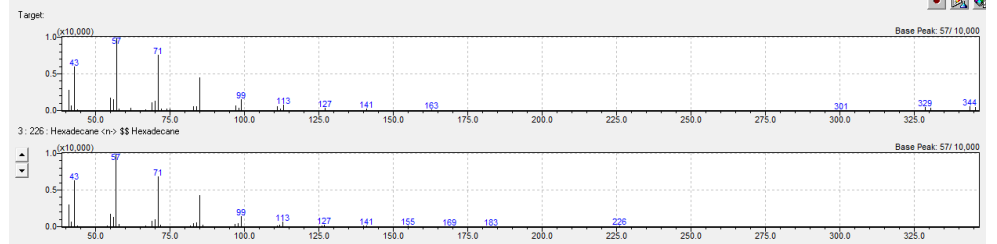
Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	93	✓	Benzoic acid <2>[(4-hydroxy-4-methylpentyl)]	343	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O	FFNSC1.3.1b
2	93	✓	Diethyl phthalate	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	NIST1107.LIB
3	96	✓	DIETHYL PHTHALATE \$	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	WILEY229.LI
4	96	✓	Phthalate <diethyl> \$ 1,2-Benzenedicarboxyl	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	FFNSC1.3.1b
5	96	✓	Diethyl Phthalate	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	NIST11.LIB
6	95	✓	Diethyl Phthalate \$ 1,2-Benzenedicarboxylic	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	NIST107.LIB
7	94	✓	Diethyl Phthalate \$ 1,2-Benzenedicarboxylic	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	NIST107.LIB
8	94	✓	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester (C	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	WILEY229.LI
9	93	✓	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester (C	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	WILEY229.LI





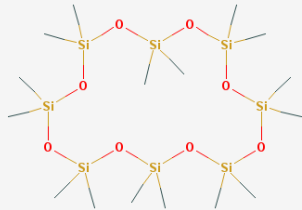
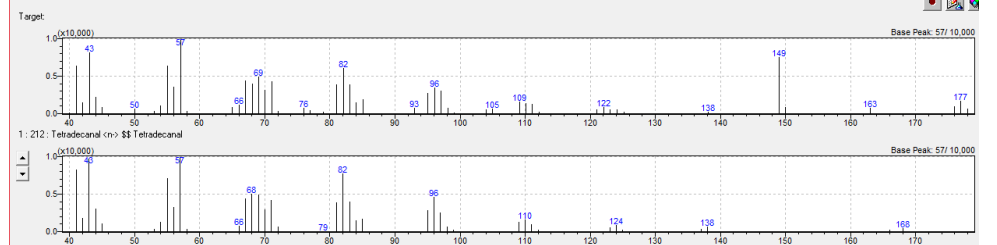
hexadecano – 92%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	92	✓	Heptadecane <n> \$ \$ Heptadecane	240	C ₁₇ H ₃₆	FFNSC1.3 lb
2	92	✓	Octadecane <n> \$ \$ Octadecane	254	C ₁₈ H ₃₈	FFNSC1.3 lb
3	91	✓	Hexadecane <n> \$ \$ Hexadecane	226	C ₁₆ H ₃₄	FFNSC1.3 lb
4	91	✓	Nonadecane <n> \$ \$ Nonadecane	258	C ₁₉ H ₄₀	FFNSC1.3 lb
5	91	✓	Pentadecane <n> \$ \$ Pentadecane	212	C ₁₅ H ₃₂	FFNSC1.3 lb
6	91	✓	Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl- (CAS) 2	296	C ₂₁ H ₄₄	WILEY229 LI
7	91	✓	Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl- \$ \$ 2,6,1	296	C ₂₁ H ₄₄	NIST08.LIB
8	91	✓	Tetradecane <n> \$ \$ Tetradecane	198	C ₁₄ H ₃₀	FFNSC1.3 lb
9	91	✓	Eicosane <n> \$ \$ Eicosane	282	C ₂₀ H ₄₂	FFNSC1.3 lb

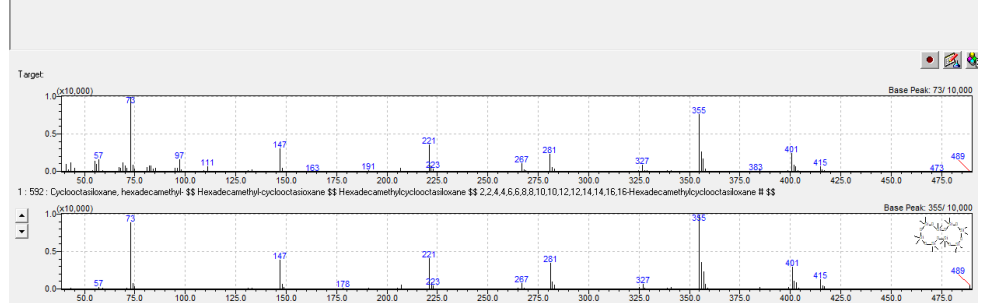


tetradecanal – 87%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	87	✓	Tetradecanal <n> \$ \$ Tetradecanal	212	C ₁₄ H ₂₈ O	FFNSC1.3 lb
2	86	✓	Tetradecanal (CAS) Myristaldehyde \$ \$ Myristyl	212	C ₁₄ H ₂₈ O	WILEY229 LI
3	86	✓	Tetradecanal	212	C ₁₄ H ₂₈ O	NIST21.LIB
4	86	✓	Tetradecanal	212	C ₁₄ H ₂₈ O	NIST21.LIB
5	86	✓	TETRADECANAL \$ \$	212	C ₁₄ H ₂₈ O	WILEY229 LI
6	86	✓	Tetradecanal \$ \$ Myristaldehyde \$ \$ Myristal	212	C ₁₄ H ₂₈ O	NIST107.LIB
7	86	✓	Dodecanal <n> \$ \$ Dodecanal	184	C ₁₂ H ₂₄ O	FFNSC1.3 lb
8	86	✓	Dodecanal	184	C ₁₂ H ₂₄ O	NIST21.LIB
9	86	✓	Dodecanal	184	C ₁₂ H ₂₄ O	NIST21.LIB

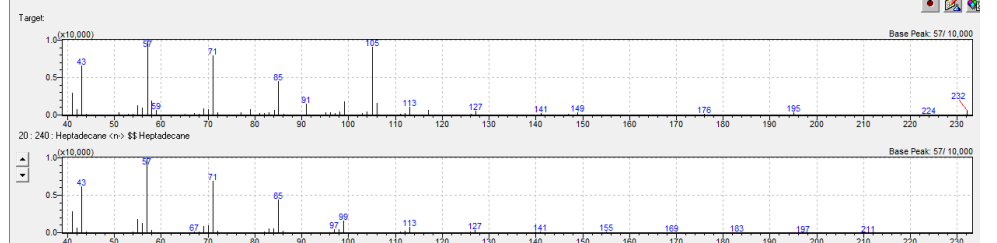
*hexadecametilcicloocta
siloxano – 78%

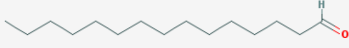
Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	78	✓	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl- \$ \$ Hexa	592	C ₁₆ H ₄₀ OSi ₈	NIST08.LIB
2	78	✓	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl- \$ \$	592	C ₁₆ H ₄₀ OSi ₈	NIST107.LIB
3	77	✓	HEXADECAMETHYLCYCLOOCTASILOXANE	592	C ₁₆ H ₄₀ OSi ₈	WILEY229 LI
4	76	✓	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-	592	C ₁₆ H ₄₀ OSi ₈	NIST21.LIB



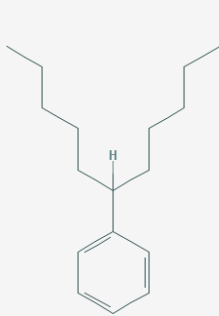
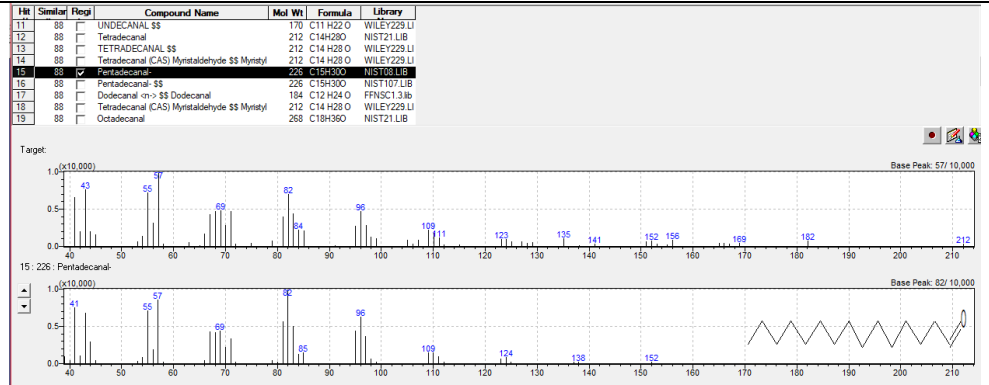
heptadecano – 79%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
15	80	✓	Tetradecane (CAS) n-Tetradecane \$ \$ Isotetra	198	C ₁₄ H ₃₀	WILEY229 LI
16	80	✓	Octadecane, 1-chloro- \$ \$ n-Octadecyl chlorid	288	C ₁₈ H ₃₇ Cl	NIST08.LIB
17	80	✓	Hexadecane, 1-iodo- \$ \$ Cetyl iodide \$ \$ Hexa	352	C ₁₆ H ₃₃ I	NIST107.LIB
18	80	✓	Hexadecane, 1-chloro- \$ \$ Cetyl chloride \$ \$ H	260	C ₁₆ H ₃₃ Cl	NIST08.LIB
19	80	✓	Tridecane (CAS) n-Tridecane \$ \$	184	C ₁₃ H ₂₈	WILEY229 LI
20	79	✓	Heptadecane <n> \$ \$ Heptadecane	240	C ₁₇ H ₃₆	FFNSC1.3 lb
21	79	✓	Pentadecane <n> \$ \$ Pentadecane	212	C ₁₅ H ₃₂	FFNSC1.3 lb
22	79	✓	Nonadecane, 1-chloro- \$ \$	302	C ₁₉ H ₃₉ Cl	NIST107.LIB
23	79	✓	Hexadecane <n> \$ \$ Hexadecane	226	C ₁₆ H ₃₄	FFNSC1.3 lb

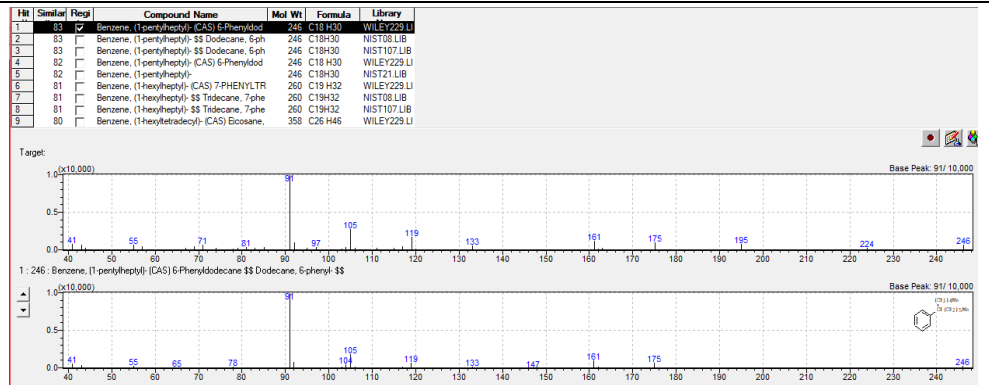




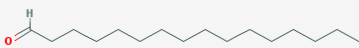
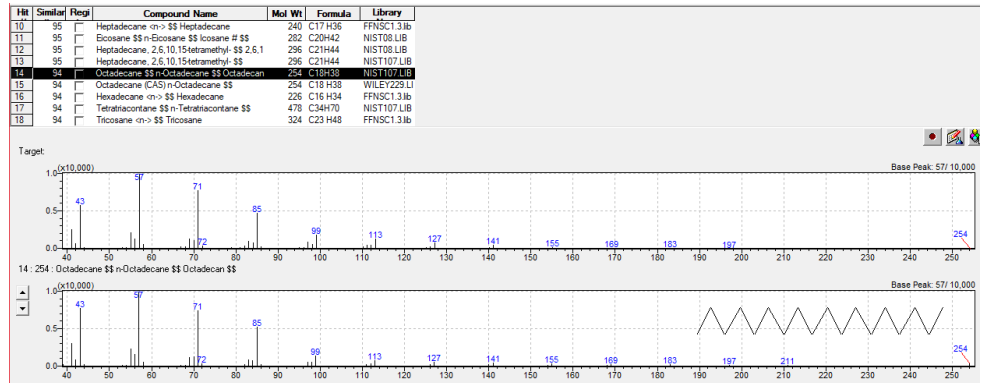
pentadecanal – 88%



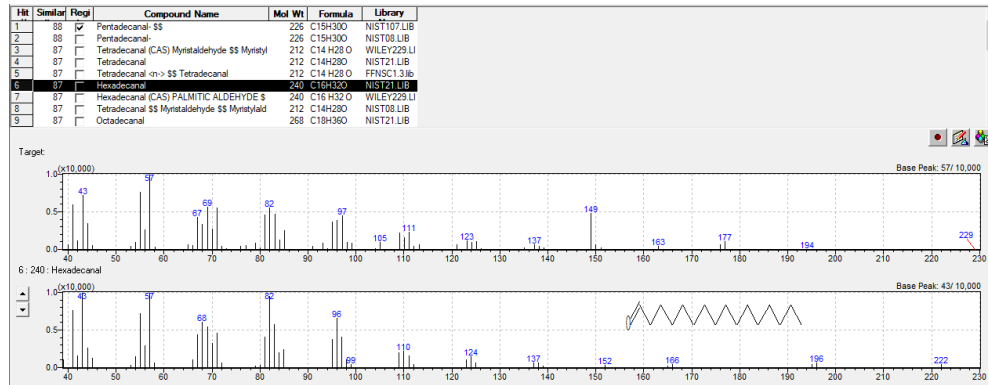
6-fenildodecano – 83%

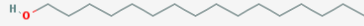


octadecano – 94%



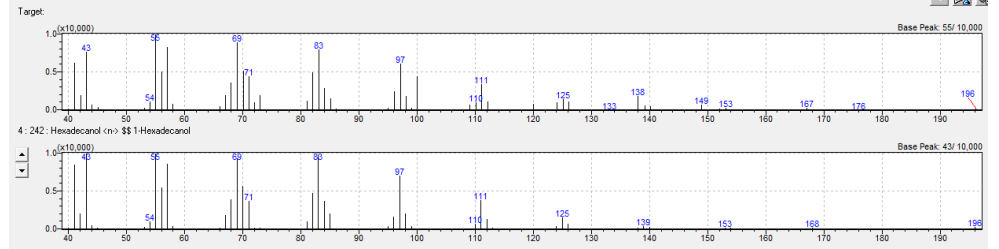
hexadecanal – 87%





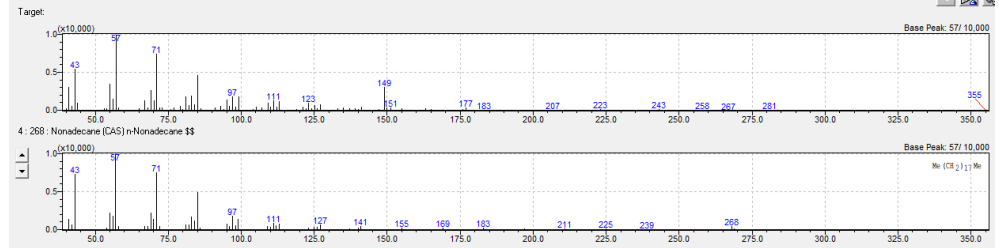
hexadecanol – 92%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	93		1-Heptadecanol \$ n-Heptadecanol \$ Hepta	256	C ₁₇ H ₃₆ O	NIST107.LIB
2	93		1-Pentadecanol \$ n-Pentadecanol \$	228	C ₁₅ H ₃₂ O	WILEY229.LI
3	93		1-Pentadecanol	228	C ₁₅ H ₃₂ O	NIST21.LIB
4	92		Hexadecanol \$ n-Hexadecanol \$	256	C ₁₆ H ₃₄ O	FFNSC1.3.IB
5	92		Heptadecanol \$ n-Heptadecanol \$	256	C ₁₇ H ₃₆ O	FFNSC1.3.IB
6	92		Pentadecanol \$ n-Pentadecanol \$	228	C ₁₅ H ₃₂ O	FFNSC1.3.IB
7	92		1-Hexadecanol (CAS) \$ Ethal \$ Ethol	242	C ₁₆ H ₃₄ O	WILEY229.LI
8	92		Tetradecanol \$ n-1-Tetradecanol \$	214	C ₁₄ H ₃₀ O	FFNSC1.3.IB
9	92		n-Nonadecanol \$ n-Nonadecanol \$ Nona	284	C ₁₉ H ₄₀ O	NIST08.LIB



nonadecano – 85%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	88		Dotriacontane	450	C ₃₂ H ₆₆	NIST21.LIB
2	85		Triacontane, 1-bromo- \$	500	C ₃₀ H ₆₁ Br	NIST107.LIB
3	85		Triacontane, 1-bromo- \$ 1-Bromotriacontane	500	C ₃₀ H ₆₁ Br	NIST08.LIB
4	85		Nonadecane (CAS) \$ n-Nonadecane \$	268	C ₁₉ H ₄₀	WILEY229.LI
5	84		Octadecyl chloride \$ Octadecane, 1-chloro-	288	C ₁₈ H ₃₇ Cl	FFNSC1.3.IB
6	84		Tetracontane, 3,5,24-trimethyl- (CAS)	605	C ₄₃ H ₈₈	WILEY229.LI
7	84		Tetracontane, 3,5,24-trimethyl- \$ 3,5,24-Trim	604	C ₄₃ H ₈₈	NIST08.LIB
8	84		Tetracontane, 3,5,24-trimethyl- \$	604	C ₄₃ H ₈₈	NIST107.LIB
9	84		14-BETA-H-PREGNA \$ 14-BETA-PREGN	288	C ₂₁ H ₃₆	WILEY229.LI



eicosano – 96%

Hit	Similar	Regi	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	96		Tetracosane \$ n-Tetracosane \$	338	C ₂₄ H ₅₀	FFNSC1.3.IB
2	96		Docosane \$ n-Docosane \$	310	C ₂₂ H ₄₆	FFNSC1.3.IB
3	96		Henicosane \$ n-Henicosane \$	296	C ₂₁ H ₄₄	NIST107.LIB
4	96		Pericosane \$ n-Pericosane \$	352	C ₂₅ H ₅₂	FFNSC1.3.IB
5	96		Henicosane \$ n-Henicosane \$	296	C ₂₁ H ₄₄	FFNSC1.3.IB
6	96		Eicosane \$ n-Eicosane \$	282	C ₂₀ H ₄₂	FFNSC1.3.IB
7	95		Nonadecane \$ n-Nonadecane \$	268	C ₁₉ H ₄₀	FFNSC1.3.IB
8	95		Tricosane \$ n-Tricosane \$	324	C ₂₃ H ₄₈	FFNSC1.3.IB
9	95		Eicosane \$ n-Eicosane \$ Icosane # \$	282	C ₂₀ H ₄₂	NIST08.LIB

