

Universidade Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho

Paulo Rufalco Moutinho

Dinâmica e estrutura populacional do *Anopheles darlingi* em um  
assentamento rural na floresta amazônica, Acre, Brasil.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em  
Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética, do  
Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp para a obtenção  
do título de Mestre.

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Botucatu  
2010

Dedico este trabalho à memória de Nancy Vecchia Rufalco.

Agradeço a todos os responsáveis diretos pela realização deste trabalho: dr. Paulo Eduardo M. Ribolla, dra. Simone Ladeia Andrade, dr. Marcelo Urbano Ferreira e aos pesquisadores Luis Herman S. Gil, Rafael Cruz e Aline Angêlla.

Agradeço as colaborações diversas ao longo das diferentes fases da realização do projeto: dr. Maria Anice M. Sallum, dr. Karina Santos Paduan, toda a equipe da Funasa/SESACRE de Acrelândia e aos moradores do Ramal do Granada.

E um grande abraço para as coisas mais importantes da vida: mãe, namorada, família, os velhos e novos amigos de sempre (São Paulo, Botucatu e Acrelândia) e o S.C. Corinthians Paulista.

## Índice

Lista de Figuras.....	4
Lista de Tabelas.....	5
Resumo.....	6
Abstract.....	7
1. Introdução.....	8
2. Objetivos.....	20
3. Material e Métodos.....	21
3.1-Área de Estudo.....	21
3.2-Coletas de Anofelinos.....	27
3.3-Identificação das Espécies.....	29
3.4-Análises Moleculares.....	29
4. Resultados.....	33
4.1-Diversidade e quantidade de <i>Anopheles</i> .....	33
4.2-Distribuição do <i>Anopheles darlingi</i> .....	34
4.3-Hábitos de Picadas.....	36
4.4-Relação com as chuvas.....	40
4.5-Relação com casos de malária.....	41
4.6-Sequenciamento do gene ND4.....	42
5. Discussão.....	48
6. Conclusão.....	54
7. Bibliografia.....	55

## Lista de Figuras

<b>Figura 1: Incidência casos malária.....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 2: Número de casos de malária. Amazônia Legal.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 3: Mapa distribuição geográfica <i>An. darlingi</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4: Foto de satélite.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 5: Mapa do Ramal do Granada.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 6:Área do km 24.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 7:Área do km 30.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 8:Densidade anofélica durante o período noturno no intra-domicílio.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 9:Densidade anofélica durante o período noturno no peri-domicílio.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 10:Relação entra a densidade de <i>An. darlingi</i> e a pluviosidade.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 11:Comparação entre a densidade anofélica e os casos autóctones de malária.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 12:Eletoforese em gel de agarose 1% mostrando os produtos de PCR.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 13: Mapa de haplótipos das sequências parciais do gene ND4 de <i>Anopheles darlingi</i>..</b>	<b>45</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Disposição dos mosquitos coletados por 3 horas (km 24).....	27
Tabela 2: Disposição dos mosquitos coletados por 3 horas (km 30).....	28
Tabela 3:Quantidade de <i>Anopheles</i> coletados nas capturas de três horas no km 24, nos quatro meses que compõem o estudo.....	33
Tabela 4: Quantidade de <i>Anopheles</i> coletados nas capturas de três horas no km 30, nos quatro meses que compõem o estudo.....	34
Tabela 5: Número de <i>An. darlingi</i> , discriminado nos três horários que compõe o intra, o peri e o extra-domicílio nas capturas de 3h no km 30.....	35
Tabela 6: Número de <i>An. darlingi</i> , discriminado nos três horários que compõe o intra, o peri e o extra-domicílio nas capturas de 3h no km 30.....	35
Tabela 7: <i>An. darlingi</i> , captura de três horas (km 24), na relação mosquito/hora/capturador.....	35
Tabela 8: <i>An. darlingi</i> , captura de três horas (km 30), relação mosquito/hora/capturador.....	35
Tabela 9:Quantidade de <i>An. darlingi</i> coletados na captura de 12 horas no intra-domicílio.....	37
Tabela 10:Quantidade de <i>An. darlingi</i> coletados na captura de 12 horas no peri-domicílio.....	37
Tabela 11:Comparação entre as regiões intra e peri-domicílio, nas capturas de 12h. Valores em porcentagem de mosquitos <i>An darlingis</i> capturados.....	39
Tabela 12:Haplótipos obtidos das amostras sequenciadas de <i>An. darlingi</i> .....	44
Tabela13: Amostras utilizadas nas análises moleculares.....	46
Tabela 14:Variação temporal de haplótipos.....	47
Tabela 15:Casos autóctones de malária de Acrelândia.....	52

## Resumo

Os mosquitos do gênero *Anopheles* incluem espécies de grande importância epidemiológica, pois representam os principais vetores da malária. Estudar o papel destas espécies na transmissão, a interação com o humanos e as diferentes regiões que eles infestam estão entre os principais objetivos da entomologia médica. Sua infestação está ligada a regiões tropicais e o gênero está presente de forma cosmopolita, predominantemente nos países em desenvolvimento. No Brasil, o *Anopheles darlingi* é o principal vetor da doença e é encontrado na região norte, área onde são notificados 99,5% de casos da doença. O presente estudo consistiu em capturas de mosquitos do gênero *Anopheles* ao longo de oito meses, em dois diferentes sítios do Ramal do Granada, localizado no município de Acrelândia, Acre. O Ramal do Granada, estrada que corta o bioma amazônico e com extensão de 30 km a partir do ponto 0 (BR 364), possui diferentes formas de assentamento conforme a área analisada. A tendência é: quanto mais afastado do ponto 0, menor é o número de famílias residentes e menor a proporção de desmatamento. Cada coleta foi composta por três dias, dois para capturas de três horas, no intra, peri e extra-domicílio, e um para capturas de 12 horas, no intra e peri-domicílio. As coletas foram realizadas em intervalos de dois meses, acompanhando a sazonalidade das chuvas, fator ambiental estritamente ligado com a presença do anofelino. Foi verificada a densidade, a distribuição, atividade hematofágica de mosquitos *Anopheles darlingi*, além de sua filogeografia, através do sequenciamento de parte do gene ND4. A comparação entre os dois sítios quanto a quantidade e variabilidade, e o com menor grau de desflorestamento e número de residências se mostrou com maior quantidade de mosquitos. As coletas de doze horas mostraram que o pico do *An. darlingi* se dá entre 19:00 e 22:00 em meses de baixa densidade, sendo que verificou-se a existência de picos nas demais horas da noite em coletas de elevada densidade. As análises moleculares utilizando sequenciamento do gene mitocondrial ND4 não mostrou haver variabilidade entre os espécimes de *An. darlingi* coletadas dentro e fora das residências. A variação de haplótipos durante o tempo do estudo mostrou que, apesar de haver abertura para inserção de novos haplótipos (mosquitos) em épocas de transição, a estrutura da população se mantém constante durante o ano. O *An. deaneorum* foi a segunda espécie mais encontrada. Foram também identificados *A. triannulatus*, *A. rangeli*, *A. albitarsis*, *A. brasiliensis*, *A. argyrtarsis*.

## Abstract

*Anopheles* spp. include species of major epidemiological importance, because of their role as the main malaria vectors. Studying mosquito variability, their behavior and the various regions they infest are the main objectives of medical entomology. In Brasil, *An. darlingi*, the main vector of disease, is found predominantly in northern area, where are reported 99,5% of malaria. This study consists in monitoring mosquito variability during eight months, in two different regions of a rural settlement, the “Ramal do Granada” located in Acrelândia, Acre. The “Ramal do Granada”, a road in the Amazon biome, whose extension is 30 km from point 0 (BR 364), has different ways of population settlement, varying accordingly to the observed kilometer. The tendency is: the farther from point 0, the lower is the number of residents and the level of deforestation. The collections are performed during three days, two days for three-hour captures and one day for a twelve-hour capture. Mosquitoes were collected by human landing inside and outside the houses. Each collection is made between intervals of two months, following the seasonal variation of rainfall, environmental factor closely connected to the presence of the *Anopheles*. Populational variations and density has been analyzed, together with molecular analysis of *Anopheles darlingi* by part of ND4 gene sequencing. The data presented shows differences inside the settlement: number of collected mosquitoes was greater in all collections nearby the settlement limits, representing newer settlements. The twelve-hour captures have shown the presence of only one density peak occurring between 7:00PM to 10:00 PM in months of low density, and verified the existence of peaks in the remaining hours of the night, in collections of high density. Molecular analysis using sequencing of the mitochondrial ND4 gene showed no variation between the *An. darlingi* collected outdoor and indoor. *An. deaneorum* was the second most frequent in the collection. Several anopheline species have been identified: *A. triannulatus*, *A. rangeli*, *A. albitarsis*, *A. brasiliensi* and *A. argyrtarsis*.

## 1-Introdução

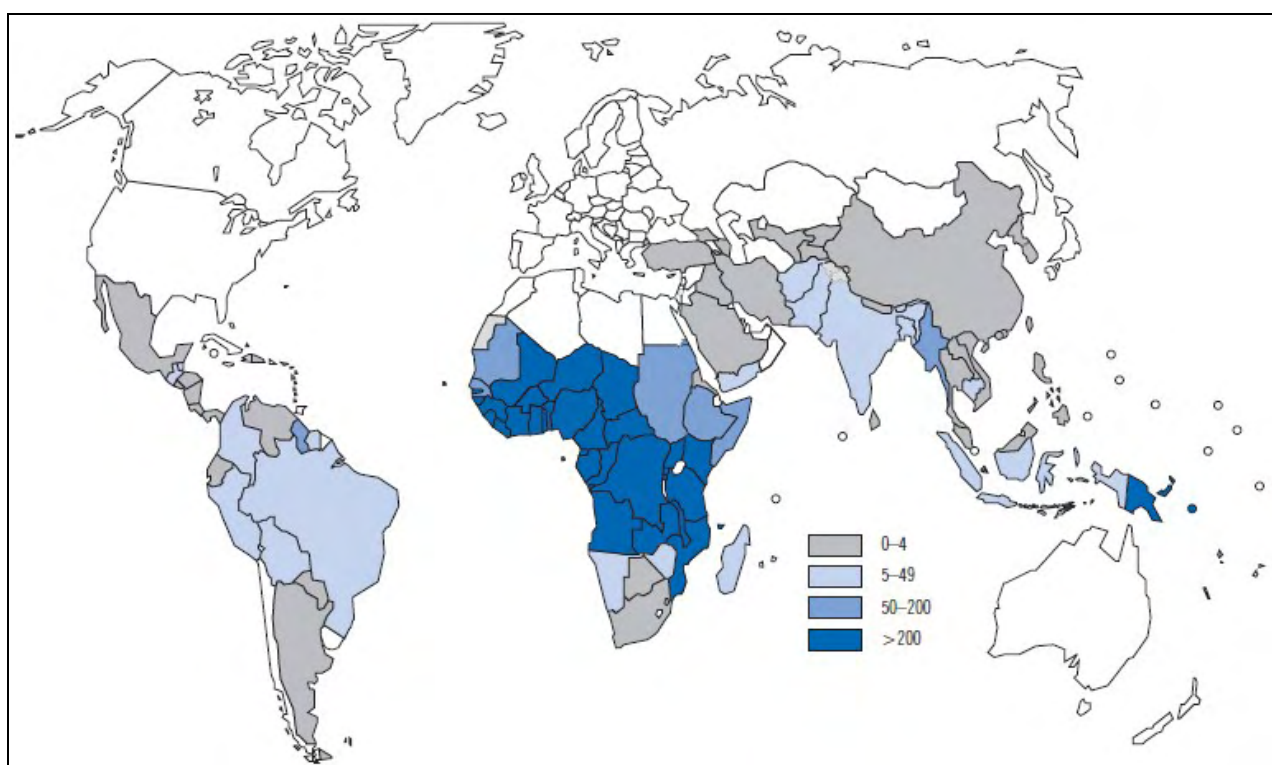
Desde o início, na ordem natural de sua evolução, o homem viveu comumente ligado a outras espécies de seres vivos presentes no mundo. Mudanças significativas realizadas em todo o universo natural alteraram ecossistemas, junto com as comunidades que neles se inserem. Essas modificações antropológicas têm relação direta com a capacidade de determinadas espécies desenvolver-se em ambientes alterados e, conseqüentemente, com o surgimento de novas e diversas interações entre o *Homo sapiens* e tantos outros seres vivos de diferentes reinos, famílias e espécies. Dentro deste contexto há também uma enorme quantidade de agentes causadores e transmissores de enfermidades ligadas ao homem, que apresentam visíveis mudanças em sua biologia e comportamento devido a estas ações antrópicas. Em menor ou maior escala essas enfermidades, dependendo de diversos fatores, influenciam os principais aspectos culturais, sociais e econômicos da humanidade. A malária se insere neste grupo de doenças, ganhando importante visibilidade, pois recentes dados da OMS acusam que há um total de 104 países endêmicos para a doença no ano de 2008, dentre os quais 45 apenas no continente africano (WHO, 2008).

A malária é uma doença causada por espécies de protozoários (Reino Protozoa) do gênero *Plasmodium* sp. e transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles* sp. É considerada a enfermidade transmitida por artrópodes mais impactante em países em desenvolvimento e, conseqüentemente, maior alvo de estudos acadêmicos e campanhas de erradicação pelo mundo, incluindo órgãos de fomento patrocinados por grandes ativistas mundiais, como Bill & Melinda Gates Foundation e Willian J. Clinton Foundation.

Há quatro espécies dentro do gênero *Plasmodium* que causam a malária humana: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*. As diferenças entre os agentes patogênicos podem ser observadas quanto à infecção, sintomas e as terapias utilizadas para o tratamento: alterações dentro do quadro clínico de um doente com malária e na evolução do protozoário no organismo do hospedeiro ocorrem de acordo com a espécie infectante. A principal diferença, do ponto de vista epidemiológico é a mortalidade: casos de *P. falciparum* não tratados possuem elevados índices de óbitos, sendo a espécie mais mortal dentre as quatro causadores da malária (WHO, 2009.)

Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que, no ano de 2006, 36 % da população mundial habitava locais com algum risco de contrair malária. A mesma variante, calculada com a soma do risco baixo (menos de 5% da população é infectada), intermediário (entre 5% e 40% da população é infectada) e alto (mais de 40% da população é infectada), mostra que a porcentagem de

habitantes do continente africano morando em zonas de risco é de 81%. O continente africano também é castigado com o *P. falciparum*, pois, dos 247 milhões de casos mundiais reportados pela NMCP (National Malaria Control Programme), aproximadamente 230 milhões foram de *P. falciparum*, dos quais 86% pertencem ao continente africano, seguindo 9% no oeste asiático. Dados de mortalidade também mostram a África na primeira colocação deste triste *ranking* da malária mundial: dos 881.000 mortos estimados pela NMCP em 2006, 90% dos casos foram registrados no continente, seguidos de 4% do sudeste asiático e 4% em regiões do Mediterrâneo oriental. Assim entende-se a importância dada ao combate desta doença em todo o mundo, principalmente na África (Fig. 1).



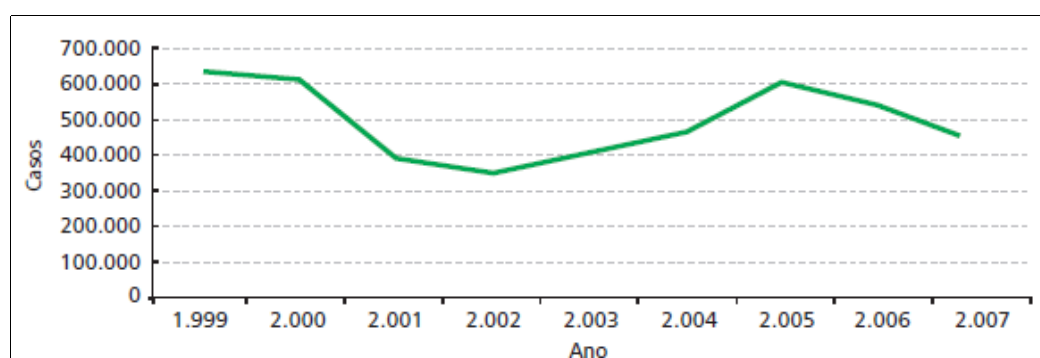
**FIGURA 1.** Incidência de casos de malária a cada 1000 habitantes (2006)  
(World Malaria Report, WHO, 2008)

Apesar de existir regiões propícias ao desenvolvimento de endêmias e surtos esporádicos em algumas áreas específicas na América Latina, ao observar dados da malária mundial, os números mostram grande alternância para os dados africanos. Utilizando como modelo o boletim da OMS de 2008, onde há notificações específicas do ano de 2006, não houveram casos registrados ou mortes por malária nos Estados Unidos, Canadá, Uruguai, Chile e Guiana Francesa, tem-se uma porcentagem relativamente baixa dentro das três Américas: 15% da população morando em zonas de risco. Os países da América Latina que apresentaram os mais elevados números da doença, em valores absolutos, foram, respectivamente: Brasil, Colômbia, Peru, Haiti, Guatemala e Venezuela.

Suriname, Guiana e Haiti também possuem altos índices da doença, quando relacionado o tamanho da população do respectivo país. Quanto a mortalidade, a lista segue semelhante: Brasil, Haiti, Colômbia, Peru e Venezuela (World Report Malaria, 2008). Nota-se que os países da América do Sul que compõem as listas citadas são os que possuem, dentro de seu território, extensões da floresta Amazônica, rico bioma sul-americano e habitat de diversas espécies anofelinicas com potencial vetor para a malária (Souza-Santos, 2002; Galardo et al., 2007; Vittor et al., 2009)

O Brasil, em valores absolutos, é o país com maior número de casos e mortes das Américas. Possui 15% de sua população total morando em áreas de risco e apresenta em sua grande maioria casos de *P. vivax*, seguidos de *P. falciparum* e com alguns casos de *P. malariae* (Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2008). A malária é endêmica nos estados que compõem a Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), havendo também notificações nas regiões centro-oeste e sudeste (Limongi et al., 2008; Rezende et al., 2009; Santos et al., 2009).

Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (Situação Epidemiológica da Malária no Brasil 2008) há uma média de 500 mil casos por ano. No período de 2000 a 2002 houve redução na notificação de casos. No entanto, essa queda não foi mantida e no período de 2003 a 2005 observou-se crescimento no registro da doença. Porém, nos dois últimos anos, 2006 e 2007, houve uma reversão desta tendência de crescimento, com uma importante redução de 9% em 2006, quando comparado com 2005, e de 17% em 2007 em relação a 2006 (figura 2).



**Figura 2:** Número de casos de malária. Amazônia Legal, 1999 a 2007 (Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2008)

Estes dados mostram a importância do contínuo levantamento e notificações de casos da malária. Esta ferramenta epidemiológica é vista e estudada pela OMS, ministérios e secretarias de saúde de diversos países com áreas endêmicas, estabelecendo onde e como os programas de

prevenção, tratamento e combate devem ser aplicados. De forma resumida, as medidas de contenção à malária são: diagnóstico e tratamento da doença e o controle vetorial. Logo, compreender a biologia e o comportamento do vetor é de extrema importância para o eficiente controle desta enfermidade.

### *Gênero Anopheles*

Os mosquitos do gênero *Anopheles* (filo: Arthropoda, classe: Insecta, ordem: Diptera, família: Culicidae) são de grande relevância quando analisamos aspectos importantes na epidemiologia e transmissão da malária. Segundo o banco de dados Systematic Catalog of Culicidae, o gênero, considerado cosmopolita e encontrado tanto nas regiões tropicais como nas subtropicais, possui, dentro dos sete subgêneros que o compõe, cerca de 457 espécies identificadas, dentre as quais 150 estão localizados no continente africano, 79 na América do Sul e 178 na Ásia. Porém, quando consideramos o tamanho dos continentes, há uma proporção maior de espécies anofelínicas no continente africano. Este fato deve-se a África possuir a maioria de suas regiões em áreas tropicais, com presença de matas, climas quentes e frequente precipitação em épocas úmidas. Esses fatores contribuem com o desenvolvimento de diversas espécies de culicídeos, sendo que podemos citar também os pertinentes assuntos sobre mudanças climáticas atuais, estes que influenciam alterações da adaptabilidade de espécies anofelínicas no continente e, conseqüentemente, na epidemiologia da malária local (Peterson, 2009). Também é importante citar neste contexto que no norte da Ásia encontram-se regiões de clima frio, próximos ou inseridos no Circulo Polar Ártico, ambiente que reduz a capacidade de dispersão de anofelinos, entre outros culicídeos.

Dentro da grande variabilidade do gênero *Anopheles*, há também a variação das espécies no papel da transmissão da malária humana. A dinâmica de transmissão que envolve o vetor, o parasita e o hospedeiro é influenciada por um grande número de fatores, e suas aplicações em modelos matemáticos tentam agregar os principais componentes desse complexo sistema, afim de se entender como e quais são os principais componentes da transmissão. Segundo Forattini (2002), nas doenças transmitidas por mosquitos, a eficiência de um vetor hematófago em se infectar e transmitir um agente patogênico dá-se por diversos pontos, dentre os quais podemos citar:

-infectibilidade protozoário-mosquito: a relação entre o organismo do anofelino com o ciclo de vida do plasmódio.

-contato eficaz: o contato entre a fonte, representado pelo organismo infectado, e o suscetível, o organismo apto a hospedar o agente infeccioso, durante determinado período de tempo

para que ocorra a transmissão. Esse sentido vale tanto para o anofelino se contaminar com gametócitos de *Plasmodium*, quanto transmitir esporozoítos a um hospedeiro específico.

-capacidade vetora: a maneira que a infecção pode se espalhar numa determinada população de hospedeiros graças a ação do vetor. Há um grande número de variantes que influenciam a capacidade vetora: o número de picadas (repasto sanguíneo) potencialmente infectantes do anofelino; o tamanho (densidade) da população vetora; a preferência do sangue ingerido pelo vetor (zoofílico e antropofílico); a frequência e o período da atividade hematofágica; período de vida do vetor (viável a participar da transmissão).

Há duas nomenclaturas utilizadas para designar a eficiência de um vetor na transmissão de *Plasmodium*: vetor principal, que designa espécies responsáveis pelas transmissões em zonas endêmicas, e vetores auxiliares, os quais apresentam a capacidade de transmissão do plasmódio em determinadas circunstâncias, como o aumento significativo de sua população em uma respectiva área (Forattini, 2002). Consoli & Oliveira (1998) designam as características que diferem um vetor auxiliar para um principal: hábitos exófilico e zoofílicos, mas que na ausência de hospedeiros preferenciais ou em épocas de elevada densidade podem se alimentar com sangue humano e, ocasionalmente, participam da transmissão da doença. Também é possível verificar uma mesma espécie ser designada primário ou auxiliar, conforme a área de estudo analisada: o *Anopheles rangeli*, que no Brasil é considerado um vetor auxiliar, tem um importante papel na transmissão da malária em outros países da América do Sul (Quiñones et al., 2006).

Quanto a preferência hematofágica, pode-se associar o comportamento antropofílico como um importante fator que contribuiu com determinados vetores serem potenciais transmissores para a malária (Arruda et al., 1986; Tadei & Thatcher, 2000). Há ainda casos de infecção mista: pode-se encontrar mosquitos infectados com mais de uma espécie de *Plasmodium* dentro dos quatro diferentes causadores da malária humana, aumentando assim as chances de infecção em áreas onde são disseminados *P. vivax* e *P. falciparum*, por exemplo (Gutiérrez et al., 2009; Hasan et al. 2009).

Importante destacar também que dentro do gênero *Anopheles* há também vetores de outros parasitas, como a *Wuchereria bancrofti* (Burkot et al., 1990; Rao et al., 2009) e, outros tantos arbovírus (Rosa et al, 1992; Almeida et al, 2008).

### *Principais vetores da Malária no mundo*

Através das considerações de como podemos classificar um vetor quanto a sua eficiência na transmissão da malária, é factível verificar também quais são os principais e suas respectivas áreas de infestação. Considerando que os gêneros compõem um número elevado de espécies e, sendo que

a princípio, nem todas apresentam comportamento transmissível da malária, é de importância conhecer os hábitos desses vetores, junto com os fatores que alteram sua diversidade e comportamento, conseqüentemente, alterando também a transmissão da malária na área de estudo.

Os mosquitos vetores da malária são considerados holometábolos, possuem nichos diferentes durante suas fases de vida, sendo dividida em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto alado. Semelhante aos outros gêneros da família (*Culex* e *Aedes*) o anofelino necessita de água no desenvolvimento de sua fase larval. Assim, utilizam como criadouros principalmente lagos, pântanos, bromélias e outras reservas de água em diversas áreas, incluindo recipientes artificiais (Forattini et al., 1998).

Dentre os principais mosquitos com importância epidemiológica na transmissão da malária no mundo podemos citar, no continente africano, o complexo de espécies *An. gambiae*, encontrado na África Subsaariana (Coetzee, 2004; Bass, 2007), e o *An. funestus* presente na região oeste do continente, na Nigéria, Camarões e Gana (Moffett et al., 2007). Nos países localizados no sul Ásia, podemos citar o complexo *An. culicifacies* como um importante vetor em zonas rurais da Índia, (Barik et al., 2009) e o complexo *An. dirus*, *An. minimus* e *An. harrisoni* nos países do sudeste asiático (Manguin et al., 2008).

Na América do Sul, a diversidade de espécies anofelínicas é elevada. Considerando os vetores de grande importância nos países que apresentam maior número de casos, podemos citar: *An. albimanus*, *An. darling* e *An. nuneztovari* na Colômbia (Olano et al., 2001; Zapata, 2007), o *An. darlinigi* e o *An. benarrochi* no Peru (Schoeler et al., 2003; Turell et al., 2008), *An. darlinigi* na Bolívia (Harris et al., 2005), *An. darlinigi*, *An. marajoara* e *An. aquasalis* na Venezuela (Berti et al., 1993; Magris et al., 2007; Moreno et al., 2007) e, por fim, podemos citar no Brasil o *An. darling* e o *An. aquasalis*, (Xavier & Rêbello, 1999; Gil et al., 2003) A presença do *An. darlingi* em todos os países citados explica o porquê dele ser um grande alvo da maioria dos estudos de dinâmica de vetores da malária em países da América do Sul.

### *Anopheles darlingi*

A floresta Amazônica, bioma que apresenta a maior biodiversidade do mundo e constante alvo de campanhas de preservação e conservação, haja visto que sua degradação é discutida pela maioria das nações do globo, possui áreas e cidades com altos índices de casos de malária, sendo o principal alvo de medidas de controle e estudos direcionados a doença no país.

Noventa e cinco por cento dos casos de malária no Brasil são notificados na região denominada Amazônia Legal (Ministério da Saúde, 2009). Essa região agrega estados brasileiros

com semelhantes fatores geográficos e econômicos: área de floresta Amazônica, proporcionalmente pouco urbanizada em seu interior; grande concentração populacional nos principais centros urbanos, mas com baixa densidade demográfica em seu interior; economia fortemente ligada ao extrativismo e a agropecuária. Esta zona de grande extensão sofreu semelhantes processos de degradação florestal com o passar dos anos: áreas nativas de matas foram cedidas à planos de migração e assentamentos, tornando-a local para habitação humana e, conseqüentemente, sofrendo diversas ações antropológicas. Ações estas que alteraram o habitat natural e o comportamento de diversos animais nativos, incluindo os mosquitos do gênero *Anopheles*.

Historicamente, no Brasil, vetores da malária ficaram amplamente conhecidos na primeira metade do século XX. Apoiados pelas novas descobertas do papel destes vetores na transmissão de doenças e com o início dos estudos de entomologia médica, intensificou-se o combate e medidas de controle à anofelinos em zonas endêmicas. O grande exemplo foi a erradicação do *Anopheles gambiae* no estado do Rio Grande do Norte na década de 30. Oriunda da África, a espécie invasora foi responsável por uma das piores epidemias de malária no nordeste brasileiro, sendo erradicada em 1940 (Nascimento, Carvalho & Marques, 2006; Parmakelis et al., 2008).

Já em meados da década de 1970, durante o ciclo da recolonização da região norte, houve intensa migração de mão de obra para a região, onde um grande número de pessoas buscavam oportunidades nos ciclos agrícolas e da mineração. Destes migrantes, boa parte instalou suas residências em locais propícios ao desenvolvimento do mosquito (lagoas, riachos e rios na mata amazônica), alterando significativamente o ambiente (construção de moradias em meio a matas, represamento de igarapés e formação de açudes). Essas alterações favoreceram as espécies antropofílicas, em detrimento de outras que habitavam os ambientes naturais, selecionando assim mosquitos hematófagos. Como consequência dessa extensa migração para a região, desenvolveram-se grandes epidemias, levando a malária a ter novamente *status* de preocupação em termos de saúde pública (Tadei, 1986; Deane, 1989). Conseqüentemente, houve intensa investigação para erradicação doença, onde desenvolveram-se diversos recursos e planos de controle à malária, tais como: criação de bases para diagnóstico em áreas de risco, notificação e identificação de casos, distribuição ampla e gratuita de remédios, captura e geonotificação de focus dos vetores, identificação de criadouros e borrifação de inseticidas (Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária, 2003). Apesar de muitos esforços e aprimoramento dessas ferramentas de controle, há ainda medidas que se mostram deficientes a longo prazo, como a resistência adquirida por anofelinos a inseticidas (Vezenegho et al., 2009), levando assim a necessidade de estudos mais intensificados, principalmente visando entender as constantes mudanças no comportamento do vetor, consequência da alteração ambiental.

Como já citado, o *An. darlingi* é o principal transmissor da malária no Brasil. Vários fatores podem ter contribuído para esta capacidade: a espécie ser altamente susceptível a plasmódios que infectam humanos; hábito antropofílico; capacidade de transmitir malária dentro e fora das residências; hábitos de picadas e comportamento hematofágico relacionado a ações antropológicas (Deane, 1986; Consoli & Oliveira, 1998). A sua distribuição é de grande abrangência, se estendendo sobre uma grande área da América do Sul e, respectivamente, do Brasil (Figura 3).

Sua biologia e desenvolvimento também são fatores relevantes, pois o mosquito utiliza como criadouros coleções líquidas de uso comum ou próximos a residências, como: lagoas, açudes e margens de rios. A fase larval se desenvolve em águas limpas, onde estão presentes restos de matéria orgânica da vegetação local, vegetação submersa e sombreamento, porém, apesar de se ter maior frequência em rios, também é sabido que, quando ocorrem as cheias devido a épocas de intensa precipitação, pode-se aumentar muito a quantidade de criadouros que se formam devido a transbordamentos: poças, valas e campos encharcados (Manguin et al. 1996). Apesar dessa versatilidade de criadouros, há locais onde a espécie só foi encontrada em lagoas com macrófitas submersas (Rejmankova et al., 1999). Vittor e colaboradores (2009) mostram também que a presença humana na Amazônia peruana influencia no surgimentos de novos criadouros: represamento e criação de grandes lagos para piscicultura e com o crescimento de mata secundária, esta última consequência direta da desflorestação.

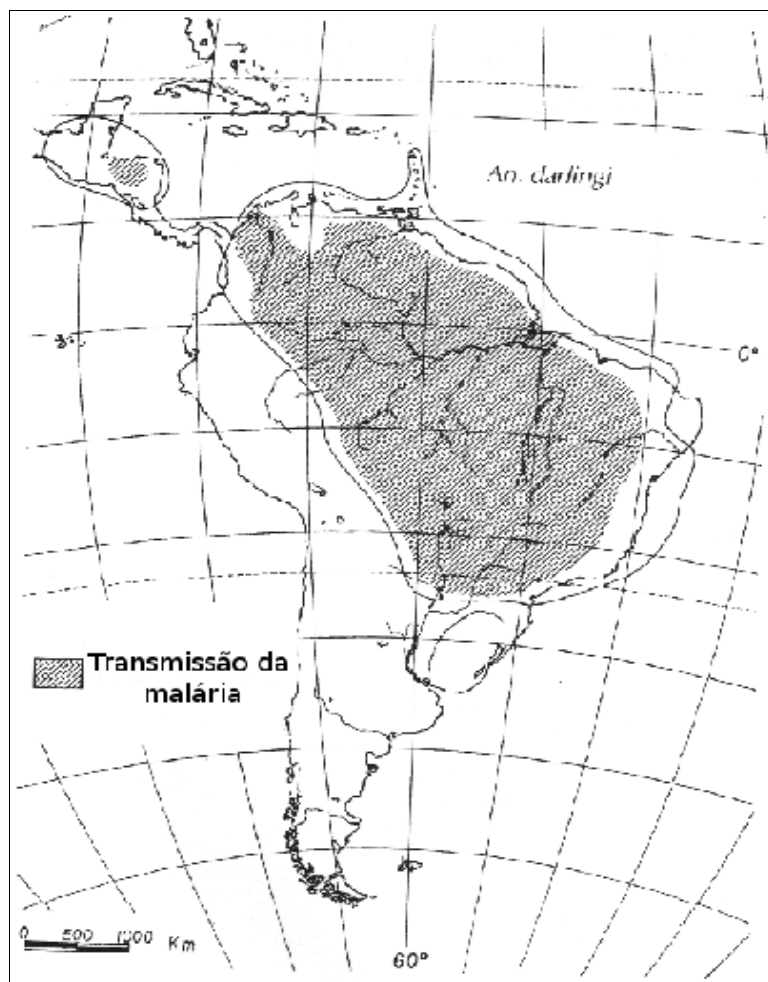
A sazonalidade do *An. darlingi* e sua ligação com as épocas de chuva são constantemente observadas, já que com o aumento da população do vetor, pode-se aumentar também os números da malária. Verifica-se um aumento da densidade populacional na transição entre as épocas de chuvas e épocas secas, fenômeno este que faz com que as coleções de águas estabeleçam condições ótimas para o desenvolvimento da espécie (Tadei et al., 1998; Vittor et al., 2009). Gil e colaboradores (2003) demonstraram que conforme a área de estudo analisada, pode haver alteração na sazonalidade do *An. darlingi*: enquanto uma área isolada, as margens do Rio Madeira (Porto Velho, RO) e com um baixo número de habitantes ribeirinhos apresentou densidade baixa de mosquitos durante as épocas secas, aumentando significativamente após dois meses do início das chuvas, o outro sítio do estudo, caracterizado por ser uma fazenda de extração de madeira e com alto número de habitantes, apresentou alta densidade no fim das estações chuvosas, mantendo-se alta mesmo após o término das precipitações.

Os períodos de atividade hematofágica são crepusculares e noturnos, com picos nas primeiras horas da noite, podendo haver prolongação dessa atividade durante a madrugada, conforme a estação e a densidade populacional do vetor (Lourêncio-de-Oliveira et al., 1989). Quanto ao comportamento endofílico/exofílico existe a hipótese dessa característica ter se alterado devido

as metodologias de controle, que consistiam na borrifação de inseticidas dentro das residências (Akhavan et al., 1999). Constante foram as análises quanto do *An. darlingi* ser endofílico e endofágico, sendo que após o respató sanguíneo dentro das residências, as fêmeas repousavam na estrutura interna da própria casa (Deane, 1947; Deane, 1989). Trabalhos mais atuais mostram uma significativa mudança de comportamento, onde verificou-se maior presença do mosquito no peridomicílio, fora das residências mas próximos a elas, mostrando que ainda se mantém como um eficiente transmissor da doença (Lourêncio-de-Oliveira et al., 1989; Gil et al., 2003; Santos et al., 2009). Também é interessante citar que a atividade hematofágica da espécie encontra-se na dependência do teor de umidade e da temperatura ambiente (Forattini, 2002).

O hábito antropofílico da espécie é um dos principais fatores que podem ter tornado o mosquito um vetor eficiente na América do Sul, pois, devido a esta característica, seu comportamento, hábitos e biologia foram extremamente influenciados pela urbanização de seu habitat. Sabe-se que o *An. darlingi* ataca consideravelmente mais humanos do que outros animais que pernoitam dentro das residências, seja domésticos ou como iscas em experimentos científicos (Giglioli et al., 1956; Deane, 1986; Lourêncio-de-Oliveira et al., 1989). Seu controle é realizado basicamente como as outras espécies do gênero: borrifação de inseticida e uso de mosquiteiros ao entardecer e durante a noite, horário onde é normalmente verificado o seu pico.

A soma desses fatores, que alteram tanto o habitat quanto o comportamento hematofágo do *An. darlingi*, induz a se pesquisar se há e quais são as diferenças entre os indivíduos que compõem a espécie. Degradação florestal, aumento da densidade demográfica em locais de mata e modificações climáticas são fortes influências nas alterações da composição de comunidades anofelínicas e tem forte impacto na transmissão da malária. Portanto, há essa necessidade de se obter ferramentas para identificar e caracterizar a grande variabilidade intra-específica nas populações do *An. darlingi*.



**Figura 3:** Mapa da distribuição geográfica do *An. darlingi*, e áreas de potenciais transmissão da malária.  
(Forattini, 2002)

### *DNA mitocondrial*

O uso de análises de DNA no estudo de populações é amplamente utilizado na biologia e suas subdivisões. Pode-se usar este dado para estudos evolutivos, ecológicos, paleontológicos, geológicos e de impactos ambientais. O caso de se realizar análises moleculares em estudos entomológicos é de rica aceitação, pois dados obtidos através do DNA proporcionam resultados mais precisos, principalmente na variabilidade intra-específica.

Estudos baseados no DNA oferecem vantagens sobre outros métodos, principalmente quando os indivíduos apresentam diferentes fases em seu ciclo de vida: pode-se utilizar essas análises em todos os estágios do desenvolvimento do anofelino, já que o DNA permanece constante, independente do estágio de desenvolvimento e sexo, além de proporcionar resultados mais confiáveis e aceitáveis.

Para uma melhor compreensão e interpretação dos estudos populacionais, faz-se necessário associar as diversas características dos indivíduos estudados e agregá-los a grupos semelhantes. As análises moleculares contribuem para esse objetivo, nos propiciando marcadores mais eficientes do que os morfológicos. Logo tem-se a necessidade e o por quê da plena expansão do desenvolvimento de marcadores moleculares. A ferramenta permite analisar melhor o indivíduo, tanto inter como intra-especificamente, além do melhor diagnóstico espécie-específico. Esse recurso é de rica aceitação na entomologia médica, pois é nesta ciência que visa a melhor compreensão da população de vetores, seus diferentes comportamentos e a influência dos mesmos no papel epidemiológico da doença (Conn et al., 2006).

Há ainda, quando se estuda a morfologia de mosquitos e insetos em geral, a dificuldade de se analisar indivíduos pertencentes ao complexo de espécies crípticas. Espécies crípticas são grupos de espécies intimamente relacionadas, nas quais apresentam características morfológicas idênticas ou semelhantes, o que dificulta a sua correta identificação, sendo necessário o uso de análises moleculares para o diagnóstico correto do espécime (Rona et al., 2009). Muito comum encontrar esse complexo nos artrópodos, o gênero *Anopheles* possui muitos de seus representantes caracterizados como crípticos, dentre os quais, alguns vivendo em simpatria (Brochero et al., 2006; Silva do Nascimento et al., 2006). O próprio *An. darlingi* é alvo de discussões quanto a essa classificação: Charlwood (1996) através de análises da ecologia de larvas do mosquito, comportamento hematofágico, hábitos de picadas e o tamanho das asas, sustentou essa possibilidade, o que poderia alterar o entendimento na transmissão da malária em diversas áreas onde a espécie é vetora. Entretanto Manguin e colaboradores (1999) demonstram através de análises de isoenzimas, RAPD-PCR e marcadores ribossomais ITS2, além de estudos da morfologia do inseto, que o *An. darlingi* é apenas uma simples espécie, e sugere que essa diversidade se deve ao fluxo gênico constante entre as populações de diferentes localizações geográficas. Logo vemos a importancia de se compor nos estudos entomológicos as análises moleculares e genéticas.

Para estudos com o *An. darlingi*, que possui uma extensa distribuição geográfica, é necessário que o marcador nos forneça certo grau de polimorfismo detectável entre os indivíduos a serem estudados. As análises genéticas podem contribuir com o entendimento da elevada heterogeneidade observada na espécie, determinando as importantes informações sobre a eficiência do vetor, endofilia/exofilia e a capacidade de dispersão (Lounibos and Conn, 2000). Muitas metodologias estão presentes no desenvolvimento de diversos marcadores moleculares, sendo que podemos citar: cromossomos politênicos (Kreutzer et al, 1972); RADP (Random Amplified Polymorphic DNA), (Gonzales et al., 2007); isoenzimas (Rosa-Freitas et al., 1992); microssatélites (Mirabello et al., 2008); sequenciamento de regiões de ITS (Malafronte et al, 1999) e, por fim, o

sequenciamento do DNA mitocondrial (Freitas-Sibajev et al, 1995).

O sequenciamento de mtDNA é amplamente utilizado para verificar estruturas de populações na entomologia médica (Molina-cruz et al., 2004; Scarpassa et al., 2008, Barón et al., 2008). O genoma mitocondrial possui forma circular, de pequeno conteúdo e estrutura gênica simples, quando comparado com o nuclear. As mitocôndrias são herdadas apenas do gameta feminino e seu DNA possui alta taxa de mutação, o que possibilita verificar, nas análises de suas seqüências, alta frequência de polimorfismos (Moritz et al. 1987).

Um dos genes mitocondriais amplamente utilizado no estudo da estrutura de populações de culicídeos é o da Subunidade 4 da NADH Desidrogenase, o ND4. É constantemente visto em estudos com o *A. aegypti* (Bracco et al., 2007; Paduan and Ribolla, 2008; Urdaneta-Marquez et al., 2008 ). Com o *An. darlingi* o gene foi utilizado por nossa equipe e mostrou resultados satisfatórios (Angella et al. 2007): elevado polimorfismo na região sequenciada do ND4 e similaridade na diversidade nucleotídica de outros genes mitocondriais da mesma família em outros anofelinos neotropicais, como *An. rangeli*, o *An. trinkae* e o *An. nuneztovari* (Conn et al., 1997; Conn et al., 1998).

O estado do Acre esta inserido no grupo que compõe a Amazônia Legal. No ano de 2007, foram registrados 9.410 casos de malária, sendo que desse total, 8.595 só em acampamentos e assentamento rurais (Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2008). O município de Acrelândia, área de estudo desta tese, já é alvo de diversos projetos científicos e epidemiológicos referentes a malária, com espécies de *Plasmodium* (Bastos et al., 2007; Silva-Nunez & Ferreira, 2007) e de *Anopheles* (Marreli et al., 1998; Scarpassa & Conn, 2007; Sallum et al., 2008).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar as diferentes espécies anofelínicas que compõem o ambiente, o comportamento e a atividade do principal vetor da região, sabendo que a área é alvo de gradativas e constantes alterações de seu espaço físico, é de grande importância para se compreender a epidemiologia da malária em áreas de desmatamento. A principal medida de controle e combate aos vetores ainda é a borrifação de inseticidas, atividade que, além de produzir a seleção de espécies resistentes, também possui periculosidade à saúde de habitantes do local e de funcionários que manejam o inseticida. Entender o comportamento do vetor, assim como entender a sua biologia, transmissão e o resultado da interação de anofelinos com humanos é o principal papel da entomologia médica.

## 2.Objetivos

### 2.1-Objetivos gerais:

- Verificação da variabilidade das espécies anofelínicas e análise da dinâmica e estrutura populacional de *An. darlingi* em um assentamento rural na floresta Amazônica.

### 2.2-Objetivos específicos:

- Levantamento das espécies do gênero *Anopheles*;
- Verificação da presença do *An. darlingi* no intra, peri e extra-domicílio nas residências presentes na área de estudo;
- Verificação dos períodos de picos do *An. darlingi* no intra e peri-domicílio entre as 18:00 h e 06:00 h.
- Verificação da variação sazonal do *An. darlingi* durante o período do estudo, relacionando com dados de pluviometria e de casos autóctones da malária.
- Análises moleculares utilizando sequenciamento de parte do gene ND4 (subunidade 4 da NADH desidrogenase) em espécimes do *An. darlingi*, verificando a variabilidade da população entre o intra e peri-domicílio ao longo dos quatros meses de coletas do estudo.

### **3. Material e Métodos**

#### *3.1-Área de Estudo*

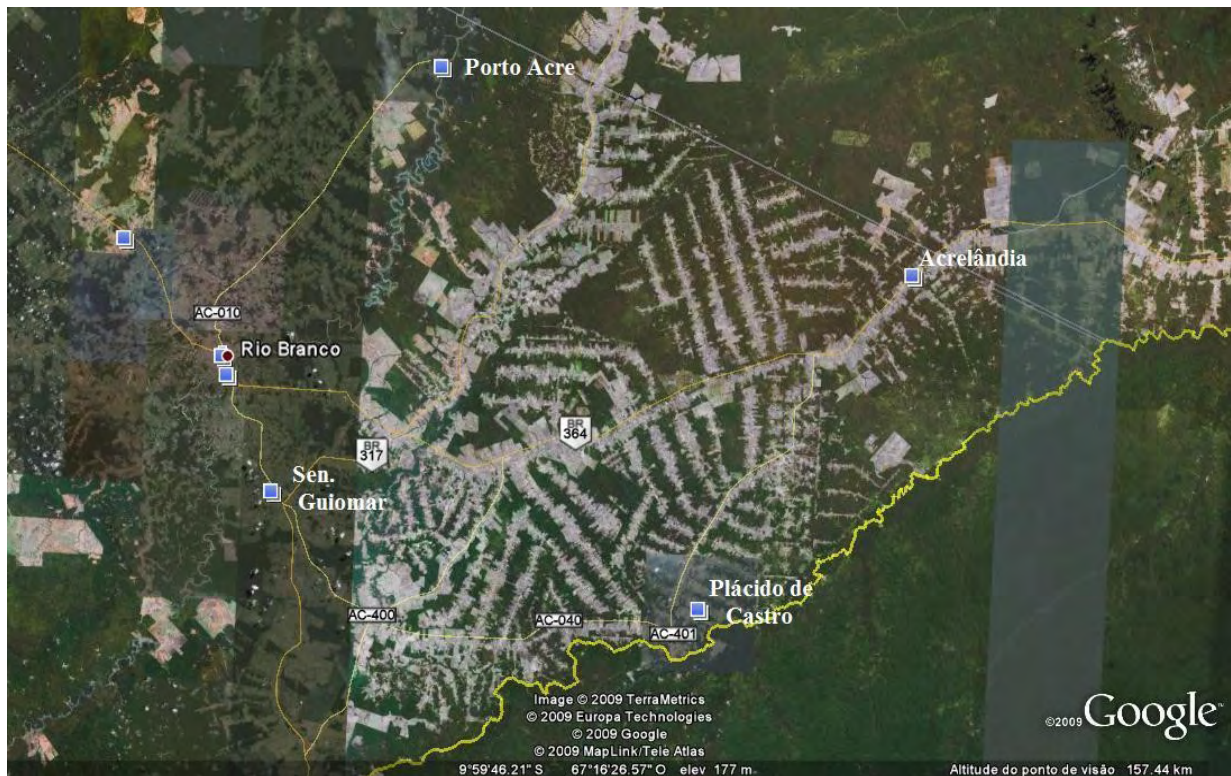
##### 3.1.1-Histórico dos assentamentos

A cidade de Acrêlandia, a 122 km de Rio Branco, é um pequeno município de aproximadamente 12.000 habitantes localizado na região oeste do estado do Acre. Limitada pelas cidades de Plácido de Castro, Senador Guiomar, pela fronteira da Bolívia e pelo estado de Rondônia, a região apresenta um histórico de urbanização semelhante a de outras regiões do bioma Amazônico, iniciado com ciclo da borracha, forte extrativismo econômico que atraiu intensamente mão de obra para a coleta de latex das seringueiras. Teve seu início entre o fim do século XIX e o começo do XX, dando partida para a urbanização dos estados da região norte e, conseqüentemente, a degradação da mata Amazônica (Adas, 2006).

Junto com o início da atividade extrativista, surgiram também micro-centros urbanos localizados em meio a floresta: os seringais. Local de moradia dos extrativistas e suas respectivas famílias, muito comum em áreas com elevado número de seringueiras, com números reduzidos de habitantes e limitado por matas, esses ambientes eram exclusivamente dependentes da extração da seringa. Com o fim deste ciclo, devido aos baixos preços de mercado, consequência das novas áreas de plantio na África e na Ásia, houve uma decadência na extração, onde muitos seringais se tornaram improdutivos (Adas, 2006). Já a segunda grande colonização na região, ocorrida no fim do anos setenta e no início dos oitenta, foi, de maneira geral, organizada pelo governo federal, com o loteamento de grandes áreas dos estados da região norte: os PAD, Programa de Assentamentos Dirigidos (Souza, 2002). A partir desse incentivo, e somando o fato de que muitos seringais improdutivos estarem a venda por baixo custo, houve um grande atrativo que levou migrantes de diversas regiões do Brasil ao estado, dando assim continuidade a exploração, desde os próprios recurso da mata (indústria madeireira, frutos nativos da floresta Amazônica), até o extrativismo mineral e a agro-pecuária. Assim, novas famílias acabaram inseridas em meio à mata nativa da região, modificando o bioma conforme as suas necessidades de trabalho e moradia.

Essas novas urbanizações inseridas na floresta, onde uniu-se humanos com diversas espécies de *Anophelinos*, são conhecidas popularmente como ramais: vias paralelas que conduzem às diferentes chácaras (colônias) ao longo da região, penetrando florestas adentro, perpendiculares a uma estrada principal, possuindo a forma de espinha de peixe (Figura 4). Há muitas variações entre os diversos ramais inseridos na Região Norte, diversificando, entre outros fatores, principalmente o

grau de desflorestação e no número de residências e de habitantes.



**FIGURA 4.** Foto de satélite de ramais ao longo do território acreano. (Google Earth, 2009)

### 3.1.2-Ramal do Granada

O Ramal do Granada (km 40, BR 364), área alvo deste estudo, possui uma extensão linear de 30 km a partir do ponto 0 (BR 364), além de sete linhas complementares (Linha 15, Linha 16, Linha 1, Linha 26, Linha 27, Linha 28 e a reserva da Linha 14), e é local de diferentes colônias (chácaras), com base econômica na agricultura e, principalmente, com o arrendamento de terras para pecuária (Fig. 5). O número de casas e o grau de desmatamento varia conforme o quilômetro escolhido: pode-se associar a proporção da degradação e de ações antropológicas com a distância percorrida no ramal. Considerando o ponto 0, na BR 364, o início do Ramal do Granada podemos considerar que quanto mais afastado do ponto 0, maior a diminuição do desmatamento e menor o número de famílias residentes.



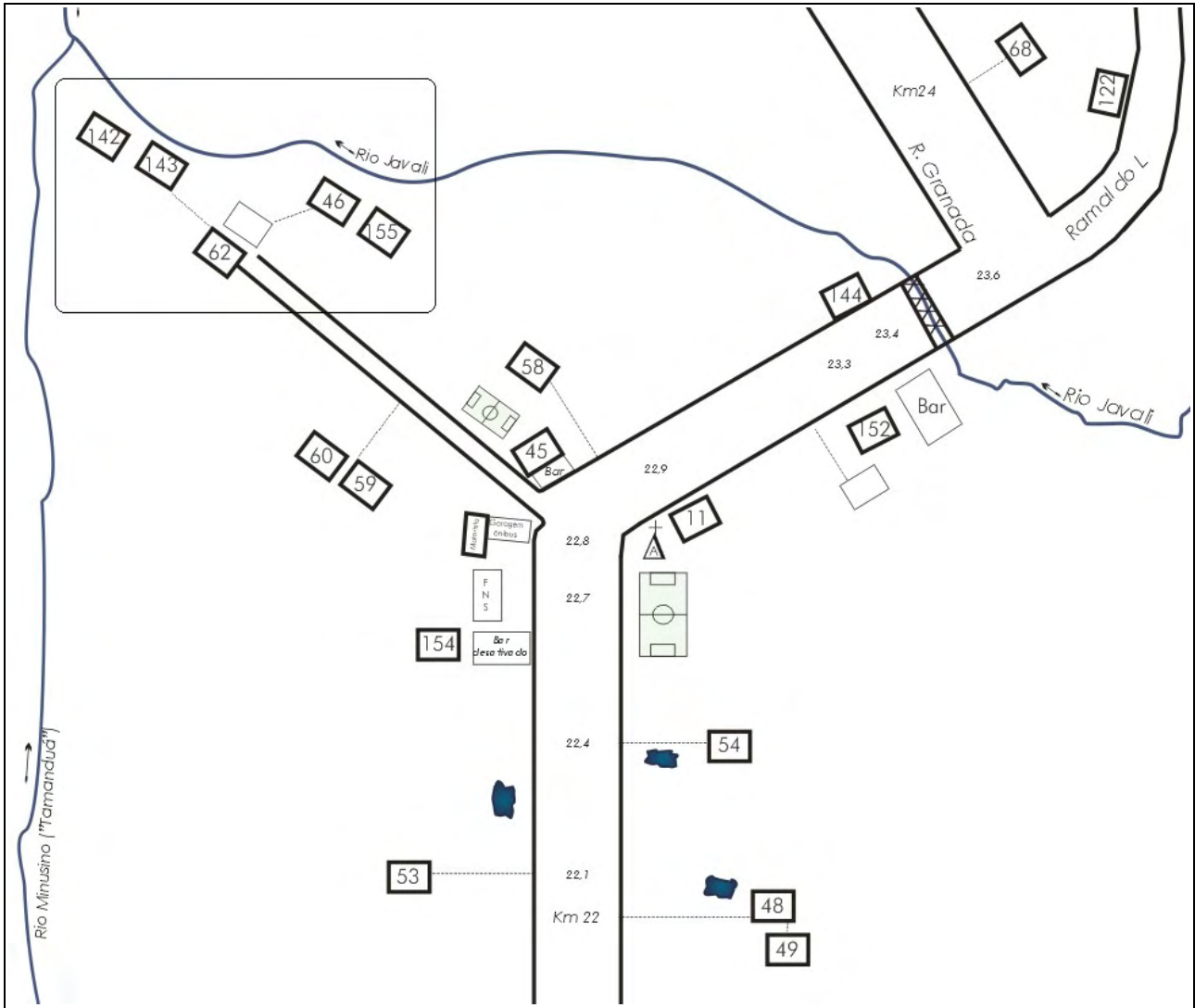
O Ramal, como muito outros presentes na região, faz parte do PAD Pedre Peixoto, assentamento fundado ao final dos anos 70 e, responsável pela loteamento e distribuição de uma grande porção de terra da região oeste do Acre, que engloba os municípios de Acrelândia, Plácido de Castro, Senador Guiomar e a capital Rio Branco (Fig. 4), (Nunez, 2008). A área, apesar do recente esforço com medidas políticas para conter o desmatamento, ainda passa por problemas de desflorestação, principalmente devido a pecuária.

O Ramal do Granada possui dois grandes rios como referência: o Abunã e o Iquirí. Seus afluentes, compostos por riachos e igarapés de pequeno porte, estão presentes no interior do ramal, onde os habitantes os utilizam para pesca e para abastecimento no uso doméstico e da pecuária. A população local do ramal varia conforme o quilometro em que se é analisado. São constantes a troca de colônias e a construção de novas casas em diferentes locais. Apesar de possuir muitos moradores fixos, é comum entre eles haver deslocamento para outros pontos e até mesmo para fora do Ramal, tornado assim qualquer mapa que indique a localização das casas e seus respectivos habitantes um dado não confiável conforme a época em que se analise.

Levando em consideração todas as informações, foram estipulados dois diferentes pontos para a realização da coleta de anofelinos: o km 24 (455ft; S09°44,542'; WO67°07,212') e o km 30 (421 ft; S 09°41,247'; WO67°07,692) do Ramal do Granada (Fig. 5). A descrição dos dois sítios de coleta são baseados no croqui feito pela Dra. Simone Ladeia Andrade, pesquisadora da área de malária, e reflete o número de casas e de habitantes na mesma época da realização deste estudo.

-km 24 (Fig. 6):

O sítio de coleta referente ao km 24 foi escolhido de acordo com a sua geografia e habitantes. O local agrega cinco residências, totalizando 16 moradores. A casa escolhida para realização das coletas intra-domicílio foi a do sr. Eraldo da Silva (Imagem 2 - ANEXO 1), pois esta localizada ao centro do sítio e, também próxima ao Rio Javali (Imagem 3 - ANEXO 1). O Rio Javali, que possuiu alternância de seu nível conforme as épocas de chuva, tangencia o sítio, junto com uma pequena mata ciliar. Ao outro lado do sítio, encontra-se um grande pasto, onde há uma linha d'água que o corta (Imagem 4 - ANEXO 1). O local para as coletas peri-domicílios foi à margem do rio Javali, a aproximadamente 7,0 m da residência (Imagem 3 - ANEXO 1), e para as coletas extra-domicílios, o fundo do pasto (aproximadamente 100 m da residência), distante suficiente das casas (Imagem 5 - ANEXO 1). Para a verificação das Imagens citadas no parágrafo, ver ANEXO 1.



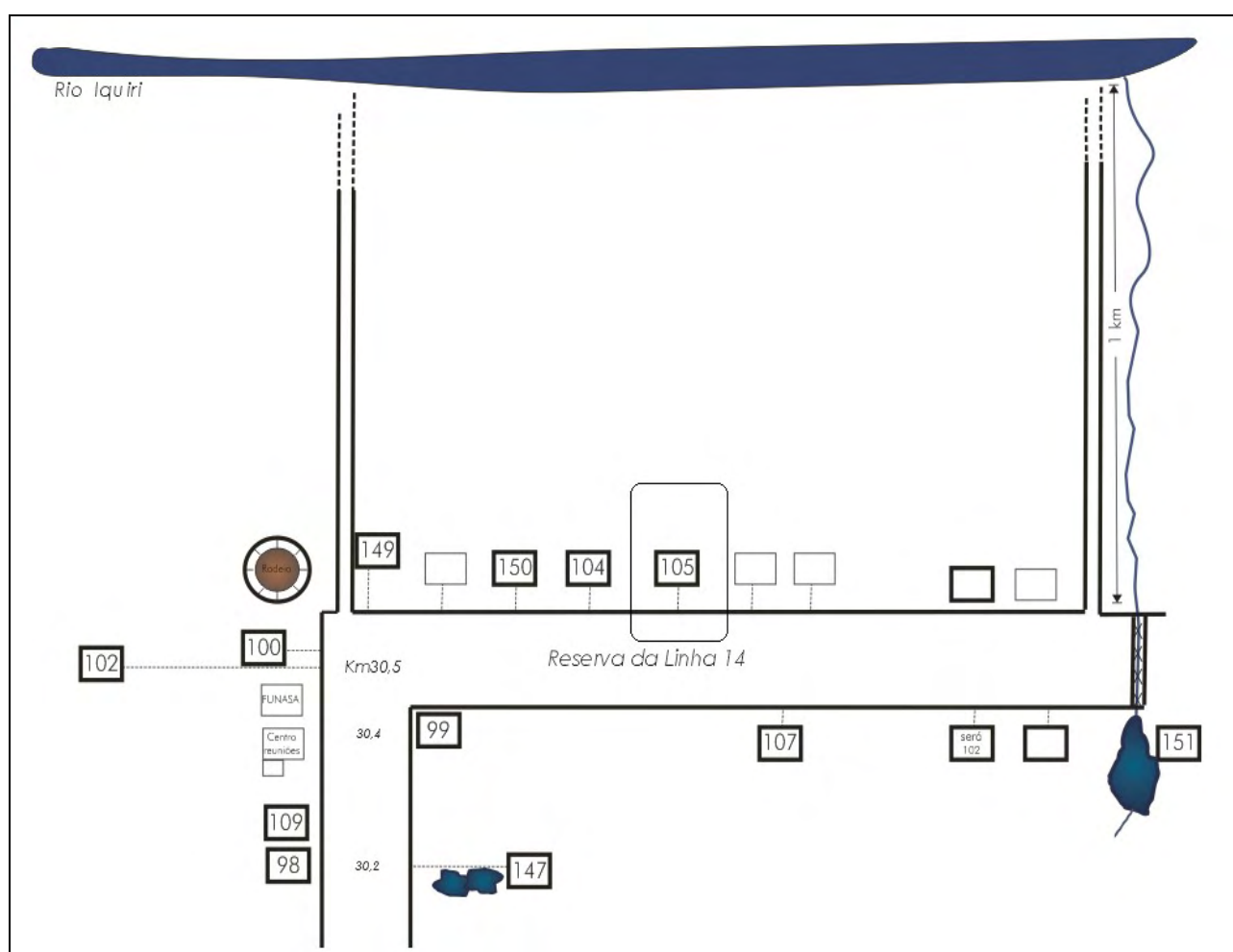
**FIGURA 6.** Área do km 24

Área que abrange o km 24 e, em destaque, o sítio de coleta. A casa escolhida para as capturas foi a de nº 143. Os números das casas pertencem a um estudo de coorte da pesquisadora Simone Ladeia Andrade. do km 24. Os quadrados sem preenchimento significam casas abandonadas. A sigla FNS significa a base da FUNASA para diagnóstico e tratamento.

Imagem: Simone Ladeia Andrade

-km 30 (Fig. 7):

O sítio de coleta referente ao km 30 representa uma área do ramal com menor número de habitantes. Neste local há apenas uma residência com cinco moradores, a do sr. Darildo Oliveira (Imagem 6 - ANEXO 1), sendo que ambas as chácaras de seu vizinho são afastadas (aproximadamente 300 a 400 m). A casa possui ao seu redor um grande pasto e, ao fundo, áreas de floresta ciliar do Rio Iquiri (Imagem 7 - ANEXO 1). No mesmo pasto há também um açude que varia o seu volume conforme a época das chuvas (Imagem 8 - ANEXO 1). A frente da residência, do outro lado do Ramal, há um pequeno resto de floresta, onde também se localiza um igarapé, sem uso pela família. A coleta peri-domicílio foi realizada no quintal da residência, próximo a porteira onde se inicia do pasto (Imagem 9 - ANEXO 1), e a extra-domicílio, dentro do próprio pasto, há aproximadamente 90 m, na beira do açude, afastada da residência e próxima ao gado (Imagem 8 - ANEXO 1). Para a verificação das Imagens citadas no parágrafo, ver ANEXO 1.



**FIGURA 7.** Área do km 30

Área que abrange o km 30. Os números das casas pertencem a um estudo de coorte da pesquisadora Simone Ladeia Andrade. Em destaque, o sítio de coleta do km 30. Os quadrados sem preenchimento significam casas abandonadas. Imagem: Simone Ladeia Andrade

### 3.2-Coleta de Anofelinos

A coleta tem por objetivo capturar formas aladas (adultos) das espécies do gênero *Anopheles*. O método de coleta é atração humana, forma clássica de captura e utilizado amplamente em pesquisas relacionadas à entomologia médica. Consiste na exposição de membros inferiores (pernas) dos captadores, onde estes ficam aguardando os mosquitos. Os anofelinos são capturados antes de se alimentarem, através de tubos denominados Aspiradores de Castro e, presos em gaiolas devidamente lacradas e arejadas. Este método é seletivo, pois se obtém apenas os mosquitos interessados.

A coleta é composta por três dias: dois para capturas de três horas, realizadas no km 24 no primeiro dia e no km 30, no segundo, e o último para a captura de 12 horas, realizada apenas no km 30. As capturas de 3 horas foram realizadas entre 18:00 às 21:00 (horário local), onde a equipe se dividiu em três locais diferentes em relação à casa escolhida: intra (dentro da casa), peri (a 10 m da casa) e extra (a aproximadamente 100 m da casa). Assim, com estes diferentes locais e horários, tivemos a seguinte disposição (Tabela 1):

**Tabela 1.** Disposição dos mosquitos coletados por 3 horas.

<b>Horário</b>	<b>Local em relação a casa</b>	<b>Relação Horário/Local</b>
18:00-19:00	intra	I1
19:00-20:00	intra	I2
20:00-21:00	intra	I3
18:00-19:00	peri	P1
19:00-20:00	peri	P2
20:00-21:00	peri	P3
18:00-19:00	extra	E1
19:00-20:00	extra	E2
20:00-21:00	extra	E3

Este padrão possibilitou, após a identificação e quantificação dos mosquitos coletados, relacioná-los ao local e ao horário de captura. A captura de doze horas, realizada no terceiro dia da coleta, manteve a mesma metodologia, porém a disposição foi alterada, sendo realizada apenas no km 30 e nas regiões de intra e peri, não havendo coleta no extra-domicílio (Tabela 2):

**Tabela 2.** Disposição dos mosquitos coletados durante 12 horas.

<b>Horário</b>	<b>Intra</b>	<b>Peri</b>
<b>18:00-19:00</b>	I1	P1
<b>19:00-20:00</b>	I2	P2
<b>20:00-21:00</b>	I3	P3
<b>21:00-22:00</b>	I4	P4
<b>22:00-23:00</b>	I5	P5
<b>23:00-00:00</b>	I6	P6
<b>00:00-01:00</b>	I7	P7
<b>01:00-02:00</b>	I8	P8
<b>02:00-03:00</b>	I9	P9
<b>03:00-04:00</b>	I10	P10
<b>04:00-05:00</b>	I11	P11
<b>05:00-06:00</b>	I12	P12

Com o objetivo de verificar a sazonalidade da população do *An. darlingi*, foram realizadas quatro coletas ao longo de nove meses: junho, setembro e novembro do ano de 2008 e fevereiro de 2009. Houve ainda uma primeira coleta, em maio de 2008, que fugiu dos padrões e metodologias estabelecidos nas quatro coletas que compõem este estudo. Erros na execução das capturas, alteração do horário do estado do Acre, mudança da residência do sr. Darildo (casa representativa do km 30) e a não separação correta dos espécimes durante a conservação em álcool foram suficientes para a não utilização dos dados obtidos.

Devido a problemas burocráticos, a equipe inicial que colaboraria com as coletas foi reduzida. Participaram das capturas Paulo Rufalco Moutinho, autor da tese, Simone Ladeia Andrade, da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, Marcelo Urbano Ferreira, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP), Luis Herman S. Gil e Rafael M. Bastos Cruz do IPEPATRO (Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais de Rondônia) e Aline Angêlla e Paulo Eduardo M. Ribolla, do Departamento de Parasitologia, Unesp-Botucatu.

Estabeleceu-se realizar as capturas de três horas em dois pontos do Ramal, diferentes quanto a degradação e números de habitantes. O intervalo entre 18:00 e 21:00 horas foi decidido conforme consulta na literatura, que relataram o hábito crepuscular do *An. darlingi* (Lourêncio-de-Oliveira et al., 1989; Gil et al., 2003) e, posteriormente, também mostrados nas capturas de doze horas no local. Há ainda o fato destas capturas terem sido feitas em dias consecutivos (primeiro no km 24, seguido do km 30), minimizando assim a influência de efeitos climáticos durante a coleta. Já as capturas de doze horas foram feitas apenas no km 30, pois as condições e recursos da equipe

permitiram a realização desta coleta somente em um dos sítios do estudo. A escolha do km 30 deve-se a maior quantidade de *An. darlingi* nas capturas de três horas, permitindo assim um número amostral elevado para análises do pico no comportamento hematofágico.

Os horários das borrifações de inseticidas foram alterados em ambas as residências dos dois sítios, a pedido da equipe. O supervisor da FUNASA/SESACRE em Acrelândia para o Ramal do Granada, José Ribamar Duarte de Oliveira, permitiu a não realização da prática de borrifação, pelo menos um mês antes de cada coleta.

### 3.3-Identificação das espécies

Após cada noite de coleta, os mosquitos, ainda vivos, foram identificados de acordo com suas características morfológicas, utilizando chaves de identificação do livro (Consoli & Oliveira 1998). As espécies foram separadas, e obteve-se a quantidade de espécimes coletadas por hora/local. Após a identificação, os anofelinos foram conservados em álcool isopropílico 70% em microtúbos devidamente identificados, para as análises moleculares.

### 3.4-Análises Moleculares

#### 3.4.1-Escolha das Amostras.

Como já descrito, foi utilizado como marcador molecular na análise da estrutura da população do *An. darlingi* o sequenciamento do gene mitocondrial ND4. Considerando que há meses onde os números de mosquito foram baixos, quando não encontrados, estabeleceu-se os seguintes números de amostras para o sequenciamento, apenas do km 30:

- Todos os *An. darlingi* do Intra-domicílio, nos meses de Julho, Setembro e Novembro, totalizando 22 amostras;
- 32 *An. darlingi* do Intra-domicílio, mês de Fevereiro;
- 32 *An. darlingi* do Peri-domicílio, mês de Julho;
- Todos os *An. darlingi* do Peri-domicílio, mês de Setembro totalizando 15 amostras;
- 32 *An. darlingi* do Peri-domicílio, mês de Novembro;
- 32 *An. darlingi* Peri-domicílio, mês de Fevereiro.

Porém, o número final de sequências viáveis para a análise foram: 23 do Peri e 8 do Intra do mês de Julho, 12 do Peri do mês Setembro, 31 do Peri e 4 do Intra do mês de Novembro e 11 do

Peri e 21 do Intra do mês de Fevereiro, totalizando 110 amostras. Estes números foram considerados suficientes para o objetivo da tese: análises dos mosquitos coletados entre o peri e o intra-domicílio e entre os quatro meses do estudo. Não foi estabelecido o sequenciamento, pelo menos para os resultados finais deste trabalho, de mosquitos capturados no extra-domicílio, do km 24 e das outras espécies de *Anopheles* sp. capturadas. Porém já há projetos com esses grupos amostrais para futuras análises e publicações.

#### 3.4.2-Preparação do DNA

Primeiro, a extração foi realizada com a resina Chelex (BioRad), de acordo com as recomendações do fabricante, com modificações: para cada microtubo com um único mosquito, colocou-se 300 uL da solução de Chelex 5%. Foi realizado maceração completa do indivíduo, agitação em vortex por 10 segundos e centrifugação com velocidade de 13.000 rpm, por 20 s. Incubou-se a 80°C, por 30 min em banho-seco (Eppendorf). Após esse período, novamente agitação em vortex por 10 s e centrifugação com velocidade de 13.000 rpm, por 20 s. O sobrenadante da solução final contém o DNA, sendo descartado o precipitado. O DNA obtido foi ainda quantificado por espectrofotometria ND-1000 (Nanodrop) para verificação da quantidade de DNA na solução e a sua pureza.

#### 3.4.3-Reação de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase)

A reação de PCR foi montada a partir do DNA extraído de cada mosquito, segundo protocolo de Gorrochotegui-Escalante (2000), com modificações. As reações de amplificação foram montadas com volume final de 40 uL utilizando: 20 uL de Gotaq Colorless Master Mix (Promega), 12 uL de água de injeção ultra-pura (Aster) para 2uL de DNA e 3 uL dos oligonucleotídeos específicos para um fragmento do gene mitocondrial ND4 denominados: ND4R (5'-TTCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT-3') e ND4F (5'-TGATTGCCTAAGGCTCATGT-3'). A região específica do gene ND4 que foi amplificada encontra-se entre os nucleotídeos 681 a 966, equivalente aos códons 227-322 do respectivo mRNA. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador da Whatman Biometra (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 3 ciclos de 94°C por 2 min, 37°C por 2 min, 72°C por 1 min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s, 72°C por 1 min, com um ciclo de extensão final de 72°C por 5 min. Após a amplificação as amostras foram mantidas em temperatura de 4°C. Após a reação, uma parcela (doze amostras) foram corridas em gel de agarose 1%, utilizando 4 uL da solução com

2 uL de tampão de amostra (azul de bromofenol). A visualização das bandas foi feita em um transluminador UVDI (Major Science).

#### 3.4.4-Purificação dos produtos de PCR

A purificação do produto de PCR foi realizada em pequenas colunas com filtros Montage PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore). O protocolo utilizado foi o indicado pela empresa, com modificações: adicionou-se o volume da PCR a 400 uL de água ultra-pura à coluna encaixada a um microtubo de 1,5 mL, centrifugando-o a 1.000 x G por 15 min. O filtrado presente no microtubo foi descartado. Adiciona-se 20 uL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) na superfície do filtro da coluna, anexando-a invertida a um novo microtubo. Após a centrifugação a 1.000 x g por 2 min, o produto final foi o DNA purificado, pronto para uso.

#### 3.4.5-Quantificação dos produtos de PCR purificados.

Uma parcela (14 amostras) dos produtos de PCR purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando 4 uL da solução com 2 uL de tampão de amostra (azul de bromofenol). Para a quantificação do DNA utilizou-se 4 uL de Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), com 2uL de tampão de amostra seguindo as recomendação do fabricante. A visualização das bandas e a verificação de possíveis resíduos de primers foram feitas em um transluminador UVDI (Major Science).

#### 3.4.6-Reação de sequenciamento dos genes mitocondriais

A reação de sequenciamento dos genes foi realizada conforme recomendação do fabricante, utilizando-se 4 uL de DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare), 3 uL de oligonucleotídeo específicos do gene ND4, fita *foward*, na concentração de 1 pmol/uL e 5 uL do PCR purificado. Apenas a fita *foward* foi sequenciada, pois foi considerado suficiente para a obtenção das análises e dados desejados.

As reações de sequenciamento foram realizadas no termociclador Whathman Biometra (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 24 ciclos de 95°C por 20 seg, 50°C por 15 seg e 60° por 1 min.

### 3.4.7-Precipitação

A cada reação de sequenciamento foram adicionados 80 uL de isopropanol 65%, incubando-a em temperatura ambiente (T.A.) por 20 min., em meio sem iluminação. Em seguida, foram centrifugadas 30 min, a 2.000 x g a T.A.. O isopropanol foi removido através de aspiração, e em seguida, foram adicionados 200 uL de etanol 60%, seguido de nova centrifugação a 5 min e a 2.000 x G. Novamente, todo o etanol foi removido por aspiração, para que nenhum resíduo resultasse em manchas fluorescentes. As amostras foram secas a temperatura ambiente e o produto foi eluído em 2 uL em Formamida Loading Dye (GE Healthcarre).

### 3.5.8.Sequenciamento

Inicialmente foram efetuadas tentativas de sequenciamento no Sequenciador modelo 377 (AB Prism) presente no departamento de Parasitologia. Porém, apesar do sucesso com uma primeira parcela das amostras, o processo não se mostrou eficiente, seguido de constantes falhas na reação e no procedimento.

Devido a estes problemas, as amostras contendo os produtos de PCR purificados foram enviadas à empresa Macrogen Inc. (Coréia do Sul), juntamente com o oligonucleotídeo iniciador ND4-F. Os resultados foram analisados visualmente quanto a eficiência da reação de sequenciamento. Um fragmento de 286 pares de bases foi utilizado para a comparação das sequências e posteriores análises. Os índices de diversidade genética e as comparações entre as sequencias foram realizadas através do programa Arlequin ver 3.1. O diagrama de haplótipos foi construído pelo programa TCS e a árvore de haplótipos foi construída pelo método de Neighbour joint, utilizando o parâmetro de Kimura (Kimura 2-p) através do programa MEGA ver 4.0.

## 4.Resultados

A parte de campo teve início em de abril de 2008, com a viagem para Acrelândia e o reconhecimento da área de estudo. Realizaram-se no total quatro coletas entre junho de 2008 e fevereiro de 2009 nos seguintes meses: julho, setembro e novembro de 2008 e fevereiro de 2009.

A definição das regiões intra, peri e extra-domicílio foram realizadas durante o reconhecimento da área de estudo, sendo mantidas fixas durante os quatro meses da captura, em ambos o sítios de coleta. As mesma foram demarcadas com GPS: no km 24, os pontos intra (422 ft; S09°44,553'; WO67°07,212'), peri (455ft;S09°44,542'; WO67°07,212') e o extra (432ft; S09°44,583'; WO67°07,367') e no km 30 os pontos intra (414 ft; S09°41,218'; WO67°07,712), peri (421 ft; S 09°41,247';WO67°07,692) e o extra (431 ft; S09°41,259'; WO67°07,685').

### 4.1.- Diversidade e quantidade de *Anopheles* spp.

Somando as capturas de três e a de doze horas dos quatro meses do estudo, foram obtidos um total de 2.343 mosquitos, sendo que o mês de fevereiro apresentou a maior quantidade de espécimes: 1.695 (72,4% do total de mosquitos coletados), seguidos de julho (19,4%), novembro (5,9%) e setembro (2,3%).

Em relação as coletas de três horas, houve significativa diferença na diversidade e quantidade de anofelinos capturados, conforme o sítio de coleta analisado. No km 24, a maior quantidade de capturas foi do *An. deaneorum*, devido ao mês de fevereiro, seguido do *An. darlingi*, *An. rangeli*, *An. albitarsis* e o *An. triannulatus* (Tabela 3). Já no km 30, o *An. darlingi* foi o mosquito mais frequente, seguido do *An. deaneorum*, *An. rangeli*, *An. albitarsis*, *An. braziliensis*, *An. triannulatus* e o *An. argyritarsis*. (Tabela 4), apesar de o mês de setembro apresentar a população de *An. deaneorum* maior do que a de *An. darlingi*.

**Tabela 3.**

Quantidade de *Anopheles* coletados nas capturas de três horas no km 24, nos quatro meses que compõem o estudo.

	<b>Jul/08</b>	<b>Set/08</b>	<b>Nov/08</b>	<b>Fev/09</b>	<b>Total</b>
<i>An. darlingi</i>	6	10	1	11	28
<i>An. deaneorum</i>	4	2	1	30	37
<i>An. rangeli</i>	-	1	1	-	2
<i>An. albitarsis</i>	-	-	1	-	1
<i>An. triannulatus</i>	-	1	-	-	1

**Tabela 4.**

Quantidade de *Anopheles* coletados nas capturas de três horas no km 30, nos quatro meses que compõem o estudo.

	<b>Jul/08</b>	<b>Set/08</b>	<b>Nov/08</b>	<b>Fev/09</b>	<b>Total</b>
<i>An. darlingi</i>	248	7	47	531	833
<i>An. deaneorum</i>	32	23	5	255	315
<i>An. rangeli</i>	6	-	6	15	27
<i>An. albitarsis</i>	3	-	-	9	12
<i>An. braziliensis</i>	3	-	-	1	4
<i>An. triannulatus</i>	1	-	-	-	1
<i>An. argyritarsis</i>	-	1	-	-	1

#### 4.2-Distribuição do *An. darlingi*.

As capturas de três horas demonstraram significativas diferenças entre ambos os sítios. O km 24 apresentou um número amostral baixo, sendo relevante o peri-domicílio dos meses de Julho e Setembro (Tabela 5). Fevereiro, época de intensa precipitação, mostrou-se indiferente no km 24, apenas destacando o extra-domicílio, com seis espécimes encontrados.

No km 30, os primeiros horários (18:00-19:00) dos três diferentes locais da coleta (intra, peri e extra-domicílio) apresentaram o menor número, seguindo de um considerável aumento no horário seguinte (19:00-20:00), nos meses de julho, novembro e fevereiro.

Também verificou-se, em ambos os sítios, que o local com maior quantidade de *An. darlingi* foi no peri-domicílio, exceção ao mês de fevereiro de 2009, no km 24 (Tabela 7 e 8). O km 24 mostrou um pequeno número amostral de anofelinos coletados, mesmo em fevereiro que, dentre os quatro meses estudados, é relacionado com estações de alta precipitação e, também, onde mostrou-se no km 30 uma elevada quantidade de mosquitos.

A Tabela 7 demonstra, no km 24, que o extra-domicílio apresentou, em três dos quatro meses do estudo (julho e setembro de 2008 e fevereiro de 2009), uma maior quantidade de mosquitos do que o intra-domicílio, apesar do número de amostras deste sítio de coleta não ter sido significativo.

Já no km 30, nos meses de novembro e fevereiro, as regiões intra apresentaram maior número de *An. darlingi* do que o extra-domicílio, exceção para o mês de julho, onde o extra foi superior em relação ao intra-domicílio (Tabela 8). Também no km 30, o mês de setembro não apresentou mosquitos nas regiões intra e extra-domicílio, apenas no peri-domicílio.

**Tabela 5.**

Número de *An. darlingi*, discriminado nos três horários que compõe o intra, o peri e o extra-domicílio nas capturas de 3h no km 24.

	Intra-domicílio			Peri-domicílio			Extra-domicílio		
	I1	I2	I3	P1	P2	P3	E1	E2	E3
<b>Jul/08</b>	0	0	0	0	3	2	0	0	1
<b>Set/08</b>	0	0	0	0	2	3	2	0	0
<b>Nov/08</b>	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<b>Fev/09</b>	0	1	1	1	1	1	0	4	2

**Tabela 6.**

Número de *An. darlingi*, discriminado nos três horários que compõe o intra, o peri e o extra-domicílio nas nas capturas de 3h no km 30.

	Intra-domicílio			Peri-domicílio			Extra-domicílio		
	I1	I2	I3	P1	P2	P3	E1	E2	E3
<b>Jul/08</b>	0	1	1	8	46	91	7	33	61
<b>Set/08</b>	0	0	0	0	3	4	0	0	0
<b>Nov/08</b>	0	3	5	0	14	23	0	1	1
<b>Fev/09</b>	2	45	48	2	76	321	0	14	23

**Tabela 7.** *An. darlingi*, captura de três horas (km 24), na relação mosquito/hora/capturador

	Intra	Peri	Extra
<b>Jul/08</b>	0.0	1.7	0.3
<b>Set/08</b>	0.0	1.7	0.7
<b>Nov/08</b>	0.3	0.3	0.0
<b>Fev/09</b>	0.7	1.0	2.0

**Tabela 8.** *An. darlingi*, captura de três horas (km 30), relação mosquito/hora/capturador.

	Intra	Peri	Extra
<b>Jul/08</b>	0.7	48.3	33.7
<b>Set/08</b>	0.0	2.3	0.0
<b>Nov/08</b>	2.7	12.3	0.7
<b>Fev/09</b>	31.7	133.0	12.3

#### 4.3- Hábitos de picadas do *An. darlingi*.

As capturas de doze horas foram realizadas apenas no km 30. No total, foram coletados 1.497 *An. darlingi* nos quatro meses, sendo que 76% deste total foi capturado no peri-domicílio.

Fevereiro mostrou-se o mês com maior quantidade de mosquitos, tanto no peri quanto no intra-domicílio (Tabelas 9 e 10): a porcentagem da quantidade total de *An. darlingi* na região peri-domicílio foi de 81,5% em fevereiro, 11,4% em julho, 6,4% em novembro e 0,7% em setembro. No intra-domicílio, seguiu-se de forma semelhante, com fevereiro (96,7%), julho (2,4%), novembro (0,6%) e setembro (0,3%).

As figuras 8 e 9 demonstram os horários onde existiram picos de atividade do *An. darlingi*. Devido ao baixo número de mosquitos capturados nas épocas de estiagem, estes gráficos dão ênfase para a coleta de fevereiro, sendo assim necessário acompanhar também nas Tabelas 9 e 10 para verificar os picos dos outros meses da coleta.

Na região de intra-domicílio, os meses de setembro e novembro apresentaram, respectivamente, um e dois mosquitos coletados, no intervalo entre 19:00 e 22:00. O mês de julho permaneceu proporcionalmente constante na primeira metade da captura (entre 18:00 e 23:00), sem atividade hematofágica pelo resto da noite. Já a coleta de fevereiro, como demonstrado na figura 8, apresentou três evidenciáveis picos: o primeiro entre 19:00 e 21:00, o segundo, também o maior, entre 22:00 e 23:00 e o último entre 01:00 e 02:00, logo reduzindo a quantidade de anofelinos.

No peri-domicílio, onde em todos os meses houve uma quantidade de mosquitos coletados maior do que na região intra, verificou-se no mês de fevereiro um grande pico de *An. darlingi* entre 20:00 e 21:00, que corresponde a 34,6% de toda a noite de captura de doze horas para o local. No mês de julho podemos destacar o segundo horário (entre 19:00 e 20:00), porém com uma nova elevação entre 22:00 e 23:00. O mês de novembro, o destaque é entre 20:00 e 23:00 e em setembro, sete mosquitos foram capturados entre 19:00 e 22:00, considerando assim este intervalo como o pico da atividade hematofágica deste mês.

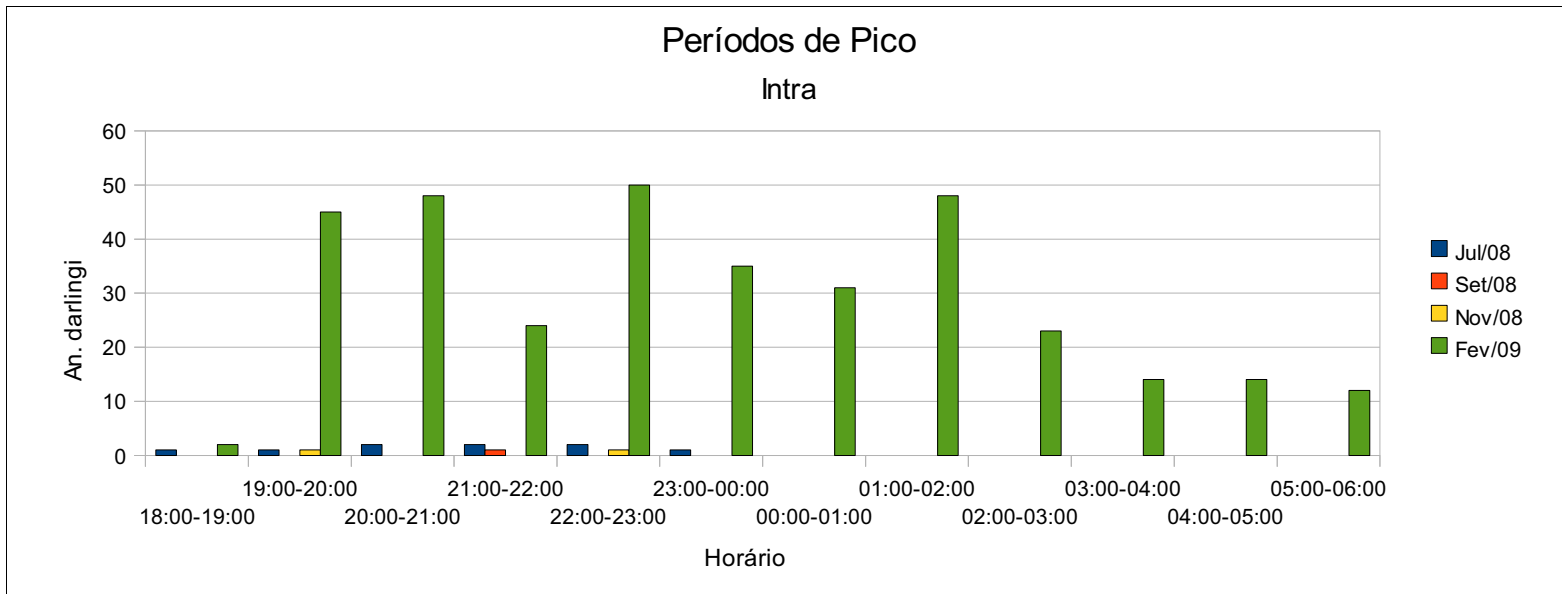
Houve ainda diferenças verificadas entre as regiões intra e peri-domicílio: a Tabela 11 indicou que nos quatro meses do estudo, todas as capturas na região peri apresentaram maior número *An. darlingi*, quando comparadas com a intra-domicílio.

**Tabela 9.** Quantidade de *An. darlingi* coletados na captura de 12 horas no intra-domicílio.

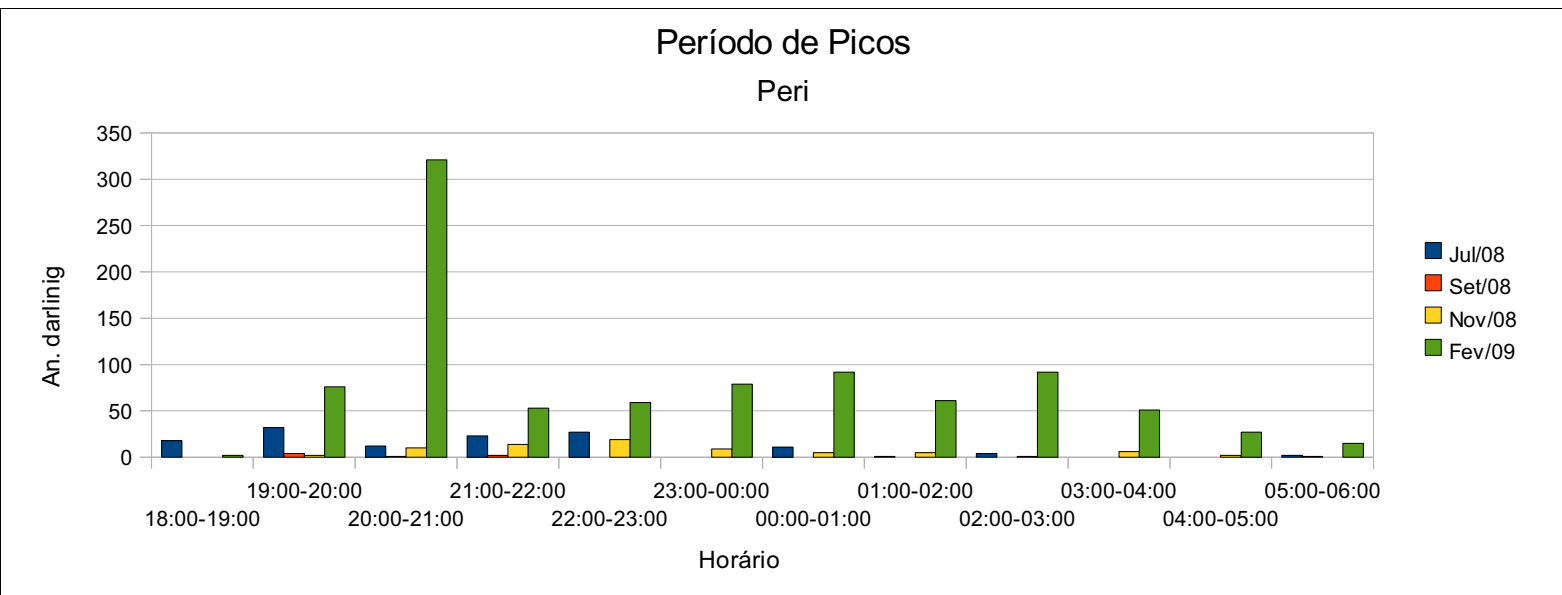
	<b>Jul/08</b>	<b>Set/08</b>	<b>Nov/08</b>	<b>Fev/09</b>
<b>18:00-19:00</b>	1	0	0	2
<b>19:00-20:00</b>	1	0	1	45
<b>20:00-21:00</b>	2	0	0	48
<b>21:00-22:00</b>	2	1	0	24
<b>22:00-23:00</b>	2	0	1	50
<b>23:00-00:00</b>	1	0	0	35
<b>00:00-01:00</b>	0	0	0	31
<b>01:00-02:00</b>	0	0	0	48
<b>02:00-03:00</b>	0	0	0	23
<b>03:00-04:00</b>	0	0	0	14
<b>04:00-05:00</b>	0	0	0	14
<b>05:00-06:00</b>	0	0	0	12

**Tabela 10.** Quantidade de *An. darlingi* coletados na captura de 12 horas no peri-domicílio.

	<b>Jul/08</b>	<b>Set/08</b>	<b>Nov/08</b>	<b>Fev/09</b>
<b>18:00-19:00</b>	18	0	0	2
<b>19:00-20:00</b>	32	4	2	76
<b>20:00-21:00</b>	12	1	10	321
<b>21:00-22:00</b>	23	2	14	53
<b>22:00-23:00</b>	27	0	19	59
<b>23:00-00:00</b>	0	0	9	79
<b>00:00-01:00</b>	11	0	5	92
<b>01:00-02:00</b>	1	0	5	61
<b>02:00-03:00</b>	4	0	1	92
<b>03:00-04:00</b>	0	0	6	51
<b>04:00-05:00</b>	0	0	2	27
<b>05:00-06:00</b>	2	1	0	15



**FIGURA 8.** Densidade anofélica durante o período noturno no intra-domicílio.



**FIGURA 9.** Densidade anofélica durante o período noturno no peri-domicílio.

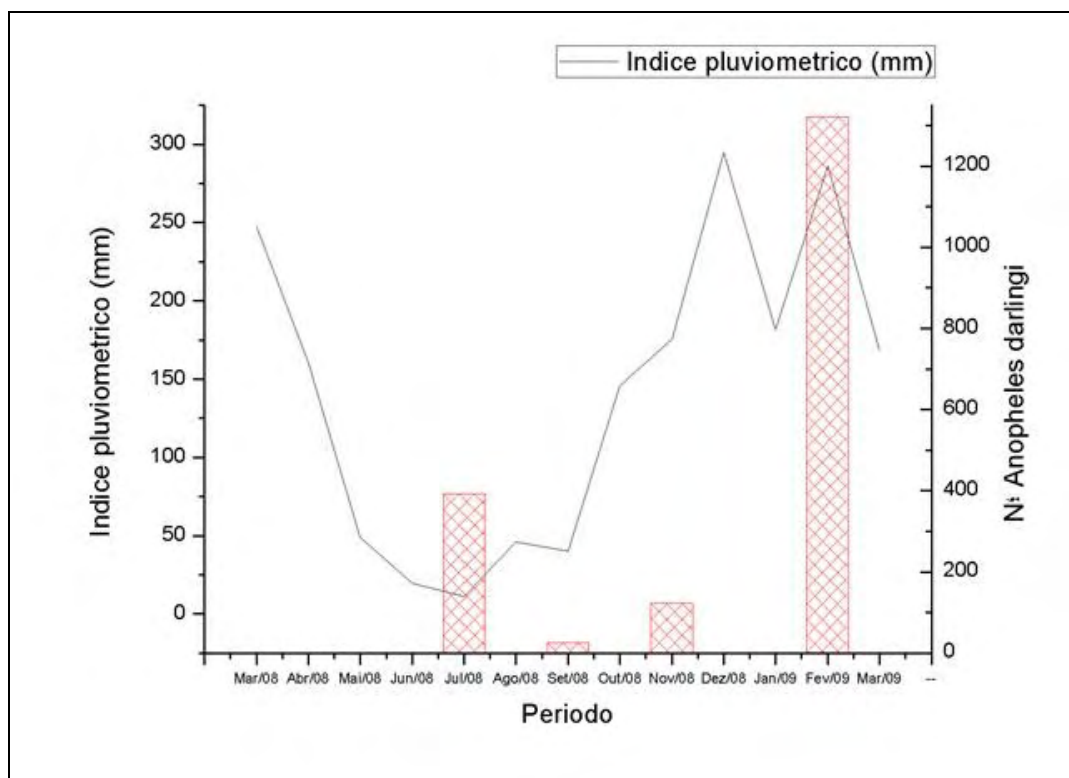
**Tabela 11.** Comparação entre as regiões intra e peri-domicílio, nas capturas de 12h. Valores em porcentagem de mosquitos *An darlingis* capturados.

	<b>Intra (%)</b>	<b>Peri (%)</b>
<b>Jul/08</b>	6.5%	93.5%
<b>Set/08</b>	11.0%	89.0%
<b>Nov/08</b>	2.7%	97.3%
<b>Fev/09</b>	27.2%	72.8%

#### 4.4- Relação com as chuvas

Os dados de pluviometria apresentados aqui correspondem a capital Rio Branco, pois os aparelhos de pluviômetria de Acrelândia e de Plácido de Castro se encontravam inoperantes, desde antes do início deste estudo. Apesar da distância de 122 km de Rio Branco até Acrelândia, é possível relacionar o nível mensal de pluviometria da capital com o número de *An. darlingi* da área de estudo.

Os dados pluviométricos foram obtidos com Carlos Cordeiro, do INPE de Rio Branco. O gráfico mostra o tamanho da população de *An. darlingi* variando de acordo com os períodos de chuvas (Fig. 10). O mês de julho apresenta uma densidade alta, reflexo das precipitações do começo do ano. Setembro a população anofelínica apresenta-se reduzida, época onde os criadouros já se encontram com capacidade limite, devido a estiagem do meio do ano. Com a transição da época seca para as chuvas, novamente volta a subir em novembro, apresentando o seu ápice em fevereiro.

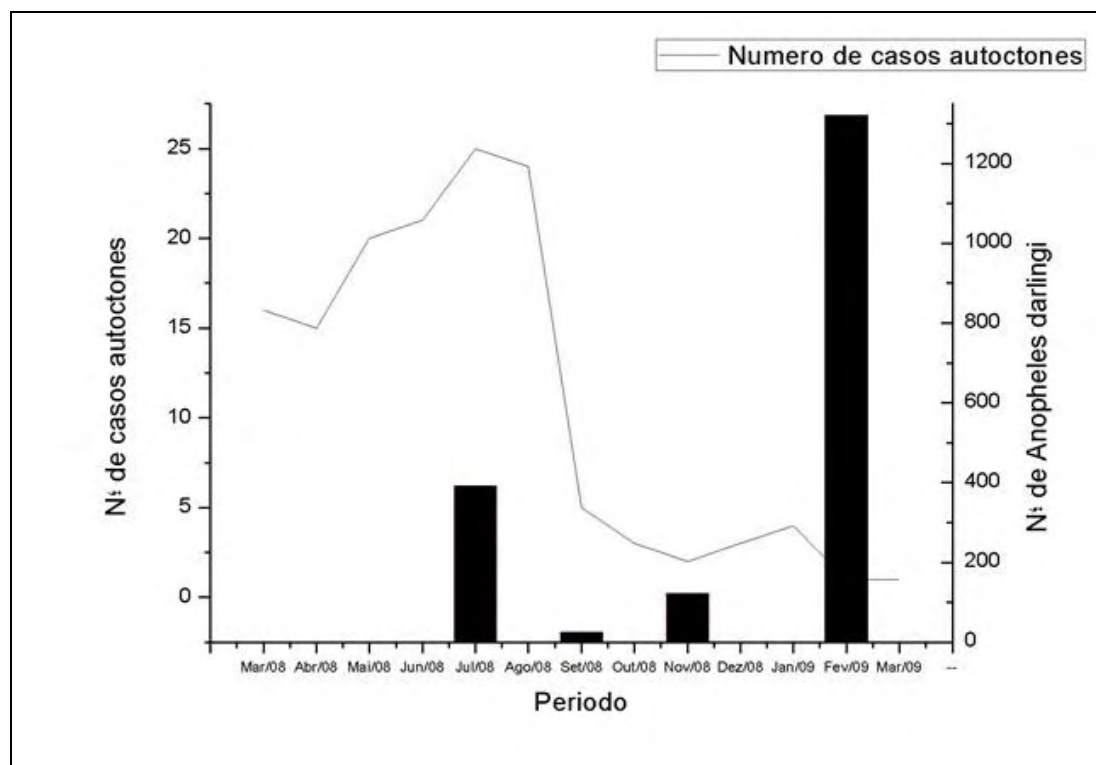


**FIGURA 10.** Relação entre a densidade de *An. darlingi* e a pluviosidade. As barras representam o número de anofelinos capturados nas 4 coletas. A linha representa o índice pluviométrico mensal.

#### 4.5-Relação com casos de malária

Os números obtidos da malária de Acrelândia não estão discriminados por glebas ou ramais, logo os dados da doença apresentados refletem os números de notificações autóctones em todo o município.

Este dado foi obtido com o consultor técnico da Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da Malária Oscar M. Mesones Lapouble. Analisando a Figura 11 pode-se verificar que os casos da doença não foram proporcionais a elevada densidade de mosquitos no período do estudo: o mês de maior incidência de malária correspondeu a coleta de julho. Logo após este pico, o número de casos diminuiu constantemente, acompanhando proporcionalmente o de mosquitos. Entretanto mesmo com o retorno dos meses de chuvas, no início de 2009, e com a alta do *An. darlingi*, os casos de malária mantiveram-se baixos.



**FIGURA 11** Comparação entre a densidade anofélica e os casos autóctones de malária. As barras representam o número de anofelinos capturados nas 4 coletas. A linha representa o número de casos de malária autóctone mensal.

#### 4.6-Sequenciamento do gene ND4.

Primeiramente, a extração com a resina Chelex, a reação de PCR e a purificação com o kit de purificação Milipore se mostraram eficientes. Foram utilizadas 12 amostras para a verificação das reações de PCR, corridas em gel de agarose 1% (fig. 12). A banda visualizada mostrou-se entre 300 e 400 pares de base.

**Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os produtos de PCR de parte do gene ND4 de *Anopheles darlingi*. Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a eletroforese, o DNA foi visualizado com brometo de etídeo e iluminação UV. (1: intra de julho; 2: peri de julho; 3: intra de setembro; 4: peri de setembro; 5 e 6: intra de novembro; 7: controle negativo; 8: Gene Ruler DNA Ladder (Fermentas) - 1000 b.p.; 9 e 10: peri de novembro; 11 e 12: intra de fevereiro; 13 e 14: peri de fevereiro; 15: controle negativo; 16: Gene Ruler DNA Ladder (Fermentas) - 1000 b.p.)

O amplificado do gene ND4 corresponde aos nucleotídeos 8.519-8.880 no genoma mitocondrial da espécie *A. albopictus* (GenBank n. AY072044), e já foi utilizado em outras publicações do nosso grupo de pesquisa (Angella et al., 2007; Paduan and Ribolla, 2008). Das 165 amostras enviadas para sequenciamento, 110 mostram-se viáveis para análises: 3 do Peri e 8 do intra de Julho, 12 do peri de Setembro, 31 do peri e 4 do intra do Novembro e 11 do peri e 21 do intra de Fevereiro. O alinhamento destas sequências mostraram a presença de 20 sítios polimórficos e, das análises dos fragmentos obtivemos 18 diferentes haplótipos, com uma Diversidade Haplótipica (Hd) de 0,895 e Diversidade Nucleotídica (Pi) de 0,0127. Foi verificado um total de 20 mutações, sendo 16 mutações sinônimas e 4 não sinônimas. A Tabela 12 esta apresentada e a sequência de o número de haplótipos encontrados. A análise das sequências obtidas (Fig. 13) demonstrou a ocorrência de dois grandes grupos, separados por 2 passos mutacionais. No primeiro grupo estão os haplótipos de 1 a 10, e no segundo, haplótipos de 11 a 18.

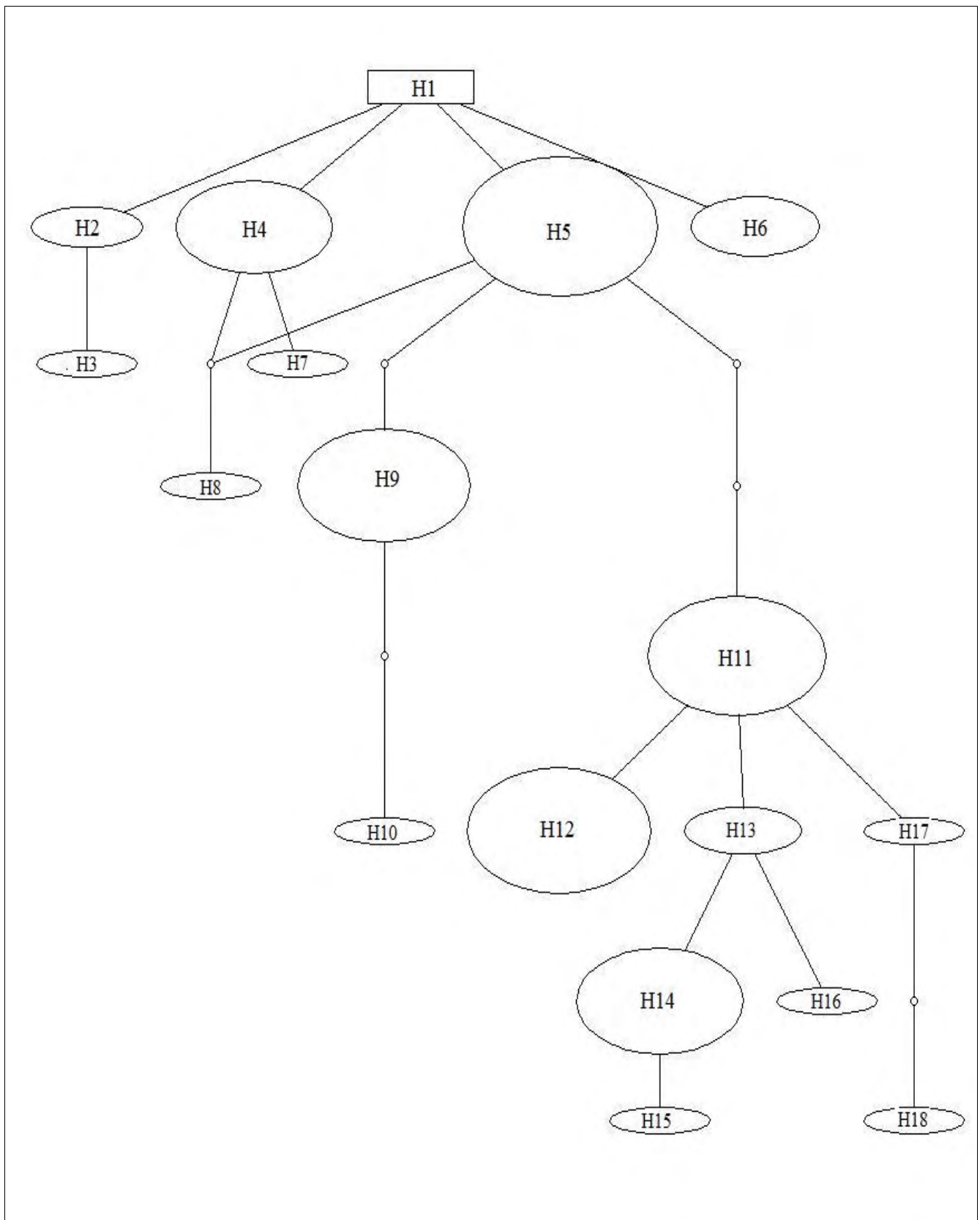
Não foi encontrada diferença significativa entre os mosquitos capturados na região intra e no peri-domicílio ( $P=0,265$ ), indicando baixa diferenciação entre ambos os grupos através da metodologia utilizada.

A Tabela 13 mostra todos os mosquitos sequenciados utilizados neste estudo, em relação a localidade onde o espécime foi encontrado e o respectivo haplótipo obtido. O mês de maior número de espécimes *An. darlingi* analisados foi fevereiro com 35 amostras, seguidas de novembro (33), junho (30) e setembro (12). Nos quatro meses obtivemos um número maior de amostras sequenciadas no peri-domicílio, exceção para fevereiro, onde tem-se 24 amostras sequenciadas no intra e 11 no peri-domicílio. Não obtivemos amostrada sequenciada no intra-domicílio de setembro.

A Tabela 14 agrega a variação temporal dos haplótipos com o número de amostras sequenciadas. Encontra-se diferença entre a frequência haplotípica dos quatro meses: cinco haplótipos exclusivos de Novembro (H3, H8, H16, H17 e H18) não são encontrados na coleta seguinte, fevereiro, mês onde verificou-se a maior densidade de *An. darlingi*. Os haplótipos que apresentaram os maiores números de amostras (H4, H5, H9, H11 e H12) estão representados em todos os meses da coleta, com exceção do H6 que apresentou apenas 6 amostras ao longo dos quatro meses. Setembro, mês com menor densidade e menor número de amostras sequenciadas, apresentou 7 haplótipos, sendo apenas um exclusivo. Porém, cinco destes mantiveram-se na população até fevereiro, indicando permanência dos indivíduos mesmo em épocas de seca e de baixa densidade. O H1, representado por duas amostras, foi encontrado em julho e novembro, e provavelmente manteve-se na população, mesmo não sendo encontrado nos meses de setembro e novembro. O H14 também possui semelhante intervalo, porém apenas no mês de setembro.

**Tabela 12:** Relação de haplótipos encontrados. ALB: *A. albopictus*-GenBank n. AY072044. Qtd: número de amostras de cada haplótipo. As posições dos sítios correspondem aos produto de PCR sequenciado.

	1	2	3	7	8	1	2	3	1111	1	2	2	22	222	qtd
ALB															
HAP1															2
HAP2															3
HAP3															1
HAP4															11
HAP5															18
HAP6															6
HAP7															1
HAP8															1
HAP9															14
HAP10															1
HAP11															15
HAP12															16
HAP13															4
HAP14															13
HAP15															1
HAP16															1
HAP17															1
HAP18															1



**FIGURA 13.** Mapa de haplótipos das seqüências parciais do gene ND4 de *Anopheles darlingi*. Cada haplótipo está representado por uma figura oval que possui tamanho proporcional ao número de indivíduos que ela representa. As linhas ligando os conjuntos representam passos mutacionais. Os pequenos círculos representam haplótipos hipotéticos não encontrados no presente estudo.

**Tabela 13:** Amostras sequenciadas utilizadas, em relação a localidade e o haplótipo obtido.

Haplótipos	Junho		Setembro		Novembro		Fevereiro		Total amostras
	Intra	Peri	Intra	Peri	Intra	Peri	Intra	Peri	
H1	.	1	.	.	.	.	1	.	2
H2	.	.	.	.	.	.	2	1	3
H3	.	.	.	.	.	1	.	.	1
H4	2	3	.	1	.	5	.	.	11
H5	.	3	.	3	2	7	2	1	18
H6	.	1	.	1	1	2	1	.	6
H7	.	.	.	.	.	.	.	1	1
H8	.	.	.	.	.	1	.	.	1
H9	1	3	.	1	.	4	3	2	14
H10	.	1	.	.	.	.	.	.	1
H11	4	1	.	2	.	3	5	.	15
H12	.	4	.	3	.	1	2	6	16
H13	.	.	.	1	.	.	3	.	4
H14	.	5	.	.	2	4	2	.	13
H15	.	1	.	.	.	.	.	.	1
H16	.	.	.	.	.	.	1	.	1
H17	.	.	.	.	.	.	1	.	1
H18	.	.	.	.	.	.	1	.	1
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>23</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>28</b>	<b>24</b>	<b>11</b>	<b>110</b>

**Tabela 14.** Variação temporal de haplótipos encontrados nos quatro meses do estudo. A linha significa que o alelo manteve-se na população do respectivo mês. n Amostras: número de *An. darlingi* que compõem o respectivo haplótipo.

Haplótipo	JUL/08	SET/08	NOV/08	FEV/09	n Amostras
H1	•			•	2
H2				•	3
H3			•		1
H4	•	•	•		11
H5	•	•	•	•	18
H6	•	•	•	•	6
H7				•	1
H8			•		1
H9	•	•	•	•	14
H10	•				1
H11	•	•	•	•	15
H12	•	•	•	•	16
H13		•			4
H14	•		•	•	13
H15	•				1
H16			•		1
H17			•		1
H18			•		1
Haplótipos Exclúsivos	1	1	5	2	

## 5-Discussão

A princípio, os resultados aqui apresentados demonstram que há importante interação entre o principal mosquito transmissor da malária com as mudanças antropológicas ocorridas no assentamento estudado, pois a região encontra-se consideravelmente degradada pela agropecuária, tendência que podemos encontrar em diversas outras áreas da Amazônia Legal (DEGRAD, INPE 2009).

Uma das utilidades quando se analisa dinâmica de populações de vetores e seus respectivos componetes (abundância, distribuição, hábitos, variação tempo/espaço) é a possibilidade de se aplicar o modelo obtido em outras áreas de estudo onde o vetor é endêmico (Gil et al., 2003). Há ainda no Brasil diversas áreas de loteamentos e assentamentos semelhante ao Ramal do Granada: invasões de posseiros, sem-terras e grandes latifúndios nas regiões da floresta Amazônica (Lima & Pozzobon, 2005).

O *An. darlingi* foi o mosquito mais encontrado em todos os meses de coleta, dentro e fora das residências, com destaque para o número elevado na peri-domicílio. A excessão foi observada no mês de fevereiro, na captura de três horas realizada no extra-domicílio no km 24 onde *An. deaneorum* foi a espécie predominante. O extra-domicílio é o ponto mais afastado da residência e, assim como no km 30, foram realizadas dentro do pasto, local comum para o gado e diversos animais silvestres nas matas próximas.

Consoli & Oliveira (1998) descreveram o *An. deaneorum* com hábito zoofílico, porém, em períodos de alta densidade este torna-se o vetor secundário da doença, sendo que normalmente é encontrado nas mesmas regiões onde há o *An. darlingi*. Logo, em épocas de elevada densidade o *An. deaneorum* pode ter participação na epidemiologia da doença no local (Marreli et al., 1998) Na verdade, o excesso de pastagem foi encontrado em ambos os sítios de coleta e, ao longo de todo o Ramal, pois foi constante verificar o número elevado de desmatamento que faz com que pastagens e atividades agropecuárias substituam as matas do bioma amazônico. Verificando o número total de mosquitos coletados, esta foi a segunda espécie mais encontrada, e apresentou também uma significativa participação no total de mosquitos coletados no km 30, em fevereiro, sítio e mês onde se apresentou o maior número de anofelinos de todo o período do estudo. Também é altamente sugerido a realização, com exemplares de *An. deaneorum*, de ensaios imunoenzimáticos e PCR, verificando assim a infectividade desta espécie.

A diversidade coletada e a quantidade de espécimes verificados mostrou que o km 30 foi o sítio de coleta onde se encontrou maior diversidade e abundância de espécies anofelínicas. A idéia original deste projeto, onde seriam realizadas coletas simultâneas em ambos os pontos, foi

modificada para a metodologia descrita: dois dias distintos para capturas de três horas. A escolha destes dois pontos no Ramal do Granada foi justificada pela semelhante forma de urbanização dos dois sítios e pelo diferente grau de ações de antropofização: número de habitações, residências e desmatamento. Logo, o procedimento de coleta utilizado neste trabalho não nos permitiu a realização de uma minuciosa comparação entre a população anofelínica das duas áreas, porém em todos os quatro meses das capturas houve vantagem numérica no sítio do km 30.

Pode-se concluir, quando observamos as quatro capturas de três horas, que diferenças entre ambos os sítios influenciaram de alguma maneira o desenvolvimento da população anofelínica local. A região do km 24 possui maior números de moradores e grau de degradação. A mata é necessária para a biologia dos anofelinos, logo, essa alteração pode estar ligada com a micro-ecologia da espécie em cada um dos sítios (Tadei et al., 1993; Guimarães et al., 2004).

Com estes resultados pode-se observar que em uma mesma linha (ramal) de assentamento tem-se diferentes densidades de vetores, influenciando assim na dinâmica de transmissão da doença. Este estudo pode ser um indicativo de onde os monitoramentos de casos e controle vetorial devem ser direcionados. Porém, é relevante lembrar da importância do contínuo monitoramento de zonas com potencial malarígeno, pois uma característica constante no controle de doenças no Brasil é a descontinuidade das aplicações dessas medidas após a satisfação com os resultados obtidos (Forattini, 2002).

Diferenças quanto aos diversos fatores ligados a urbanização de áreas de florestas podem influenciar na dinâmica de transmissão da malária. Castro e colaboradores (2005) relacionaram, em um assentamento rural localizado em Rondônia semelhante ao Ramal do Granada quanto a sua forma de ocupação e economia, o grau de urbanização, desmatamento e forma de exploração com a epidemiologia da doença no local. Através do estabelecimento de diversas variáveis ligadas a fatores antropológicos (ambientais e econômicos, sendo que este último associado aos hábitos dos moradores), verificou-se que as áreas de maior risco a transmissão são as que possuem: baixa qualidade de moradias; proximidade com manchas de floresta e reservas d'água; precariedade na exploração da terra (lavouras, áreas de pastagem), além da influência da migração constante e troca de residências, hábitos comuns no Granada. O mosquito principal da área estudada por Castro é o *An.darlingi*, que apresenta seus picos de densidade em épocas de transição entre as estações de chuvas e secas (Souza-Santos, 2002).

A distribuição do *An. darlingi* mostrou semelhança como em muitos outros locais da região norte onde a espécie é tida como principal vetor (Lourêncio-de-Oliveira et al. 1989; Santos et al. 2009). Apesar da espécie ter seus hábitos relacionados com modificações antrópicas, um maior número de mosquitos foi encontrado na área com maior presença de matas. O *An. darlingi* ainda

depende das regiões com florestas para se desenvolver, sendo que profundas modificações em seu habitat podem restringir sua presença em determinadas regiões (Yasuoka & Levins, 2007).

A atividade hematofágica apresentada nas capturas de doze horas revelou a tendência observada em diversos estudos de períodos de pico do *An. darlingi*: início da atividade hematofágica no horário crepuscular, persistindo até a primeira metade da noite (Moreno et al., 2007). As variações apresentadas entre as coletas mostraram relevância: setembro e novembro, no intra-domicílio, não apresentaram quantidades significativas de mosquitos, porém, mesmo com o baixo número de amostras, houve ocorrências entre 19:00 e 23:00. Os meses de julho, no intra, e de setembro, no peri-domicílio, apesar de também apresentarem números baixos, os intervalos de alta densidade foram semelhante em ambos, com o primeiro mantendo o pico entre 20:00 e 23:00 e, o segundo entre 19:00 e 22:00. O peri-domicílio de fevereiro apresentou um evidente pico entre 20:00 e 21:00, mas manteve constante a presença de mosquitos até o fim da noite, mostrando pequenas flutuações, devido ao alto número de anofelinos que a época registrou. Semelhante, o peri-domicílio de setembro teve seu pico mais duradouro, entre 20:00 e 00:00, apresentando atividade até o penúltimo horário, com uma elevação entre 03:00 e 04:00. O intra-domicílio de fevereiro apresentou três picos evidentes ao longo da respectiva captura: 19:00-21:00, 22:00-23:00 e 01:00-02:00, com presença do vetor até o fim das capturas.

Esses diferentes comportamentos observado nas capturas de doze horas mostraram que, apesar do *An. darlingi* apresentar sua atividade durante o crepúsculo, é comum haver outros picos fora do horário habitual, tornando-o assim mais eficaz na transmissão da malária, tanto dentro como fora das residências. O que pode explicar a presença de mais de um pico fora do horário crepuscular é a alta densidade da espécie durante as épocas de chuvas. Não foi verificado a presença de picos significativos fora do horário habitual (18:00-22:00) nas regiões intra-domicílio dos meses de julho, setembro e novembro assim como no peri-domicílio de setembro, meses que apresentaram baixa densidade de *An. darlingi*. Também nas coletas de doze horas foram observadas maior densidade do *An. darlingi* no peri-domicílio.

A sazonalidade da espécie na área de estudo pode estar ligado com os tipos de criadouros presentes na região. A densidade do *An. darlingi* de julho, mês que possui o menor índice pluviométrico, provavelmente está relacionada com o período de chuvas anterior, o que fez com que os criadouros dos ramais (rios, igarapés) mantivessem sua capacidade, mas não suficiente para manter elevadas densidades. O reflexo dessa diminuição acentuada dos níveis de chuvas mostraram que setembro apresentou valores mínimos para a densidade de mosquitos. Com o início das chuvas, houve um considerável aumento da densidade em novembro, seguindo de um grande crescimento em fevereiro: este mês, que apresentou 72,4% do total de mosquitos coletados durante o estudo, foi

fortemente influenciado com o período de chuvas iniciado em novembro.

Dados da coleta de maio de 2008, a primeira realizada, não foram utilizados nos resultados finais desta tese devido a diversos erros e diferenças nos procedimentos. Porém, utilizando o total de mosquitos coletados neste mês e equiparando através dos mesmos parâmetros das análises de junho, setembro, novembro e fevereiro, podemos agregar a informação na sazonalidade da espécie. Podemos admitir que em maio foram coletados aproximadamente 900 *An. darlingi*, mostrando uma elevada densidade de mosquitos no mês, porém menor do que o encontrado no mês de fevereiro, ápice das chuvas. Entre os meses de março e abril de 2008 o gráfico demonstram uma significativa queda no índice pluviométrico.

Como já citado na introdução, Gil e colaboradores (2003) demonstram que uma área isolada, mais conservada e com um baixo número de habitantes ribeirinhos apresenta uma densidade baixa de mosquitos durante as épocas secas, aumentando significativamente após dois meses do início das chuvas, enquanto uma outra área de coleta, caracterizada por elevada degradação ambiental e com alto número de habitantes, apresentou alta densidade no fim das estações chuvosas, mantendo-se alta mesmo após o término das precipitações. Pode-se associar o primeiro modelo com o que acontece com o Ramal do Granada: áreas pouco antropofizadas apresentam criadouros propícios ao crescimento da população no primeiro semestre, próximos a épocas de chuvas. Ao contrário, em regiões com alto grau de modificações, os criadouros passam a ser artificiais e os picos do *An. darlingi* são verificados no segundo semestre, na transição entre o fim das chuvas e épocas secas.

Um dos fatores importantes que influenciam na dinâmica de transmissão da malária é a densidade do vetor. No período do estudo, podemos verificar que o mês de maior incidência de malária corresponde a coleta de julho, sendo uma provável consequência da população elevada de anofelinos no início do ano. Logo após este pico, o número de casos diminui constantemente, acompanhando proporcionalmente com o de mosquitos. Entretanto, mesmo com o retorno dos meses de chuvas, no início de 2009, e com a alta do *An. darlingi*, os casos de malária mantiveram-se baixos. Verificando os meses posteriores ao período que o gráfico apresenta, entre abril e agosto de 2009, os valores são, respectivamente: 4, 6, 1, 5 e 7 casos de malária autóctone no município. Com o aumento da densidade do *An. darlingi* e a constante baixa nos números da malária, pode significar melhorias na eficiência do controle da doença na região.

Assim, pode-se obter sucesso no controle da doença, mesmo em meses de alta densidade anofelínica. Verificando o histórico de casos autóctones na cidade observamos que foi um fenômeno recente (Tabela 15). Os meses anteriores mostraram que o decréscimo pode estar ligado com alguma medida, pois no ano de 2007, o total de casos foi aproximadamente quatro vezes maior do que 2008, o início do estudo. Os meses que apresentaram maiores quantidades da malária se

concentraram entre os meses de março e julho, época de transição em que a população inicia declínio com o fim da precipitação. Provavelmente, a redução dos números da malária, faz com que os casos se concentrem em específicas regiões do município.

**Tabela 15.** Casos autóctones de malária de Acrelândia.

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<b>jan</b>	20	122	57	54	57	33	4
<b>fev</b>	24	77	47	30	81	32	1
<b>mar</b>	19	179	57	60	75	16	1
<b>abr</b>	24	156	42	90	78	15	4
<b>mai</b>	47	131	90	119	131	20	6
<b>jun</b>	80	145	118	127	51	21	1
<b>jul</b>	63	95	50	119	78	25	5
<b>ago</b>	27	69	33	72	48	24	7
<b>set</b>	25	33	24	56	40	5	
<b>out</b>	55	64	8	89	43	3	
<b>nov</b>	88	56	42	112	39	2	
<b>dez</b>	126	53	62	57	18	3	
<b>Total</b>	598	1180	630	985	739	199	29

Através das análises moleculares do sequenciamento do fragmento do gene ND4, foram identificadas 18 variantes de haplótipos para 110 amostras. Não foi verificada variabilidade significativa entre os mosquitos do peri e intra-domicílio, porém o esforço amostral foi relativamente pequeno para este dado. Forattini (1987) associou o comportamento exófilo e endófilo como uma provável característica de populações distintas. Especificamente, na área de estudo, é comum o uso de borrifação pela equipe da FUNASA/SESACRE como principal medida de controle: realiza-se periodicamente e pontualmente, quando é identificado um caso positivo (o que eles chamam de bloqueio), a aplicação de inseticidas nas residências do enfermo, isolando-o de possíveis vetores dentro da casa e diminuindo assim o risco de transmissão. O constante uso da borrifação dentro das moradias pode ter selecionado mosquitos que não entram nas residências para se alimentar e repousar após o repasto sanguíneo, apesar de haver significativa atividade hematofágica na região intra-domiciliar, em épocas de chuvas. Pesquisas utilizando outros marcadores moleculares são altamente sugeridas para se entender esse comportamento (Mirabello et al., 2008).

Os haplótipos obtidos com as amostras de *An.darlingi* sequenciadas mostraram uma alta variabilidade. Esses dados nos permitem relacionar a presença de cada representante do haplótipo com o respectivo mês onde este foi localizado. A população do mês de novembro apresenta maior diversidade dentre as quatro que compõem o estudo. Os haplótipos que podem ser considerados constantes nos quatro meses de coleta foram: H1, H4, H5, H6, H7, H9, H11, H12 e o H14. Pode-se afirmar que os representantes desses haplótipos mantiveram-se durante todos o período do estudo. Dos haplótipos exclusivos encontrados, apenas o H2 e H13 pertencem a mais de uma amostra. Os outros foram encontrados apenas uma única amostra, mostrando-se necessário aumentar o número amostral desses mosquitos para verificar se tais dados são significativos.

Novembro, época do início das chuvas, apresenta cinco haplótipos exclusivos. Como os mesmos não foram encontrados nos meses anteriores isso, pode significar a inserção de novas variações durante meses de baixa densidade, preenchendo assim nichos não ocupados por mosquitos já presentes na região. Com o aumento da capacidade dos criadouros pelas épocas de chuva, poderia se esperar um continuidade desses haplótipos, porém isso não é verificado.

Apesar de uma grande diferença da densidade de novembro para fevereiro, a população se manteve fixa. Se essa possível inserção de novos haplótipos durante a transição entre épocas secas e úmidas fosse confirmada, seria um importante dado na epidemiologia da malária local. Porém isso não foi verificado, mostrando que a estrutura de população do *An. darlingi* manteve-se constante durante o tempo do estudo.

## 6. Conclusão

Há diferença na diversidade de espécies e na quantidade de mosquitos entre os dois sítios do ramal estudado, sendo que o km 30 apresentou maior densidade anofelínica quando comparado ao km 24.

O *An. darlingi* é a principal espécie encontrada no Ramal do Granada, seguida do *An. deaneorum*.

A dinâmica do *An. darlingi* na área de estudo foi semelhante a encontrada na literatura científica: hábito crepuscular, picos nas primeiras horas da noite e atividade exofílica maior que endofílica. Picos fora dos primeiros horários foram registrados, mas em épocas de alta densidade.

A variação sazonal mostrou a alta densidade do *An. darlingi* no primeiro semestre, em paridade com as épocas de chuvas.

Mesmo com a alta densidade de *An. darlingi* não houve aumento de casos da malária, mostrando um possível controle da doença na região.

O sequenciamento do gene ND4 mostrou que não há variação entre mosquitos que picam dentro e fora das residências. A variabilidade haplotípica sazonal indica que não há significativa inserção de novos haplótipos nas transições das épocas seca para as épocas de chuva.

## 7. Bibliografia

### 7.1- Artigos Científicos.

**Akhavan D., Musgrove P., Abrantes A., d’Gusmao R., (1999).** Cost-effective malaria control in Brazil. Cost-effectiveness of a malaria control program in the Amazon Basin of Brazil, 1988– 1996. *Soc Sci Med* 49: 1385–1399.

**Almeida A. P. G., Galão R. P., Sousa C. A., Novo M. T., Parreira R., Pinto J., Piedade J., Esteves A. (2008).** Potential Mosquito Vectors of Arboviruses in Portugal: Species, Distribution, Abundance and West Nile Infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102,823—832.

**Angêlla A. F., Luis HS Gil L. H. S., Pereira-da-Silva L. H., Ribolla P. E. M. (2007).** Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Rondônia, Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol: 102(8): 953-958.

**Arruda, M., Carvalho, M.B., Nussenzweig, R.S., Mararic, M., Ferreira, A. W. (1986).** Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 35: 873-881.

**Barik T. K., Sahu B., Swain V. (2009).** A review on *Anopheles culicifacies*: From Bionomics to Control with Special Reference to Indian Subcontinent. *Acta Tropica*, 109: 87–97.

**Barón S., Martín-Sánchez J., Gállego M., Morales-Yuste M., Boussa S., Morillas-Márquez F. (2008).** Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt *b*) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta. Tropica*. 107: 259–267.

**Bass C., Williamson M. S., Wilding C. S., Donnelly M. J., Field L. M. (2007).** Identification of the main malaria vectors in the *Anopheles gambiae* species complex using a TaqMan real-time PCR assay. *Malaria Journal*, 6:155.

**Bastos M. S., Silva-Nunes M., Malafronte R. S., Hoffmann E. H. E., Wulderlich G., Moraes S. L., Ferreira M. U. (2007).** Antigenic Polymorphysm and Naturally Acquired Antibodies to Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 in Rural Amazonians. *Clinical and Vaccine Immunology*. pag. 1249-1259.

**Berti J., Zimmerman R., Amarista J. (1993).** Spatial and Temporal Distribution of Anopheline Larvae in Two Malarious Areas in Sucre State, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88(3): 353-62.

**Bracco J. E., Capurro M. L., Lourêncio-de-Oliveira, R., Sallum, M. A. M. (2007).** Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 102(5): 573-580.

**Brochero H., Pareja P. X., Ortiz G., Olano V. A. (2006).** Sitios de cria y Actividad de Picadura de Especies de *Anopheles* en el municipio de Cimatarrá, Santander, Colombia. *Biomédica*, 26:269-77.

**Burkot T. R., Molineaux L., Graves P. M., Paru R. Battistutta D., Dagoro H., Barnes A., Wirtz R. A., Garner P. (1990).** The Prevalence of Naturally Acquired Multiple Infections of *Wuchereria bancrofti* and Human Malaria in Anophelines. *Parasitology* 100 pt 3: 396-75.

**Castro M. C., Monte-Mó R. L., Sawyer D. O., Singer B. H. (2005).** Malaria risk on the Amazon frontier. *PNAS*, n7, v: 103, 2452-57.

**Cetzee M. (2004).** Editorial Distribution of the African Malaria Vectors of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70(2): 103–104.

**Charlwood J. D. (1996).** Biological Variations in *Anopheles darlingi* Root. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 91(4): 391-398.

**Conn J. E., Mitchell S. E., Cockburn A. F. (1997).** Mitochondrial DNA variation within and between two species of neotropical anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Heredity* 88: 98-107.

**Conn J. E., Mitchell S. E., Cockburn A. F. (1998).** Mitochondrial DNA analysis of the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari*. *Genome* 41: 313-327.

**Conn J. E., Vineis J. H., Bollback J. P., Onyabe D. Y., Wilkerson R. C., Póvoa M. M. (2006).** Population Structure of the Malaria Vector *Anopheles darlingi* in a Malaria-endemic Region of Eastern Amazonian Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74(5), 2006, pp. 798–806.

**Deane, L. M. (1948).** Notas sobre a distribuição e a Biologia dos Anofelinos das regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. *Rev. Serv. Esp. Sau' de Publ.* 1: 827-965.

**Deane L. M. (1986).** Malaria Vectors in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81: Supl. 2, 5-14.

**Deane L. M. (1989).** A Cronologia da Descoberta dos Transmissores da Malária na Amazônia Brasileira. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 84, supl. IV, 149-156.

**Forattini O. P. (1987).** Exophilic Behavior of *Anopheles darlingi* root in a southern region of Brazil. *Rev. Sau. Pub.*, 21(4): 291-304.

**Forattini O. P., Kakitani I., Marques G. R. A. M., Brito M. (1998).** Imature Forms of Anopheline in Artificial Containers. *Rev. Saúde Pública*, 32 (2): 189-91.

**Freitas-Sibajev M.G., Conn J., Mitchell S.E., Cockburn A.F., Seawright J.A., Momen H. (1995).** Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 27: 79–99.

**Galardo A, K. R., Arruda M., Couto A. A. R. A., Wirtz R., Lounibos L. P., Zimmerman R. H. (2007).** Malaria Vector Incrimination in Three Rural Riverine Villages in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(3), pp. 461–469.

**Giglioli G., M.R.C.P., D.T.M. & H. (1956).** Biological Variations in *Anopheles darlingi* and *Anopheles gambiae*: their effect on practical Malaria Control in the Neotropical Region. *Bull. Org. Mond. Santé/ Bull Wld. Hlth. Org.*, 15: 461-471.

**Gil L. H. S., Alves F. P., Zieler H., Salcedo J. M. V., Durlacher R. R., Cunha R. P. A., Tada M. S., Camargo L. M. A., Camargo E. C., Pereira-da-Silva L. H. (2003).** Seasonal Malaria Transmission and Variation of Anopheline Density in Two Distinct Endemic Areas in Brazilian Amazon. *J. Med. Entomol.* 40(5): 636-41.

**González R., Wilkerson R., Suárez M. F., García F., Gallego G., Cárdenas H., Posso C. E., Duque M. C. (2007).** A population genetics study of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from Colombia based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction and amplified fragment length polymorphism markers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v.102 n.3.

**Guimarães A. E., Gentile C., Alencar J., Lopes C. M., Mello R. P. (2004).** Ecology of Anopheline (Diptera, Culicidae), malaria vectors around the Serra da Mesa Reservoir, State of Goiás, Brazil. 1 – Frequency and climatic factors. *Cad. Sau. Pub.* 20(1):291-302.

**Gutiérrez L. A., Naranjo N., Jaramillo L. M., Muskus C., Luckhart S., Conn J. E., Correa M. M. (2008).** Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica.* 107: 99–105.

**Harris A. F., Matias-Arnéz A., Hill N. (2006).** Biting time of *Anopheles darlingi* in the Bolivian Amazon and implications for control of malaria. *Trans. of the Royal Society of Trop. Med. and Hyg.* 100: 45-47.

**Hasan A. U., Suguri S., Sattabongkot J., Fujimoto C., Amakawa M., Harada M., Ohmae H. (2009).** Implementation of a novel PCR based method for detecting malaria parasites from naturally infected mosquitoes in Papua New Guinea. *Malaria Journal* 2009, 8:182.

**Kreutzer R.D., Kitzmiller J.B., Ferreira E. (1972).** Inversion Polymorphism in the Salivary Gland Chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. *Mosq News* 32: 555–565.

**Lima D., Pozzobon J. (2005).** Amazônia socioambiental: Sustentabilidade ecológica e diversidade social. *Estudos Avançados*, 19(54).

**Limongi J. E., Chaves K. M., Paula M. B. C., Costa F. C., Silva A. A., Lopes I. S., Neto A. A. P., Sales J. M., Rodrigues F., Resende M. A. M., Ferreira M. S. (2008).** Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.* 41(3):232-237.

**Lounibos L.P., Conn J.E. (2000).** Malaria vector heterogeneity in South America. *Am. Entomologist* 46: 238–249.

**Lourenço-de-Oliveira R., Guimarães A. E. G., Arlé M., Silva T. F., Castro M. G., Motta M. A., Deane L. M. (1989).** *Anopheles* Species, some of their Habits and Relation to Malaria in Endemic Areas of Rondonia State, Amazon Region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol 84(4): 501-504.

**Magris M., Rubio-Palis Y., Menares C., Villegas L. (2007).** Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102(3): 303-11.

**Manguin S., Roberts D. R., Andre R. G., Rejmankova E., Hakre S. (1996).** Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. *J. Med. Entomol.* 33(2):205-11.

**Manguin S., Wilkerson R. C., Conn J. E., Rubio-Palis Y., Danoff-Burg J. A., Roberts D. R. (1999).** Population Structure of the Primary Malaria Vector in South America, *Anopheles darlingi*, Using Isozyme, Random Amplified Polymorphic DNA, Internal Transcribed Spacer 2, and Morphologic Markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60(3): 364–376.

**Manguin S., Garros C., Dusfour I., Harbach R. E. , Coosemans M. (2008).** Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia* in Southeast Asia: An updated review. *Inf., Gen. and Evol.* 8: 489–503.

**Marrelli M.T., Branquinho M.S., Hoffmann E.H., Taipe-Lagos C.B., Natal D., Kloetzel J.K. (1998).** Correlation between positive serology for *Plasmodium vivax*-like/*Plasmodium simiovale* malaria parasites in the human and anopheline populations in the State of Acre, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92 (2): 149-51.

**Malafrente RS, Marrelli MT, Marinotti O (1999).** Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 36: 631–634.

**Mirabello L., Vineis J. H., Yanoviak S. P., Scarpassa V. M., Póvoa M. M., Padilla N., Achee N. L., Conn J. E. (2008).** Microsatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *BMC Ecology* 2008, 8:3.

**Moffett A., Shackelford N., Sarkar S. (2007).** Malaria in Africa: Vector Species' Niche Models and Relative Risk Maps. *PLoS ONE* 2(9): e824

**Molina-Cruz A., Mérida A. M. P., Mills K., Rodríguez F., Schoua C., Yurrita M. M., Molina E., Palmieri M., Black W. C. (2004).** Gene Flow among *Anopheles albimanus* Populations in Central America, South America, and the Caribbean Assessed by Microsatellites and Mitochondrial DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71(3): 350–359.

**Moreno J. E., Rubio-Palis Y. Páez E., Pérez E., Sánchez V. (2007).** Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. *Med. Vet. Entomol*, 21(4):339-49.

**Moritz C., Downling T. E., Brown W. M. (1987).** Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Am. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-92.

**Olano V. A., Brochero H. L., Sàenz R., Quiñones M. L., Molina J. A. (2001).** Mapas Preliminares de la Distribución de Especies de *Anopheles* Vectores de Malaria en Colombia. *Inf. Quinc. Epidemiol. Nac.*, 5:339-46.

**Paduan K. S., Ribolla P. E. M. (2008).** Mitochondrial DNA Polymorphism and Heteroplasmy in Populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *J. Med. Entomol*,45(1):59-67.

**Parmakelis A., Russello M. A., Caccone A., Marcondes C. B., Costa J., Forattini O. P., Sallum M. A. M., Wilkerson R. C., Powell J. R. (2008).** Short Report: Historical Analysis of a Near Disaster: *Anopheles gambiae* in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78(1), pp. 176–178.

**Peterson A. T. (2009).** Shifting suitability for malaria vectors across Africa with warming climates. *BMC Infectious Diseases*, 9:59.

**Quiñones M. L., Ruiz F., Calle D. A., Harbach R. E., Erazo H. F., Linton Y. (2006).** Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 101(6): 617-623.

**Rao R. U., Huanga Y., Bockarie M. J., Susapuc M., Laney S. J., Weila G. J. (2009).** A qPCR-based Multiplex Assay for Detection of *Wuchereria bancrofti*, *Plasmodium falciparum*, and *Plasmodium vivax* DNA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103(4): 365–370.

**Rejmankova E., Rubio-Palis Y., Villegas L. (1999).** Larval habitats of anopheline mosquitoes in the Upper Orinoco, Venezuela. *J. Vector Ecol* 24: 130–137.

**Rezende H. R., Soares R. M., Cerutti Jr C., Alves I. C., Natal D., Urbinatti P. R., Yamasaki T., Falqueto A., Malafronte R. S. (2009).** Entomological Characterization and Natural Infection of Anophelines in an Area of the Atlantic Forest with Autochthonous Malaria Cases in Mountainous Region of Espírito Santo State, Brazil. *Neotropical Entomology* 38(2):272-280.

**Rona L. D. P., Carvalho-Pinto C. J., Gentile C., Grisard E. C., Peixoto A. A. (2009).** Assessing the molecular divergence between *Anopheles (Kerteszia) cruzii* populations from Brazil using the *timeless* gene: further evidence of a species complex. *Malaria Journal*, 8:60.

**Rosa-Freitas M. G., Broomfiels G., Priestman A., Milligan P. J. M., Momen H., Molyneux D. H. (1992).** Cuticular Hydrocarbons, Isoenzymes and Behavior of Three Population of *Anopheles darlingi* from Brazil. *J. Am. Mos. Control Association* Vol. 8, N° 4.

**Rosa J. F. S. T., Rosa A. P. A. T., Dégallier N., Vasconcelos P. F. C., (1992).** Characterization and antigenic relationship of three new Bun yavirus in the *Anopheles A* serogroup (Bunyaviridae) of arboviruses. *Rev. Sau. Púb. l.*, 26(3): 173-8.

**Sallum M. A. M., Marrelli M. T., Nagaki S. S., Laporta G. Z., Santos C. L. S. (2008).** Insight into *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) Species from Brazil. *J. Med. Entomol.* 45(6): 970-981.

**Santos V. R., Yokoo E. M., Souza-Santos R., Atanaka-Santos M. (2009).** Socioenvironmental Factors Associated with the Spatial Distribution of Malaria in the Vale do Amanhecer Settlement, Municipality of Juruena, State of Mato Grosso, 2005. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.* 42(1):47-53.

**Santos R.L., Padilha A., Costa M. D., Costa E. M., Dantas-Filho H. C., Povoá M. M. (2009).** Malaria vectors in two indigenous reserves of the Brazilian Amazon. *Rev Saúde Pública*;43(5):859-68.

**Scarpassa V. M. & Conn J. E. (2007).** Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102(3): 319-327.

**Scarpassa V. M., Cardoza T. B., Cardoso Jr, R. P. (2008).** Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78(6): 895–903.

**Silva-do-Nascimento T. F., Wilkerson R. C., Lourenço-de-Oliveira R., Monteiro F. A. (2006).** Molecular Confirmation of the Specific Status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and Evidence of a New Cryptic Species within *An. triannulatus* in Central Brazil. *J. Med. Entomol.* 43(3): 455-59.

**Silva-Nunez M., Ferreira, M. U. (2007).** Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the “synptomatic“ vs “asymptomatic“ dichotomy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 102(3): 341-347.

**Souza-Santos R. (2002).** Seasonal Distribution of malaria vectors in Machadinho d’Oeste, Rondônia State, Amazon Region, Brazil. *Cad. Sau. Públic*, 18(6):1813-1818.

**Schoeler G. B., Flores-Mendoza C., Fernández R., Davila J. R., Zyzak M. (2003).** Geographical Distribution of *Anopheles darlingi* in the Amazon Basin Region of Peru. *Journal Am. Mos. Con. Assoc.*, 19(4):286-296.

**Tadei W. P. (1986).** Biologia dos Anofelinos Amazônicos X. Ocorrência de espécies de *Anopheles* nas áreas de influência das Hidrelétricas de Tucuruí (Pará) e Balbina (Amazonas). *Rev. Bras. Engenh.* 1(4): 71-78.

**Tadei W. P., Santos J.M.M., Scarpassa V.M., Rodrigues I. B. (1993).** Incidência, Distribuição e Aspectos Ecológicos de espécies de *Anopheles* (Díptera: Culicidae) em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia Brasileira. In: Ferreira E.J.G., Santos G.M., Leão E.L.M., Oliveira L.A., organizadores Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia. INPA, vol. 2: 167-96.

**Tadei W. P., Thatcher B. D., Santos J. M. M., Scarpassa V. M., Rodrigues I. B., Rafael M. S. (1998).** Ecologic Observations on Anopheline Vectors of Malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59(2), pp. 325–335.

**Tadei W. P., Thatcher, B. D. (2000).** Malaria Vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* (1). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 42 (2): 87-94.

**Turell J. M., Sardelis M. R., Jones J. W., watts D. M., Fernandez R., Carbajal F., Pecor J. E., Klein T. A. (2008).** Seasonal Distribution, Biology, and Human Attraction Patterns of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a Rural Village and Adjacent Forested Site Near Iquitos, Peru. *J. Med. Entomol.* 45(6): 1165-1172.

**Urdaneta-Marquez L., Bosio C., Herrera F., Rubio-Palis Y., Salasek M., Black W. C. (2008).** Genetic Relationships among *Aedes aegypti* Collections in Venezuela as Determined by Mitochondrial DNA Variation and Nuclear Single Nucleotide Polymorphisms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78(3), 2008, pp. 479-491.

**Vezenegho S. B., Brooke B. D., Hunt R. H., Coetzee M., Koekemoer L. L. (2009).** Malaria vector composition and insecticide susceptibility status in Guinea Conakry, West Africa. *Medical and Veterinary Entomology*: 23, 326–334.

**Vittor A. Y., Gilman R. H., Tielsch J., Glass G., Shields T., Lozano W. S., Pinedo-Cancino V., Patz J. A. (2006).** The Effect of Deforestation on the Human-biting Rate of *Anopheles darlingi*, the primary Vector of Falciparum Malaria in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74(1): 3–11.

**Vittor A. Y., Pan W., Gilman R. H., Tielsch J., Glass G., Shields T., Sánchez-Lozano W., Pinedo V. V., Salas-Cobos E., Flores S., Patz J. A. (2009).** Linking Deforestation to Malaria in the Amazon: Characterization of the Breeding Habitat of the Principal Malaria Vector, *Anopheles darlingi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81(1), pp. 5–12.

**Xavier M. M. S. P. & Rebêlo J. M. M. (1999).** Species of *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) in a malaria-endemic area, Maranhão, Brazil. *Rev. Saúde Pública*, 33 (6): 535-41.

**Yasuoka J., Levins R. (2007).** Impact of Deforestation and Agricultural development on anopheline ecology and malaria epidemiology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(3), pp. 450–460.

**Zapata M. A., Cienfuegos A. V., Quirós O. I., Quiñones M. L., Luckhart S., Correa M. M. (2007).** Discrimination of Seven *Anopheles* Species from San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia, by Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Its Sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(1), pp. 67–72.

## **7.2-Boletins Epidemiológicos e Realatórios.**

**World Health Organization (2008).** World Malaria Report 2008. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. pag: VII; 9-15; 45-47; 154.

**Ministério da Saúde (2003).** Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM. Vigilância em Saúde. Série C. Projetos, Programas e Relatórios. Cap. 1, pag: 14-17.

**Ministério da Saúde (2008).** Situação Epidemiológica da Malária no Brasil 2008. Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão, pag. 1-2.

## **7.3-Sites:**

**Graffigan V. T., Wilkerson R. C., Pecor J. E., Stoffer J. A., Anderson T. (2009).** Systematic Catalog of Culicidae. Retirado em 20/10/09.

(<http://www.mosquitocatalog.org/>)

**Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2009).** DEGRAD-Mapeamento da Degradação Florestal na Amazônia Brasileira. Retirado em 17/11/2009.

(<http://www.obt.inpe.br/deggrad/>)

**Ministério da Saúde (2009).** Profissional e Gestor: Malária. Distribuição da Malária no Brasil. Retirado em 20/10/09.

([http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1526](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526)).

**World Health Organization (2009).** Malaria Media Center. Retirado em 15/10/09.

(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>).

#### **7.4-Livros :**

**Adas M. (2006).** Cosntrução do Espaço Geografico Brasileiro. Ed. Moderna, São Paulo. 5º Edição. Cap10, pag: 154-67.

**Consoli, R. A. G. B., Oliveira, R. L. (1998).** Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. Cap 3, pag: 79-85.

**Forattini, O. P. (2002).** Culicidologia Médica. Edusp, São Paulo. Volume 2. Cap 4, pag:139-146, Cap 8, pag:252, Cap 10 , pag: 322-323, Cap 12 , pag:396.

**Nascimento D. R., Carvalho D. M., Marques R. T. (2006).** Uma História Brasileira das Doenças. Mauad X, Rio de Janeiro. Volume 2. Cap 3, pag: 40-49.

#### **7.5-Teses Acadêmicas:**

**Nunez, M.S. (2008).** Fatores de Risco, Distribuição Espacial e Perspectivas de Controle da Malária: Estudo Longitudinal em um Comunidade Rural da Amazônia (Granada, Acre). Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Parasitologia). São Paulo. Pag: 60-65.

**Souza, E. F. (2002).** Análises Comparativas dos Custos Totais de Produção dos PAD's Boa Esperança e Humaitá. Monografia apresentada ao curso de Graduação em Economia da Universidade Federal do Acre como requisito parcial para obtenção do Grau em Bacharel em Ciências Econômicas. Acre. Pag: 11-15.

Anexo 1

Imagem 2



Imagem 3



Imagem 4



Imagem 5



Fotos: Paulo Rufalco Moutinho

Anexo 2

Imagem 6



Imagem 7



Imagem 8



Imagem 9



Fotos: Paulo Rufalco Moutinho