

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Karina Pereira Barbieri

**Estabelecimento de colônia de *Lutzomyia neivai* (Diptera:Psychodidae) e
construção de túnel de vento para avaliação de substâncias atrativas para
flebotomíneos**

Araraquara – SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Karina Pereira Barbieri

**Estabelecimento de colônia de *Lutzomyia neivai* (Diptera:Psychodidae) e
construção de túnel de vento para avaliação de substâncias atrativas para
flebotomíneos**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina Pinto

Araraquara-SP
2011

Sumário

Resumo.....	4
Lista de Ilustrações.....	5
Lista de Tabelas.....	6
1.Introdução.....	7
2. Objetivos.....	10
3. Material e Métodos.....	10
3.1. Criação dos flebotomíneos.....	10
3.2. Construção do túnel de vento.....	12
3.3. Padronização do túnel de vento.....	13
3.4. Experimentos com flebotomíneos vindos do campo.....	16
4. Resultados e Discussão.....	16
4.1 Criação de flebotomíneos.....	16
4.2. Padronização do túnel de vento	20
4.3.Experimentos com flebotomíneos vindos do campo.....	20
4.3.1. Teste com animais utilizando flebotomíneos da espécie <i>L. neivai</i>	21
4.3.2. Teste com octenol 1% utilizando flebotomíneos da espécie <i>L.neivai</i>	23
4.3.3 Octenol com liberação constante em túnel de vento.....	24
5.Conclusões.....	26
6.Referências Bibliográficas.....	28

Resumo

Os flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) são insetos transmissores de leishmanioses e arboviroses. O estabelecimento de colônias em laboratório para o estudo comportamental da espécie *Lutzomyia neivai*, transmissor da leishmaniose tegumentar, requer manutenção e cuidados especiais.

Os insetos hematófagos são atraídos por substâncias voláteis liberadas pelos hospedeiros e o estudo dessas substâncias é denominado “ecologia química”. A capacidade atrativa das substâncias pode ser medida em laboratório por meio de aparatos como túneis de vento. Entretanto, muitas variáveis interferem na eficácia de um túnel de vento, como por exemplo: tamanho do túnel, forma de liberação e captura dos insetos, velocidade e forma da pluma de odor e altura da fonte de liberação de odor (meio ou base do túnel).

Este estudo tem como finalidade o estabelecimento de uma colônia de *Lutzomyia neivai* e a construção de um túnel de vento, desenvolvido e modificado a partir de literatura de referência, para avaliação de substâncias atrativas.

Os espécimes foram coletados na região de Araraquara, nos municípios de Rincão e Santa Eudóxia. Após a coleta, os insetos capturados foram levados para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus Araraquara onde a colônia foi mantida e os experimentos realizados.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Cilindro de ar sintético acoplado às mangueiras e ao Kitassato, dentro do banho-maria, onde o ar será umidificado.	14
Figura 2. vista total da caixa de liberação do inseto.....	14
Figura 3. Vista total do túnel de vento.....	14
Figura 4. Detalhe da entrada do fluxo de ar no túnel de vento.....	14
Figura 5. Vista frontal do local de liberação do fluxo de ar	15
Figura 6. Vista superior da caixa liberadora dos insetos.....	15
Figura 7. Caixa de liberação do inseto.....	15
Figura 8. Exaustor-extremidade posterior do túnel.....	15
Gráfico: Resposta de <i>Lutzomyia neivai</i> em túnel de vento.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oviposição de fêmeas de <i>Lutzomyia neivai</i> coletadas em Rincão e individualizadas.....	17
Tabela 2. Oviposição de fêmeas de <i>Lutzomyia neivai</i> coletadas em Santa Eudóxia e individualizadas.....	17
Tabela 3. Oviposição de fêmeas de <i>Lutzomyia neivai</i> coletadas em Santa Eudóxia (16/09/2009)e individualizadas.....	18
Tabela 4. Dados de <i>L. neivai</i> . Coleta 21/04/2010.....	19
Tabela 5. Dados de <i>L. neivai</i> . Coleta 31/08/2010.....	19
Tabela 6. Dados de <i>L. neivai</i> . Coleta 26/10/2010.....	20
Tabela 7. Resposta de <i>L. neivai</i> aos odores de camundongo e hamster.....	21
Tabela 8. Resposta de <i>L. neivai</i> aos odores de camundongo e hamster (distância).....	22
Tabela 9. Tempo de resposta dos insetos ao odor de camundongo e hamster.....	22
Tabela 10. Resposta de <i>L. neivai</i> ao octenol 1%.....	23
Tabela 11. Resposta de <i>L. neivai</i> ao octenol 1% (tempo de resposta e distância).....	24

1. INTRODUÇÃO

Leishmaniose é uma doença que se manifesta de diversas formas clínicas, tegumentar (cutânea e mucocutânea) e visceral. Acredita-se que exista cerca de 12 milhões de pessoas contaminadas com leishmaniose no mundo, e uma incidência de aproximadamente 1 a 2 milhões de novos casos por ano, atingindo 88 países ao redor do mundo (WHO, 2011). A leishmaniose é uma zoonose que apresenta como agente etiológico o protozoário *Leishmania sp* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), transmitida por flebotomíneos .

Para a transmissão das leishmanioses ao ser humano, é necessário ao menos à realização de dois repastos sanguíneos pela fêmea. Outros mamíferos são hospedeiros reservatórios e auxiliam a manutenção do ciclo da doença. Portanto, as fêmeas se alimentam no hospedeiro reservatório infectado e contaminam o homem em um segundo repasto (Lainson, 1989). Essas diferentes fontes de alimentos demonstram flexibilidade alimentar para esse vetor.

A capacidade vetorial dos flebotomíneos é caracterizada pela atração exercida tanto pelo homem, denominada antropofilia, como pelo hospedeiro reservatório denominado zoofilia. Esses dois fatores podem ser medidos pela observação do conteúdo estomacal de fêmeas coletadas no campo (Christensen *et al.*, 1983; Morrison *et al.*, 1993). Uma alternativa para demonstrar a preferência a determinados hospedeiros é a exposição de iscas animais às fêmeas de flebotomíneos (Quinnell *et al.*, 1992; Montoya-Lerma & Lane, 1996; Campbell-Lendrum *et al.*, 1999). Sendo válida também, para testar antropofilia para determinada espécie de flebotomíneo, a utilização de iscas humanas. Entretanto,

a utilização de iscas humanas está sendo cada vez menos utilizado, devido principalmente às questões éticas.

As capturas realizadas comumente com armadilhas luminosas também sofreram críticas de alguns autores como medida indireta da captura em humanos (Molyneaux & Ashford, 1983; Wheeler *et al.*, 1996). Davies *et al.* (1995) destacaram três pontos relacionados a esses dois tipos de captura, diferença no grau de antropofilia e fototaxia entre as espécies de flebotomíneos. A atração pelas fêmeas causada por iscas humanas seria possivelmente superior às iscas luminosas e as iscas utilizadas podem atrair fêmeas em diferentes estados gonotrópicos.

A espécie *Lutzomyia neivai*, previamente considerada como sinonímia do complexo *Lutzomyia intermedia*, foi reavaliada por Marcondes (1996) sendo considerada uma espécie de importância na transmissão da leishmaniose tegumentar (Córdoba-Lanús *et al.*, 2006). A escolha da espécie *L. neivai* para o presente estudo deve-se aos seguintes fatores: sua importância epidemiológica; ao grande número de exemplares capturados em área endêmica de leishmaniose tegumentar próxima à Araraquara (Pinto *et al.*, 2005) e à ausência de conhecimentos sobre substâncias atrativas para essa espécie.

A atratividade dos insetos é possível devido à percepção desses por diferentes substâncias liberadas em seu ambiente por outra fonte emissora. Essas substâncias podem ser utilizadas para a atratividade sexual, os feromônios ou a busca por alimentos, os cairomônios.

Segundo Trigo (1999), feromônios são substâncias que mediam interações entre organismos da mesma espécie, conferindo vantagens adaptativas para o

organismo emissor, para o organismo receptor, ou para ambos. E cairomônios são substâncias pertinentes à biologia de um organismo (organismo 1) que, quando em contato com um indivíduo de outra espécie (organismo 2), são favoráveis para o organismo 2, mas não para o organismo 1 .

O conhecimento que se tem, referente a cairomônios e ferormônios para flebotomíneos é baseado principalmente em estudos com a espécie *Lutzomyia longipalpis*, transmissora da leishmaniose visceral, o que determina a falta de conhecimento de maior quantidade de substâncias atrativas. Um estudo realizado em campo com duas espécies de flebotomíneos, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia*, demonstrou que o CO₂ é uma das substâncias atrativas liberadas pelo ser humano e corresponde a 45% da atração total de um ser humano (Pinto *et al.*, 2001b).

Em estudos realizados em laboratório, o suor humano foi atrativo para *Lutzomyia longipalpis*, mesmo com a ausência de CO₂ (Hamilton & Ramsoondar, 1994; Rebollar-Tellez *et al.*, 1999). Uma mistura de ácido láctico, capróico e amônia semelhante ao suor humano mostraram-se atrativa para *Aedes aegypti* (Kröckel *et al.* 2006). Esse composto foi também avaliado para flebotomíneos das espécies *L. longipalpis* e *L. intermedia* indicando diferença entre as espécies (Andrade *et al.*, 2008).

Para o estudo em laboratório do comportamento de insetos é necessário o uso de túneis de vento que são aparelhos construídos com material inerte para odor e tem um ponto para a liberação do estímulo e outro para a detecção do inseto que está em teste. O comportamento pode ser observado diretamente ou indiretamente com filmagem.

Uma utilização eficiente desses equipamentos depende da padronização de certas variáveis como, tamanho do túnel, forma da pluma de odor e velocidade de liberação do composto testado. A diferença na estrutura da pluma de vento formada dentro do túnel de vento pode tornar uma mesma substância mais atrativa ou menos atrativa para os culicídeos (Geier *et al.*, 1999). No trabalho de Pinto (2001a) obteve-se uma eficácia regular do túnel de vento para flebotomíneos comparando-se suor humano com um controle negativo, com eficácia regular do túnel de vento para flebotomíneos.

É possível concluir que o uso de isca humana é essencial para o estudo de flebotomíneos devido a sua capacidade atrativa, porém o uso em campo de iscas humanas por questões de segurança não é recomendado. A busca por cairomônios que substituam as iscas humanas torna-se uma questão relevante mesmo com todas as dificuldades para tal propósito.

2. OBJETIVOS

1. Estabelecer uma colônia de *L. neivai* originária de Rincão-SP e Santa Eudóxia .
2. Construir um túnel de vento satisfatório às condições dos flebotomíneos.
3. Avaliar a eficácia do túnel de vento para flebotomíneos utilizando substâncias químicas e animais como atrativos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Criação dos flebotomíneos

O método utilizado para a colonização de flebotomíneos foi baseado na proposta relatada por Young *et al.* (1981) e Modi & Tesh (1983) com adaptações. Os insetos foram coletados nas regiões de Santa Eudóxia e Rincão com coletores

manuais pela estudante Karina Pereira Barbieri e a Profa. Dra. Mara Cristina Pinto. Outras formas de coleta como armadilhas de Shannon e armadilhas luminosas também foram utilizadas. Os adultos coletados foram colocados em gaiola de armação de PVC recobertas com tecido tipo “voil”, alimentados com algodão embebido em solução de mel 50% (uma parte de água destilada fervida + uma parte de mel puro), após a preparação a solução de mel 50% era distribuída em frascos estéreis de 2ml e mantida em congelador, retiradas apenas quando eram utilizados.

Os insetos capturados eram transportados para o laboratório de Parasitologia na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, climatizado com temperatura média de 25°C e umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 horas. No dia seguinte, as fêmeas eram alimentadas com hamster anestesados com solução de ketamina/xilazina 0,15ml /50g durante uma a duas horas. Após 24 horas as fêmeas eram separadas em potes de plásticos com fundo de gesso (potes de oviposição), preparados anteriormente na proporção de 1:2 (400 ml de água e 800g de gesso), para a oviposição. Esses potes foram mantidos dentro de recipientes plásticos forrados com folhas de papel umedecidas com água destilada.

Após a morte, as fêmeas foram separadas e identificadas por meio da técnica de diafanização que permite a clarificação dos insetos, com a retirada de toda a quitina do exoesqueleto, proporcionando analisar o interior do inseto e observar a espermoteca das fêmeas e determinar a diferenciação entre as espécies. A técnica de diafanização era realizada com separação e introdução dos insetos adultos em solução de hidróxido de potássio 10%, por até 4 horas, depois

se retirava a solução e acrescentava-se uma solução de ácido acético concentrado por 15 minutos, lavava-se com água destilada por mais 15 min. Acrescenta-se aos insetos lactofenol e analisava-se após 24 horas os insetos.

Com a eclosão das larvas adicionou-se ao pote de oviposição uma ração preparada a partir de uma mistura nas mesmas proporções de ração de coelho, fezes de coelho e húmus de minhoca fermentados durante um mês. Essa mistura foi triturada em gral de porcelana e autoclavada. A quantidade introduzida era pequena para evitar o crescimento de fungos que poderiam prejudicar o desenvolvimento das larvas.

As pupas desenvolviam-se dentro dos potes, os adultos que emergiam foram colocados dentro das gaiolas recobertas por “voil” e alimentados com solução de mel 50% embebida em algodão estéril. Dias depois as fêmeas eram alimentadas com hamster anestesiado e o processo era repetido.

3.2. Construção do túnel de vento

O túnel de vento foi construído segundo as especificações de Pinto (2001a) com vários ajustes. O túnel foi construído em material acrílico com as dimensões 20X20cm e 200cm de extensão. Foram testadas várias formas para se obter as melhores respostas dos flebotomíneos dentro do túnel, o mesmo foi desenhado para proporcionar possibilidades de testes e comparações. Por exemplo: a substância avaliada poderia ser liberada isoladamente ou concomitantemente com o controle negativo (uma saída central ou duas laterais); os insetos poderiam ser liberados do centro do túnel ou da base do mesmo; a gaiola de liberação dos insetos poderia ser colocada em diferentes pontos do túnel para que menores ou maiores distâncias de atração fossem avaliadas.

3.3. Padronização do túnel de vento

O funcionamento do túnel de vento (detalhes mostrados nas Figs 1 a 8) baseou-se em um fluxo de ar liberado de um cilindro com vazão de 0,5 mL/min por um fluxômetro. O ar entrava no túnel por uma mangueira conectada a um kitassato contendo água destilada que era mantido dentro de um banho-maria em uma temperatura de 37°C (Fig1 e 4).

Os insetos eram colocados em caixinhas do lado oposto ao local da liberação dos compostos (Figs 2, 6 e 7). O fluxo de ar era gerado por um exaustor posicionado no lado oposto à entrada do estímulo (Fig 8).

Os testes eram realizados algum tempo depois da introdução dos insetos nas caixas de liberação, o que poderia eliminar a saída como impulso do inseto. Foram realizadas testes com substâncias atrativas (caïromônios) e com animais.

O túnel de vento era higienizado em toda a sua extensão (Fig 3), com hexano, um solvente que eliminava todos os compostos remanescentes que ficavam no túnel, a cada vez que se fazia algum teste, o túnel era mantido aberto por algum tempo para eliminar os odores do solvente. Os componentes menores como as caixinhas onde se introduzia os insetos eram limpos com solução do detergente Extran 5% utilizando água destilada como diluentes e secos em estufa ou por 24 horas a temperatura ambiente.



Fig 1. Cilindro de ar sintético acoplado às mangueiras e ao Kitassato, dentro do banho-maria, onde o ar será umidificado.



Fig 2. vista total da caixa de liberação do inseto.



Fig 3. Vista total do túnel de vento.



Fig 4. Detalhe da entrada do fluxo de ar no túnel de vento.



Fig 5. Vista frontal do local de liberação do fluxo de ar.

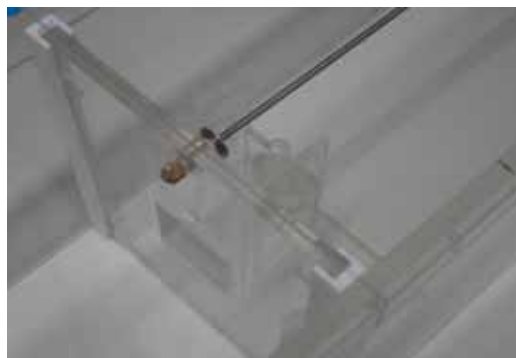


Fig 6. Vista superior da caixa liberadora dos insetos



Fig 7. Caixa de liberação do inseto.



Fig 8. Exaustor-extremidade posterior do túnel.

3.4. Experimentos com flebotomíneos vindos de campo

Concomitantemente às tentativas de criação de flebotomíneos optou-se por realizar alguns experimentos com flebotomíneos vindos do campo, este método não permitia que se controlasse o tempo de vida dos insetos e o estado gonotrófico das fêmeas. Os insetos eram coletados durante a noite com capturador manual na parede de uma residência e os que sobreviviam até o dia seguinte, ou dias consecutivo, eram submetidos a testes no túnel de vento.

OBS: Os experimentos descritos a seguir na padronização do túnel de vento foram realizados, algumas vezes com pequenas variações. Desse modo para tornar a leitura e compreensão mais clara, optou-se por explicitar a metodologia juntamente com os resultados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Criação de flebotomíneos

Foram dois anos (de 2009 e 2010) de tentativas de colonização de flebotomíneos vindos do campo, com o início das coletas provenientes de Rincão porém, devido ao menor número de insetos coletados nessa região optou-se por coletar em Santa Eudóxia, alguns resultados são apresentados a seguir.

Para a primeira tentativa de formação da colônia a coleta foi feita em Rincão. Aproximadamente 200 adultos foram capturados. Desses, 51 adultos permaneceram vivos, 23 fêmeas foram isoladas e nove ovipuseram (Tabela1).

Tabela 1. Oviposição de fêmeas de *Lutzomyia neivai* coletadas em Rincão e individualizadas.

Fêmeas	Quantidade de ovos
1	31
2	49
3	6
4	24
5	44
6	52
7	28
8	40
9	48
Total	322

Na primeira tentativa de colonização algumas larvas eclodiram, porém nenhum adulto emergiu, devido ao aparecimento de quantidade elevada de fungos. Fez-se nova coleta em Santa Eudóxia, obtendo-se os resultados apresentados na tabela 2. Essa coleta novamente não resultou em adulto devido ao aparecimento de muitos fungos.

Tabela 2. Oviposição de fêmeas de *Lutzomyia neivai* coletadas em Santa Eudóxia e individualizadas.

Fêmeas	Quantidade de ovos
1	51
2	65
3	62
4	60
5	6
6	59
7	29
8	75
9	49
10	6
Total	464

Na coleta posterior foram capturados 300 adultos, com uma grande mortalidade no primeiro dia. As fêmeas vivas se alimentaram no hamster e depois 63 foram individualizadas. A partir deste número, 24 fêmeas ovipuseram (Tabela 3). As larvas oriundas destes ovos chegaram à fase de desenvolvimento L4 e não se observou a presença de fungos nos potes de criação. Porém não obteve-se nenhum adulto.

Tabela 3. Oviposição de fêmeas de *Lutzomyia neivai* coletadas em Santa Eudóxia (16/09/2009) e individualizadas.

Fêmeas	Quantidade de Ovos
1	56
2	32
3	50
4	64
5	42
6	51
7	39
8	44
9	43
10	21
11	60
12	38
13	35
14	52
15	50
16	47
17	29
18	61
19	36
20	42
21	15
22	38
23	43
24	51
Total	1059

Observa-se que nas primeiras coletas não foi obtido nenhum adulto, havendo alta taxa de mortalidade das fêmeas capturadas considerando a quantidade de fêmeas que ovipuseram. No decorrer do trabalho alguns aperfeiçoamentos foram realizados, como a esterilização de todos o material utilizado para evitar a proliferação dos fungos, a diminuição da quantidade de alimento fornecido e a esterilização do mesmo. Nessa fase dos experimentos, alguns problemas climáticos foram enfrentados. As coletas foram interrompidas e iniciaram-se apenas no ano seguinte.

Coletou-se em 21/04/2010 poucos adultos, com mortalidade elevada de larvas, como demonstra a tabela abaixo.

Tabela 4. Dados de *L. neivai*. Coleta 21/04/2010.

	Números absolutos	Sobrevivência (%) a partir do estágio anterior
Quantidade de fêmeas que ovipuseram	56	
Quantidade de ovos	372 (6,6 ovos/fêmea)	
Quantidade de larvas	120	32
Quantidade de pupas	30	25
Quantidade de adultos resultantes	3	10

Observou-se que o número de insetos diminuiu a cada estágio de desenvolvimento da colônia. A próxima coleta foi realizada em 31/08/2010, porém não resultando em adultos (Tabela 5).

Tabela 5. Dados de *L. neivai*. Coleta 31/08/2010.

	Números absolutos	Sobrevivência (%) a partir do estágio anterior
Quantidade de fêmeas que ovipuseram	30	
Quantidade de ovos	164 (5,5 ovos/fêmea)	
Quantidade de larvas	20	12,2
Quantidade de pupas	15	75
Quantidade de adultos resultantes	0	0

Outra tentativa de desenvolver a colônia foi a coleta do dia 26/10/2010, porém desta vez, não obteve-se desenvolvimento da fase de ovos.

Tabela 6. Dados de *L. neivai*. Coleta 26/10/2010.

Quantidade de fêmeas que ovipuseram	10 Fêmeas (a partir de 90)
Quantidade de ovos	391 (39 ovos/fêmea)
Quantidade de larvas	0
Quantidade de pupas	0
Quantidade de adultos resultantes	0

A colonização de flebotomíneos mostrou-se com várias dificuldades, a primeira era a distância do local das coletas e problemas de transportes ou de clima favorável, e coletas em que a quantidade de insetos capturados era menor do que a necessária para o início de uma colônia. Observou-se que para obtenção de um número significativo de adultos era necessário iniciar com uma quantidade elevada de fêmeas coletadas.

4.2. Padronização do túnel de vento

A pluma de odor gerada pelo fluxo de ar e sua dispersão ao longo do túnel de vento foi visualizada por meio de teste de fumaça. Pedras de gelo seco foram colocadas no kitassato contendo a água por onde o fluxo de ar passava. A reação química produziu a liberação de uma fumaça branca visível. Com isso observou-se como a pluma de odor se dispersava e o tempo decorrido de sua liberação até a caixa onde

4.3. Experimentos com flebotomíneos vindos do campo

A utilização de flebotomíneos vindos diretamente do campo para testes em túnel do vento foi alternativa para o prosseguimento dos experimentos que ficaram impossibilitados devido à falta de flebotomíneos obtidos na colônia de laboratório.

4.3.1. Teste com animais utilizando flebotomíneos da espécie *L. neivai*

Utilizou-se como estímulo diferentes espécies de animais, camundongo e hamsters, avaliando-se 10 insetos em cada experimento e o mesmo número de flebotomíneos no controle. Considerando os insetos que responderam foram ativados pelo estímulo, observando-se o comportamento dos insetos na tabela 7.

Tabela 7. Resposta de *L. neivai* aos odores de camundongo e hamster

Flebotomíneos avaliados	Controle (ar)	Camundongo	Hamster
Avaliados	10	10	10
Não responderam	2	5	5
Responderam (ativados)	8	5	5

A partir dos insetos ativados mediu-se a distância percorrida e o tempo de resposta, com duração dos experimentos de 5 minutos e a distância do estímulo à caixa de recepção do inseto de 100 centímetros, considerando os insetos que chegaram ao local do estímulo como atraídos pelo odor. Na tabela 8 observa-se que não houve diferença de atratividade entre os odores do camundongo e o hamster, porém comparando-se com o controle pode-se perceber que nenhum inseto foi atraído pelo controle.

Tabela 8. Resposta de *L. neivai* aos odores de camundongo e hamster (distância).

Insetos ativados	Distância percorrida		
	Controle	Camundongo	Hamster
1	25 cm	100 cm*	100 cm*
2	10 cm	10 cm	100 cm*
3	50 cm	100 cm*	100cm*
4	15 cm	60 cm	10 cm
5	50 cm	100 cm*	10 cm
6	5 cm	-	-
7	50 cm	-	-
8	30 cm	-	-

* Insetos que foram atraídos, ou seja, chegaram até o local de liberação do estímulo.

Outra variável analisada foi o tempo de resposta dos insetos ao estímulo, os experimentos apresentavam o tempo de duração de 5 minutos, observando-se a tabela abaixo, percebe-se que aproximadamente 2 minutos de experimentos foram suficientes para a resposta do inseto. Porém, neste experimento não se obteve resultados conclusivos de atratividade, isto pode ser observado pela variabilidade grande de tempo de resposta para os animais em teste e também o controle na tabela abaixo.

Tabela 9. Tempo de resposta dos insetos ao odor de camundongo e hamster.

Insetos ativados	Tempo de resposta		
	Controle	Camundongo	Hamster
1	10"	10"*	3:00*
2	30"	3:00	2:00*
3	4:30	10"*	2:00*
4	30"	1:00	30"
5	1:00	10"*	1:30
6	2:00		
7	30"		
8	4:50		

* tempo de chegada ao estímulo.

4.3.2. Teste com octenol 1% utilizando flebotomíneos da espécie *L.neivai*

O octenol é uma substância que havia sido testada em campo e mostrou-se um atrativo eficiente. Neste experimento, utilizou-se como substância teste o octenol diluído em hexano na concentração final de 1%, esta solução foi transferida 20µl em papel de filtro. O controle era apenas 20 µL de hexano puro em papel de filtro.

Analisando-se a tabela 9, foram testados 10 insetos em cada situação, com resposta de ativação de 60% com o octenol, nenhuma ativação para a substância controle, porém neste experimento foi possível identificar que a resposta era influenciada com o decorrer dos experimentos, ou seja, percebia-se que com a evaporação do octenol, os últimos insetos analisados apresentam um comportamento de resposta diferente em relação aos primeiros analisados. Observou-se que os insetos foram ativados pelo octenol, embora o número de insetos avaliados tenha sido pequeno.

Tabela 10. Resposta de *L. neivai* ao octenol 1%.

Quantidade de insetos	Controle (hexano)	Octenol 1%
Avaliados	10	10
Não responderam	10	6
Responderam (ativação)	0	4

A ativação do inseto, que é sua resposta frente ao estímulo, determinou-se o tempo de resposta e a distância percorrida. A distância entre o estímulo e o inseto era de 1 metro, a tabela 10 demonstra que nenhum inseto atingiu o local de estímulo, o que caracterizaria a atração pelo estímulo. O tempo de resposta para 75% dos insetos ativados foi de até 2 minutos, tempo suficiente, portanto para a ativação do inseto.

Tabela 11. Resposta de *L. neivai* ao octenol 1% (tempo de resposta e distância).

Insetos (ativados)	Tempo de reposta	Distância percorrida
1	50"	50 cm
2	2:35	80 cm
3	1:07	30 cm
4	1:20	90 cm

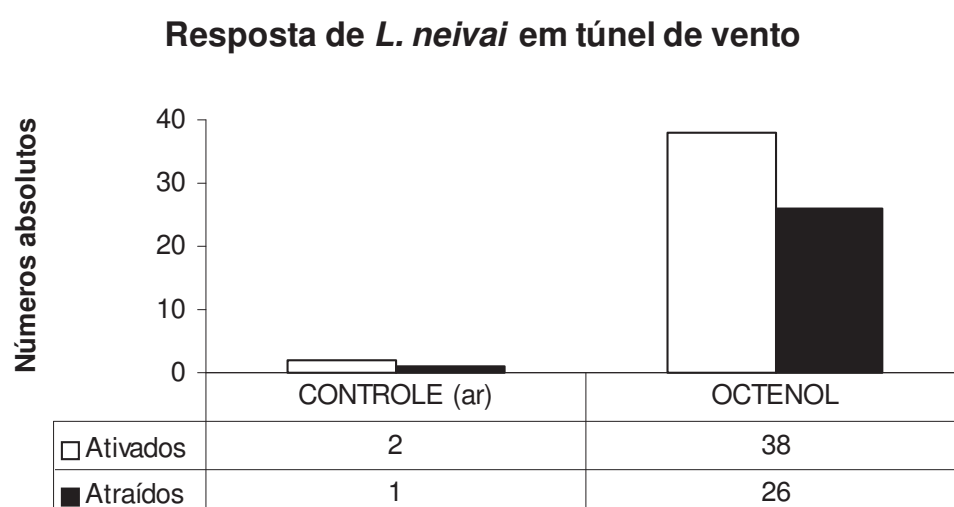
4.3.3 Octenol com liberação constante em túnel de vento

Optou-se por realizar o teste usando o octenol com liberação constante e sem diluição, para se evitar a diminuição da liberação a cada inseto testado. A metodologia de liberação seguiu a mesma que o grupo havia utilizado em campo (Pinto *et al.*, 2011). Dessa forma, 1mL de octenol foi colocado dentro de um frasco fechado por uma rolha perfurada por onde dois barbantes foram transpassados. O barbante ficava mergulhado no octenol com as pontas de aproximadamente 2 cm para fora. O composto foi liberado por volatilização.

Os flebotomíneos (*L. neivai*) trazidos do campo foram colocados individualmente nas caixinhas de liberação e expostos ao controle ou octenol por 2 minutos. Um total de 50 insetos foram utilizado para o controle e mais 50 insetos para o octenol.

Dos 50 insetos avaliados em cada tratamento, 48 não responderam no controle (não saíram da caixa de liberação) em relação aos 12 que não responderam no octenol. O teste de quiquadrado apresentou significância tanto para a ativação como para a atração entre controle e octenol ($p < 0,0001$).

Os resultados mostraram a atratividade do composto e a eficiência do túnel de vento em medir atratividade (gráfico).



Analisando-se os resultados com octenol pode-se observar que a forma de liberação do composto interferiu na resposta do inseto, a liberação constante obteve maior eficácia em relação a outra forma de liberação. Optou-se por esta variação devido a observação durante os experimentos da diminuição das respostas com a evaporação do composto com o tempo, diminuindo a quantidade de octenol no papel, com a liberação constante era possível controlar a quantidade de liberação (0,13 mg/ min) e garantir a presença deste composto até o final do experimento.

5. CONCLUSÕES

- ✓ A colonização de flebotomíneos em laboratório é uma tarefa árdua em que vários fatores devem ser considerados, como alimentação apropriada, locais de manutenção da colônia com controle de temperatura, período de luminosidade, presença de fungos e a quantidade de adultos coletados em campo.
- ✓ A colonização de flebotomíneos tornaria mais fácil o estudo em laboratório com a eliminação de várias coletas que poderiam ser prejudicadas pelo clima ou questões de logística. Uma questão também seria a utilização de insetos com o tempo de vida conhecido, porém neste estudo optou-se pela utilização de insetos trazidos do campo, devido ao insucesso da colonização.
- ✓ O estudo do comportamento de atratividade dos insetos a compostos é possível de ser realizado em túnel de vento.
- ✓ Para este estudo algumas variáveis foram observadas que pudessem interferir nos experimentos, como tempo, distância do estímulo ao inseto e a forma de liberação das substâncias.
- ✓ A resposta do inseto frente ao estímulo caracteriza uma ativação deste, enquanto que a busca do inseto ao estímulo considera-se como atratividade.

- ✓ Compostos utilizados em armadilhas no campo, como o octenol, podem ser usados como controles positivos em experimentos de atratividade para *L. neivai*.
- ✓ Outros estudos devem ser realizados para a identificação de substâncias atrativas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade AJ, Andrade MR, Dias ES, Pinto MC, Eiras AE. 2008. Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 103(4): 337-43.

Campbell-Lendrum, D.H.; Pinto, M.C.; Brandão-Filho, S.P.; de Souza, A.A.; Ready, P.D. & Davies, C.R. 1999. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera Psychodidae). **Medical and Veterinary Entomology**, 13: 299-309.

Christensen, H.A.; Faiechild, G.B.; Herrer, H.A.; Johnson, C.M. Young, D.C. & De Vasquez, A.M. 1983. The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. **Journal of Medical Entomology**, 20: 463-484.

Córdoba-Lánus, E.; Grosso, M.L.; Piñero, J.E.; Valladares, B.; Salomón, O.D. 2006. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp, in northwestern argentina. **Acta Tropica**, 98(1): 1-5.

Davies, C.R.; Lane, R.R.; Villaseca, P.; Pyke, S.; Campos, P. & Llanos-Cuentas, E.A. 1995. The relation between CDC light-trap and human-bait catches of endophagic sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. **Medical and Veterinary Entomology**, 9: 241-248.

Geier, M.; Bosch, O.J. & Boeckh, J. 1999. Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Chemical Senses**, 24: 647-53.

Hamilton, J.G.C. & Ramsoondar, T.M.C. 1994. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human host odours. **Medical and Veterinary Entomology**, 8: 375-380.

Kröckel U., Rose A., Eiras Á.E. & Geier M. 2006. New Tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. **Journal of the American Mosquito Control Association** 22(2): 222-38.

Lainson, R. 1989. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the american leishmaniasis. *In*: **Demography of vector-borne diseases**. Florida, Boca Raton. p.85-104.

Marcondes C. B. 1996. A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 91: 457-462.

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

Molyneaux, D.H. & Ashford, R.W. 1983. **The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals**. London, Taylor & Francis.

Montoya-Lerma, J. & Lane, R.P. 1996. Factors affecting host preference of *Lutzomyia evansi* (Diptera:Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. **Bulletin of Entomological Research**, 86: 43-50.

Morrison, A.C., Ferro, C. & Tesh, R.B. 1993. Host preferences of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, 49: 68-75.

Pinto, M.C. 2001a. Atratividade de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) pelos odores humanos, gás carbônico e ácido láctico, Paraná, Brasil. Universidade Federal do Paraná. **Tese de Doutorado**, 95p.

Pinto, M.C.; Campbell-Lendrum, D.; Lozovei, A.L.; Teodoro, U. & Davies, C.R. 2001b. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. **Medical and Veterinary Entomology**, 15: 132-139.

Pinto, M.C.; Rosa, J.A.da; Graminha, M.A.S.; Mine, J.C.; Allegretti, S.M.; Delort, S.; Riedel, C.; Paes, E.; Cupolillo, E. 2005. Isolation and isoenzyme

characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from a case of human cutaneous leishmaniasis in northeast centre of the state of São Paulo . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100 (7):733-734.

Pinto M.C.; Barbieri K. ;Silva M.C.; Graminha M.A.; Casanova C.;Andrade A.J; Eiras A. E.Octenol as attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) in the field. **Journal Medical Entomology**,2011 Jan;48(1):39-44.

Quinnell, R.J.; Dye, C. & Shaw, J.J. 1992. Host preferences of phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, 6: 195-200.

Rebollar-Tellez, E.A.; Hamilton, J.G.C. & Ward, D. 1999. Response of female *Lutzomyia longipalpis* to host odour kairomones from human skin. **Physiological Entomology**, 24: 220-226.

Wheeler, A.S.; Feliciangeli, M.D.; Ward, R.D. & Maingon, R.D.C. 1996. Comparison of stick-traps and CDC-light traps for sampling phlebotomine sandflies entering houses in Venezuela. **Medical and Veterinary Entomology**, 10: 295-298.

WHO,2011.Leishmaniasis. Disponível em:

<http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en>. Acesso em 14/03/2011.

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

Karina Pereira Barbieri

Profa. Dra. Mara Cristina Pinto