

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**Instituto de Biotecnologia – Campus de Botucatu**

**THAYS BARROS DE GOIS**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO BACTERIANA DE LARVAS DE**  
***Anopheles Darlingi* EM UMA ÁREA ENDÊMICA DE MALÁRIA**

Botucatu – São Paulo

2025

**THAYS BARROS DE GOIS**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO BACTERIANA DE LARVAS DE  
*Anopheles Darlingi* EM UMA ÁREA ENDÊMICA DE MALÁRIA**

**PROFº DRº PAULO EDUARDO MARTINS RIBOLLA**

Trabalho de Conclusão de Curso à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Área de Concentração:

Orientador: Prof. Dr.  
Paulo Eduardo Martins Ribolla

Botucatu – São Paulo

2025

G616e

Gois, Thays Barros

Estudo da composição bacteriana em larvas de *Anopheles darlingi* em uma área endêmica de malária. / Thays Barros Gois. -- Botucatu, 2025

27 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

1. Microbiota. 2. Malária. 3. Metagenômica. 4. *Anopheles darlingi*. I.

Título.


THAYS BARROS DE GOIS

## ESTUDO DA COMPOSIÇÃO BACTERIANA DE LARVAS DE *Anopheles darlingi* EM UMA ÁREA ENDÊMICA DE MALÁRIA

Trabalho de Conclusão de Curso,  
apresentado a Universidade Estadual  
Paulista, como parte das exigências para  
a obtenção do título de Bacharel, do curso  
de Graduação em Ciências Biomédicas.


Botucatu, 09 de dezembro de 2025.

### BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente  
 PAULO EDUARDO MARTINS RIBOLLA  
Data: 12/12/2025 16:38:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Paulo Eduardo Martins Ribolla  
Afiliações

 Assinado de forma digital por Wellerson  
Rodrigo Scarano:18932210837  
Dados: 2025.12.13 11:20:56 -03'00'

---

Prof. Wellerson Rodrigo Scarano  
Afiliações

Documento assinado digitalmente  
 MATHEUS NAIA FIORETTO  
Data: 13/12/2025 12:09:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Matheus Naia Fioretto  
Afiliações

## RESUMO

A malária é uma doença parasitária endêmica nas regiões tropicais e subtropicais. O presente trabalho investigou a diversidade e composição microbiana de larvas do mosquito vetor *Anopheles darlingi*, o principal vetor da malária no Brasil. As amostras foram colhidas em diferentes locais de Barcelos entre os meses de abril e junho de 2022. Foram extraídos o DNA de 45 amostras, com amplificação da região 16S rRNA das bactérias e o seu sequenciamento por NGS. Os resultados mostraram que os locais de Aparecida e Estrada de Eloi apresentaram uma alta diversidade filogenética, enquanto Marará e São Pedro apresentaram as menores diversidades. A análise de PCA mostrou agrupamentos por proximidade geográfica, com os bairros de São Sebastião e São Pedro isolados, sugerindo que o ambiente pode influenciar na microbiota larval, como indicado em pesquisas anteriores.

**Palavras chaves:** *Anopheles darlingi*, microbiota, metagenômica, sequenciamento, Barcelos

## ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease endemic to tropical and subtropical regions. This study investigated the microbial diversity and composition of larvae of the mosquito vector *Anopheles darlingi*, the main malaria vector in Brazil. Samples were collected from different locations in Barcelos between April and June 2022. DNA was extracted from 45 samples, with amplification of the bacterial 16S rRNA region and sequencing by NGS. The results showed that the Aparecida and Estrada de Eloi sites exhibited high phylogenetic diversity, while Marará and São Pedro showed the lowest diversities. PCA analysis showed clustering by geographic proximity, with the neighborhoods of São Sebastião and São Pedro isolated, suggesting that the environment may influence larval microbiota, as indicated in previous research.

**Keywords:** *Anopheles darlingi*, microbiota, metagenomics, sequencing, Barcelos

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
1.1 A malária .....	7
1.2 Epidemiologia da malária no Brasil.....	8
1.3 Ciclo de vida do Plasmodium .....	9
1.4 O mosquito vetor, <i>Anopheles darlingi</i> .....	11
1.5 Composição microbiana .....	14
<b>2. METODOLOGIA</b> .....	16
2.1 Área de estudo .....	16
2.2 Material de estudo.....	16
2.3 Extração do DNA.....	17
2.4 Reação em Cadeia de Polimerase 16S.....	18
2.5 Indexação dos fragmentos de DNA .....	18
2.6 Purificação de fragmentos do gel.....	19
2.7 Preparo da biblioteca .....	19
2.8 Sequenciamento.....	19
2.9 Análise do sequenciamento.....	19
<b>3. RESULTADOS</b> .....	20
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A malária

A malária é uma doença parasitária que exerce grande impacto no sistema de saúde global, apresentando altos índices de morbidade e mortalidade nas populações residentes em áreas endêmicas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Ministério da Saúde, 2025).

Segundo o Relatório Mundial de Malária de 2024, houve um aumento de 11 milhões de casos de malária no mundo em 2023, totalizando 263 milhões de notificações em 83 países endêmicos. Destes, 29 países foram responsáveis por aproximadamente 95% dos casos e 96% das mortes associadas à doença. Em 2023, na Região das Américas, o Brasil, República Bolivariana da Venezuela e a Colômbia destacaram-se como os principais países endêmicos, representando cerca de 76,8% dos casos. Esses locais apresentam condições ambientais favoráveis ao crescimento e desenvolvimento de potenciais vetores da malária (Moutinho et al., 2011).

A infecção é causada por espécies do protozoário do gênero *Plasmodium*, cujo ciclo de transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* infectada. (Trampuz et al., 2003; Ministério da Saúde, 2025). Casos raros de infecção podem ocorrer pela exposição a sangue contaminado, como em transfusões, uso de seringas contaminadas, acidentes de laboratório ou via transmissão congênita, ou seja, da mãe para o feto (Trampuz et al., 2003).

O período de incubação, definido como o intervalo entre a infecção e o surgimento dos primeiros sintomas, varia de acordo com a espécie, podendo se manifestar entre sete dias a vários anos após a exposição ao agente patogênico. (Sato, 2021)

Os sintomas iniciais são semelhantes aos de infecções virais, o que pode ocasionar um atraso no diagnóstico, particularmente em regiões em que a doença não é endêmica (Trampuz et al., 2003). Entre os principais sintomas estão febre alta, calafrios, tremores, sudorese e dores de cabeça. (Trampuz et al., 2003; Ministério da Saúde, 2025). Outras manifestações podem ser observadas como tontura, mal-estar, mialgia, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia leve e tosse seca. Podemos observar no exame físico febre, taquicardia, icterícia, palidez, hipotensão ortostática, hepatomegalia e esplenomegalia. Além disso, há casos de pacientes infectado que são assintomáticos (Martins et al., 2025; Trampuz et al., 2003)

Embora a malária apresente um tratamento e cura, a ausência de um diagnóstico precoce pode levar a uma evolução rápida, tendo como consequência o óbito do paciente. (Trampuz et al., 2003; Ministério da Saúde, 2025). Diante de tal relevância epidemiológica, é essencial o conhecimento aprofundado do ciclo de vida dos vetores, do agente causador e dos mecanismos de transmissão, visando a criação e implementação de modelos de controles vetoriais eficazes.

## 1.2 Epidemiologia da malária no Brasil

De acordo com o Centro Nacional de Inteligência Epidemiológica e Vigilância Genômica, no ano de 2024, o Brasil registrou 138.618 mil casos de malária. Cerca de 99% das notificações foram registradas na região da Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão (Secretária de Estado de Saúde do Amazonas, 2024; Ministério da Saúde, 2025).

Entre o ano de 2021 a 2023, a região Amazônica apresentou respectivamente 138.994, 128.936, 140.223 casos autóctones de malária, sendo que 40% das notificações foram registradas no estado do Amazonas (Secretária de Estado de Saúde do Amazonas, 2024).

Em 2024, a região apresentou uma Incidência Parasitária Anual (IPA), definido como o número de casos novos, por local provável de infecção, para cada 1.000 habitantes, de 42,70, representando 64.090 casos de malária. (Secretária de Estado de Saúde do Amazonas, 2024).

De acordo com o Boletim Epidemiológico de 2024 da Secretaria de Saúde do Amazonas (SES-AM), de janeiro a setembro de 2024, predominaram-se os casos de malária em áreas rurais (43,55%), seguido por áreas indígenas (40,44%), área urbana (7,84%), assentamento (5,69%), acampamento (1,58%), garimpo (0,64%).

Referente ao sexo e faixa etária, a SES-AM, informa que a malária predomina no sexo masculino, com 58,31% dos casos, sendo a faixa etária mais atingida a de menores de 10 anos, que representam 24,37% dos casos.

As espécies parasitárias que predominam nos casos notificados de malária na região são o *Plasmodium vivax* (84,42%) *Plasmodium falciparum* (15,46%) e o *Plasmodium malariae* (0,12%) (Secretária de Estado de Saúde do Amazonas, 2024).

De acordo com o Painel Epidemiológico do Ministério da Saúde, Barcelos é o segundo município do Amazonas com os maiores número de casos de malária (figura 1), ficando atrás de São Gabriel da Cachoeira, com 6.803 casos notificados em 2024 e um IPA de 365,2.

A malária também está presente em outros estados, conhecidos como regiões extra-amazônicas, que representam cerca de 0,5% dos casos de malária tratados e diagnosticados.

(Costa, *et al.* 2014). Cerca de 90% desses casos são importados de regiões endêmicas da doença, como a região amazônica e o continente africano (Ministério da Saúde, 2025).

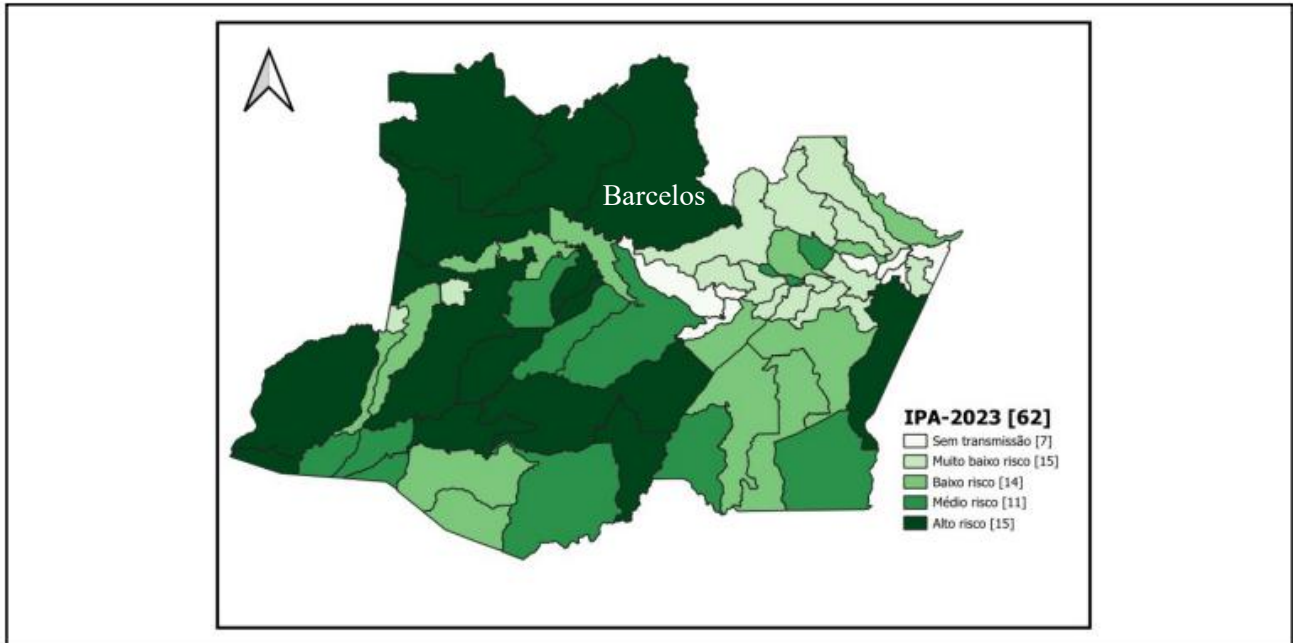


Figura 1: Risco de transmissão da malária no Amazonas de acordo com o IPA,2023.

Fonte: Boletim epidemiológico – Secretária de Estado de Saúde do Amazonas

Apesar de poucos casos, as regiões não endêmicas apresentam uma alta taxa de mortalidade (Bastos et al., 2024; Garcia et al., 2022; Pina-Costa et al., 2014) (Bastos, *et al.* 2024). No período de 2013 a 2022, a região Sudeste apresentou os maiores números de óbitos, representando cerca de 36% dos casos. (Bastos, *et al.* 2024). A alta mortalidade presente na região extra-amazônica em relação à região Amazônica pode ser explicada, pela baixa incidência da doença, por não ser tão comum há um desafio para os profissionais em reconhecer e diagnosticar precisamente, muitas vezes os sintomas acabam sendo confundidos com outras doenças (Garcia et al., 2022; Pina-Costa et al., 2014).

### 1.3 Ciclo de vida do Plasmodium

São cinco as espécies de Plasmodium que causam a malária em humanos, sendo elas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. (Su et al., 2019). Essas espécies variam sua dominância de acordo com a região, por exemplo, em 2024 no Amazonas, as principais espécies de protozoário foram o

*Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum* (Secretária de Estado de Saúde do Amazonas, 2024).

As diferentes espécies possuem um ciclo de vida e desenvolvimento semelhante, a infecção se inicia com a inoculação de esporozoítos do Plasmodium na derme humana após a picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* (Sato, 2021; Ferreira, 2020). Durante o repasto sanguíneo, o mosquito vetor inocula cerca de 15 a 200 esporozoítos que alcançam rapidamente a corrente sanguínea e migram para o fígado, onde invadem os hepatócitos, iniciando uma reprodução assexuada, conhecida como esquizogonia hepática, pré-eritrocitária ou exoeritrocitária (Sato, 2021; Ferreira 2020; Nogueira e Rosário, 2010).

Neste ciclo (figura 2), os esporozoítos se multiplicam dando origem aos criptozoítos, estruturas esféricas uninucleares, que sofrem uma divisão nuclear originando o esquizonte, uma célula multinucleada, que dará origem ao merozoítos. (Ferreira, 2020).

O *P. vivax* e *P. ovale* possuem a capacidade de gerar formas dormentes intra-hepáticas por meio da diferenciação dos esporozoítos, conhecidas como hipnozoítos, que podem reativar-se após semanas ou meses, mesmo após tratamento antimaláricos, e gerar novas infecções no indivíduo (Imwong et al., 2007; White, 2011; Ferreira, 2020).

Os merozoítos invadem exclusivamente os eritrócitos, onde irão passar por uma nova esquizogonia, gerando novos merozoítos (Sato, 2021). Para esse resultado final, o merozoíto passa por transformações na hemácia, onde primeiramente dará origem ao trofozoíto, o esquizonte eritrocitário maduro que possui de 6 a 32 núcleos, em que cada núcleo irá originar um merozoíto (Ferreira, 2020; ATLAS DE PARASITOLOGIA – UNIFAL).

Os novos merozoítos gerados voltam para a corrente sanguínea, e reiniciam o ciclo intra-eritrocitário a cada 24 horas para *P. knowlesi*, 48 horas para *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* e a cada 72 horas para o *P. malariae* (Sato, 2021).

Ainda na corrente sanguínea, alguns merozoítos podem se diferenciar em um novo estágio, diferenciando-se em gametócitos para a reprodução sexual, que são formas que irão infectar o mosquito vetor (Sato, 2021; Ferreira 2020).

A última parte do desenvolvimento do protozoário, ocorre no interior no mosquito vetor. Ao realizar o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito inicia o processo de esporogonia. Ao serem estimulado pelo intestino médio do mosquito, os gametócitos masculino e feminino se diferenciam, em que o masculino sofre exflagelação e gera os microgametas, enquanto os gametócitos femininos se tornam macrogametas. O zigoto formado pela fusão dos gametas, transforma-se no oocineto, um estágio móvel. Ele penetra a parede do estômago do mosquito e transforma-se em oocisto, que irá se alojar entre o epitélio e a membrana basal, através da

esporogonia, o oocisto dará origem ao esporozoítos. Ao se romper, o oocisto libera milhares de esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do mosquito, que irá inoculá-los durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (Sato, 2021). Essa última parte do ciclo de vida do *Plasmodium* dura cerca de 10 a 18 dias (Sato, 2021).

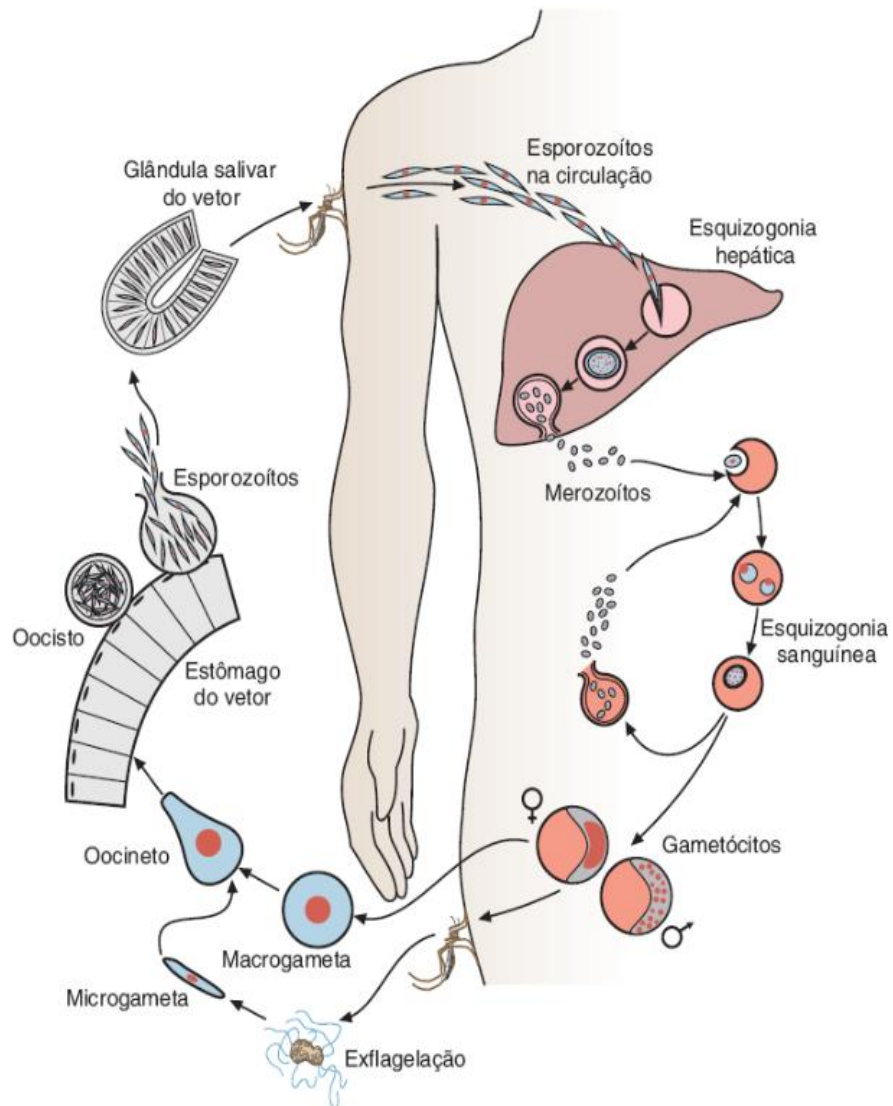


Figura 2: Ciclo de vida do *Plasmodium* spp.

Fonte: Ferreira, 2020.

#### 1.4 O mosquito vetor, *Anopheles darlingi*

O *Anopheles darlingi* é um importante inseto vetor na transmissão da malária na América, pois possui alta suscetibilidade ao *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. (Villegas; Pimenta, 2014). A espécie faz parte do gênero *Anopheles*, pertencendo à ordem Diptera, da família Culicidae.

O *Anopheles* pertencente ao subgênero *Nyssorhynchus* é encontrado em todo o território nacional, com exceção de algumas regiões árida do Nordeste e do Sul do país (Ferreira, 2020).

O ciclo de vida é holometabólico, ou seja, possuem metamorfoses completas e passam por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Sendo as três primeiras aquáticas e a última terrestre/aérea. (Ferreira, 2020; Rey, 2008)

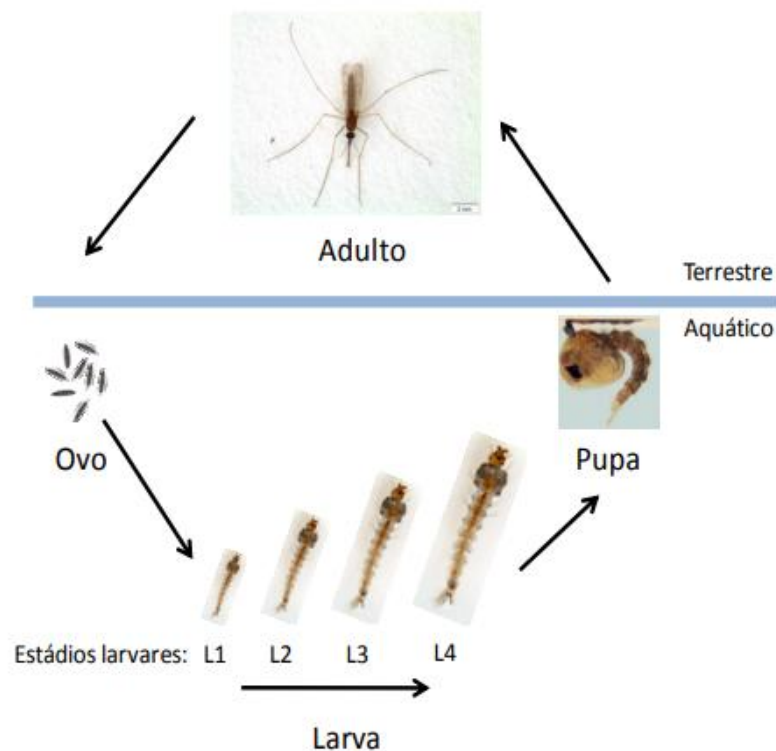


Figura 3: Fases do ciclo de vida do mosquito *Anopheles*

Fonte: Manual de Entomologia da Malária

O ciclo de desenvolvimento se inicia com a oviposição dos ovos na superfície da água, os ovos possuem flutuadores laterais, e são depositados separadamente na água em uma posição horizontal (Ferreira, 2020).

Em geral, as larvas do *Anopheles darlingi* são encontradas nas margens de ribeiros e lagoas com águas claras e fundos lodosos que possuem sombra e vegetação flutuante, mas também podem ser encontrados em fontes criadas pelo homem, como viveiro de peixe, cavas de mineração abandonadas e barragens. Há fatores como a pluviosidade, temperatura, umidade e

a época do ano que influenciam na sobrevivência das larvas (Dos Santos et al., 2024; Williams e Pinto, 2012).

Ao eclodir, os ovos dão origem as larvas, que possuem um corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. Sua cabeça é distinta, o tórax largo e achatado e um abdômen com segmentos que possuem um par de espiráculos, que são aberturas respiratórias. Diferentemente das larvas de culicíneos, os anofelinos não possuem sifão respiratório. O desenvolvimento da larva é dividido em 4 estágios, designados de L<sub>1</sub> a L<sub>4</sub> (Rey, 2008; Williams e Pinto, 2012).

Após o último estágio a larva se torna pupa, que possui um formato de vírgula, com o corpo dividido em cafelotórax e abdômen. Elas possuem o hábito de repousar à superfície da água, mas podem nadar para o fundo quando ocorrem perturbações (Rey, 2008; Williams e Pinto, 2012).

A última metamorfose dá origem ao adulto, semelhante a larvas, esse estágio possui o corpo dividido em cabeça com dois olhos compostos e duas antenas, que permitem a diferenciação sexual. No macho, elas são plumosas e nas fêmeas são pilosas. Além disso, eles apresentam dois palpos maxilares e uma probóscida picadora-sugadora. O tórax possui 3 segmentos, sendo eles: protórax, mesotórax e metatórax, em que cada um possui um par de pernas. No mesotórax também temos um par de asas e espiráculos pares, no metatórax encontramos um par de balanceiros e espiráculos pares. O seu abdome possui oito segmentos, com os dois últimos apresentando modificações de acordo com o sexo do inseto (Ferreira, 2020; Williams e Pinto, 2012). Os mosquitos possuem um hábito de repousa em um ângulo de 50° e 90° relativo à superfície, o que os diferencia das formas adultas dos culicíneos. (Williams e Pinto, 2012; Rey 2008).

Os machos possuem o hábito de se alimentar de néctar vegetal, enquanto as fêmeas se alimentam de sangue, que possui proteínas importantes para o desenvolvimento dos ovos, sendo esse hábito essencial para o seu ciclo gonotrófico. (Ferreira, 2020) O período da alimentação é crepuscular e noturno, e a duração varia de acordo com a estação do ano e sua densidade populacional (Moutinho et al., 2011)

Estudos mostram que o mosquito apresenta variações no seu comportamento de picada, o que dificulta o seu controle. (Villegas; Pimenta, 2014) Acredita-se que o uso de redes de proteção impregnadas com inseticida tenha tornado o comportamento das fêmeas exofílico, ou seja, após o repasto elas repousam próximos as casas, e não intradomiciliar como era antes. (Villegas; Pimenta, 2014).

Conhecer o comportamento da espécie, como de repouso e picada, é essencial para realizar o controle adequado do vetor, visto que as principais medidas de controle se baseiam em inseticidas são de aplicação intradomiciliar. Há diversos fatores que podem influenciar no comportamento da espécie, como o desmatamento, construção de habitações em locais de mata e mudanças climáticas. (Moutinho et al., 2011)

### **1.5 Composição microbiana**

A microbiota se caracteriza pela comunidade de vírus, fungos e bactérias que colonizam um habitat específico, como a presente no intestino do *Anopheles darlingi*. Sua informação genômica é conhecida como metagenoma (Villegas; Pimenta, 2014; Da Silva et al., 2024).

A comunidade da microbiota do mosquito é estabelecida através de diferentes caminhos ao longo da sua vida e desenvolvimento. Durante os estágios imaturos, a composição da comunidade vem fortemente influenciada pelo habitat aquático de oviposição, onde as formas imaturas se alimentam por meio da filtração de milhares de bactérias. Há evidências de transições verticais de bactérias simbióticas que podem conferir vantagens adaptativas. Além disso, a alimentação e o acasalamento também podem colaborar para a aquisição de novas bactérias (Romoli; Gendrin, 2018).

Podemos observar que a microbiota varia de acordo com o estágio de desenvolvimento (larva, pupa e adulto), fontes alimentares e localização geográfica. (Cansado-Utrilla et al., 2021) Isso reflete o conceito de plasticidade microbiota, que é a capacidade que a comunidade possui em se reorganizar em respostas a diferentes pressões seletivas (Iebba et al., 2016).

Demonstração clara da influência da localização geográfica na composição da comunidade emergiu de análises metagenômicas realizadas em 2023, em que Mosquera *et al.* Coletaram amostras de água e de formas imaturas dos mosquitos *Anopheles darlingi*, em duas regiões distintas do município de Coari (AM). Foram encontradas Unidades Operacionais Taxonômicas (OTUs) compartilhadas entre as formas imaturas e o ambiente aquático em que foram colhidas, demonstrando um fluxo gênico e sugerindo que microbiota do mosquito não é isolada. Isso implica que estudos sobre competência vetorial devem considerar a variação biogeográfica como fator confundidor potencial.

A interação da microbiota com os insetos é o fator crucial e pode ser indicado como um dos motivos do sucesso evolutivo desses animais na natureza. Ela exerce influência profunda nos aspectos fisiológicos do vetor através de muitos mecanismos. As bactérias simbióticas

produzem enzimas que irão degradar os polissacarídeos complexos, facilitando a digestão de açúcares em adultos. Além disso, elas sintetizam vitaminas B e K, essenciais para o metabolismo energético. Também podem exercer influência no sistema imune do hospedeiro, aumentando a resistência a patógenos por meio de mecanismos de exclusão competitiva (Hooks; O'Malley, 2017; Santos et al., 2023; Villegas; Pimenta, 2014; Popkes; Valenzano, 2020)

A microbiota presente no intestino e nas glândulas salivares possuem um grande potencial de interagir diretamente com os patógenos e modular a transmissão. A competência vetorial, definida como a capacidade de uma população de vetores em sustentar o desenvolvimento do patógeno e transmiti-lo ao hospedeiro, é influenciada pela microbiota, há competição com o *Plasmodium* por ocupação de nicho, as bactérias podem produzir moléculas que inibem o ciclo do parasita e há modulação da resposta imune do vetor. (Cansado-Utrilla et al., 2021)

Uma das formas de se analisar o metagenoma presente no organismo e em seu habitat é por meio da metagenômica, uma ferramenta que surgiu da genômica microbiana clássica, que permite o estudo de comunidades microbianas em seus habitats naturais, sem a necessidade de culturas puras. É uma área da biologia molecular que realiza o sequenciamento do DNA de um organismo com o objetivo de identificar a comunidade de microrganismos, como vírus, bactérias e fungos, além de genes e variantes presentes na amostra. (Villegas; Pimenta, 2014)

Há diversos fatores que podem influenciar os resultados da pesquisa, como método de captura dos insetos, número de mosquitos/larvas, tipo de ácido nucleico (DNA/ RNA) que será analisado, protocolos de enriquecimento e ferramentas da bioinformática (Da Silva et al., 2024).

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em diferentes bairros do município de Barcelos, o maior município do estado do Amazonas, com uma área territorial de 122.445,039 km<sup>2</sup>, localizado na margem direita do rio Negro e a 405 km de Manaus. De acordo com o IBGE, a população em 2022 era estimada em 18.834 habitantes e uma densidade demográfica de 0,15 habitantes/ km<sup>2</sup>. Os bairros da região em que foram coletadas as amostras foram Aparecida, Bairro da Paz, Estrada de Eloi, Estrado do Goiano, Marará, São Lázaro, São Pedro e São Sebastião.

### 2.2 Material de estudo

As amostras de larvas foram coletadas 45 larvas em diferentes bairros do município de Barcelos entre os meses de abril, maio e junho de 2022.

Tabela 1: Dados sobre as amostras coletadas e os seus respectivos locais de coleta

<b>Amostra</b>	<b>Bairro</b>
4	Aparecida
5	Aparecida
6	São Sebastião
7	São Sebastião
8	São Sebastião
9	São Sebastião
11	Estrada de Eloi
12	Estrada de Eloi
14	Estrada de Eloi
15	Estrada de Eloi
16	Estrada do Goiano
17	Estrada do Goiano
18	Estrada do Goiano
19	Estrada do Goiano
20	Estrada do Goiano
21	São Lázaro
22	São Lázaro

---

23	São Lázaro
24	São Lázaro
25	São Lázaro
26	São Pedro
28	São Pedro
30	Bairro da Paz
31	Marara
32	Marara
33	Marara
34	Marara
35	Marara
36	São Sebastião
37	São Sebastião
38	São Sebastião
39	São Sebastião
40	São Sebastião
50	Aparecida
51	São Sebastião
52	São Sebastião
53	São Sebastião
54	São Sebastião
55	São Sebastião
56	São Lázaro
58	São Lázaro
60	São Lázaro
62	Estrada de Eloi
63	Estrada de Eloi
64	Estrada de Eloi

---

Fonte: elaborada pelo autor.

### 2.3 Extração do DNA

As amostras foram utilizadas em estudo anteriores, por isso o seu DNA já estava extraído e armazenado em eppendorfs devidamente identificados e conservados em freezer em condições

ideais de temperatura. A extração do DNA das amostras foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit da Promega, seguindo o protocolo.

A concentração de DNA foi medida utilizando o Qubit 2.0, por meio do ensaio Qubit™ dsDNA de alta sensibilidade (HS) da Invitrogen™.

## **2.4 Reação em Cadeia de Polimerase 16S**

Após a quantificação do DNA, foi realizada o protocolo da Illumina®. Em uma capela de fluxo laminar, foi preparado o Mastermix para PCR 16S, em que foram adicionadas 12,5 µL de GoTaq® Green MasterMix (Promega), 5 µL de do Primer Reverse (1µM), 5 µL de do Primer Forward (1µM) e 2,5 µL de DNA. O Mastermix foi distribuído nos poços da placa até que se atingissem o total de amostras coletadas, a placa foi selada, centrifugada a 1.100 rpm por um minuto e inserida no termociclador com o protetor térmico.

O ciclo térmico realizado nas seguintes condições: 3 minutos a 95° C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 55° C e 30 segundos a 72° C, por último, um ciclo de 72° C por 5 minutos.

Após a PCR, realizou-se a purificação do produto da PCR, foi adicionado 45µL do Illumina® Purification beads em cada poço e ressuspendido, a placa foi colocada no suporte magnético e após alguns minutos de descanso, o sobrenadante foi descartado. Após isso, foram feitas duas lavagens com álcool 80% para eliminação de contaminantes. A placa foi retirada do suporte magnético, e foram adicionadas 22 µL de água ultrapura autoclavada. Ao retornar a placa ao suporte, o DNA foi transferido para outra placa e armazenado no freezer.

## **2.5 Indexação dos fragmentos de DNA**

A indexação foi realizada para permitir a identificação individual de cada amostra no sequenciamento. Para essa etapa, foi adicionado em cada poço 2 µL de index 1, 2 µL de index 2, 12,5 de GoTaq® Green MasterMix (Promega), 6,5 µL de água ultrapura DNase free e 2 µL de DNA.

Após a indexação, foi realizada uma nova PCR com um ciclo térmico de 180s a 95° C, 30 segundos a 95° C, 8 ciclos de 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 72° C e um ciclo com 300 segundos a 72° C. A purificação desse novo produto da PCR foi realizada seguindo as etapas de purificação já mencionadas anteriormente.

Posterior a purificação, foi realizada uma eletroforese com o objetivo de isolar o fragmento alvo

## **2.6 Purificação de fragmentos do gel**

Após a eletroforese, o produto obtido que apresentava bandas próximas a 500 pares de base foi extraído, armazenado em 2 eppendorfs e pesado. A purificação foi realizada utilizando o protocolo da Promega.

Foram adicionados aos tubos, 230 $\mu$ L e 300 $\mu$ L de Membrane Binding Solution em cada tubo de acordo com a massa de cada um, que foi incubado a 65°C por 15 minutos. O gel dissolvido foi transferido para a mini coluna e centrifugado a 16.000xg por 1 minuto. O filtrado foi descartado e foi adicionado 500  $\mu$ L de Membrana Wash Solution. A centrifugação foi realizada novamente por 6 minutos. A mini coluna foi transferida para um eppendorf, onde foi adicionada 40  $\mu$ L de nuclease free water, centrifugada por 1 minuto. A coluna foi descartada e o produto restante dos dois eppendorfs foram adicionadas em um único tubo. O produto de todo esse processo foi quantificado.

## **2.7 Preparo da biblioteca**

Para o preparo da biblioteca para o sequenciamento MiSeq®, foi adicionado em um tubo 10  $\mu$ L do pool de DNA a 2 nM, e adicionado 23,3  $\mu$ L de Hybridization Buffer para obter a concentração de 0,6 nM. Adicionar 1  $\mu$ L de PhIX diluído e 29  $\mu$ L da solução com DNA. Após isso, adicionar 270  $\mu$ L de KLD, vortexar e centrifugar por 3 segundos.

## **2.8 Sequenciamento**

Para a corrida de sequenciamento, foi utilizado o MiSeq (Illumina). Seguindo o protocolo, foi adicionado ao reservatório identificado ao Library 250  $\mu$ L da biblioteca anteriormente preparada.

## **2.9 Análise do sequenciamento**

O DNA extraído foi analisado pelo software QIIME2 para processar os dados do sequenciamento 16S rRNA. Os arquivos FASTQ foram importados no QIIME2, com controle

de qualidade das sequências, junção de pares de reads, filtragem de sequências ruins e geração de ASVs (Amplicon Sequence Variants) pelo DADA2.

Para a análise de diversidade, foi calculado o alfa-diversidade pelo índice Faith's PD (Faith Phylogenetic Diversity) com o objetivo de analisar a diversidade filogenética dentro de cada amostra, com rarefação em 5000 sequências para padronização. Para beta-diversidade utilizou Bray-Curtis com PCA para visualizar se havia diferenças na composição da microbiota entre os bairros estudados. Os resultados foram exportados para o R para elaboração dos gráficos finais de Faith PD e PCA 3D. A baixa quantidade de DNA em algumas amostras e o número desigual por local de coleta limitaram a identificação detalhada da microbiota do mosquito vetor.

### 3. RESULTADOS

O gráfico (figura 4) apresenta o índice de diversidade alfa, conhecido como *Faith's Phylogenetic Diversity*, por meio dele podemos comparar a diversidade filogenética existente entre as diferentes amostras coletadas nos bairros de Barcelos.

Por meio dele podemos medir quão diversa é a comunidade de microrganismos na amostra quando se trata da sua árvore filogenética. Nele duas amostras com o mesmo número de espécies, podem expressar diferentes valores de Faith's PD, caso uma das amostras apresente espécies mais distante evolutivamente do que na outra. Quanto mais alto o valor de *faith\_pd*, mais espécies filogeneticamente distantes terá na amostra. Logo, quanto menor o valor, menos diversa filogeneticamente a comunidade será.

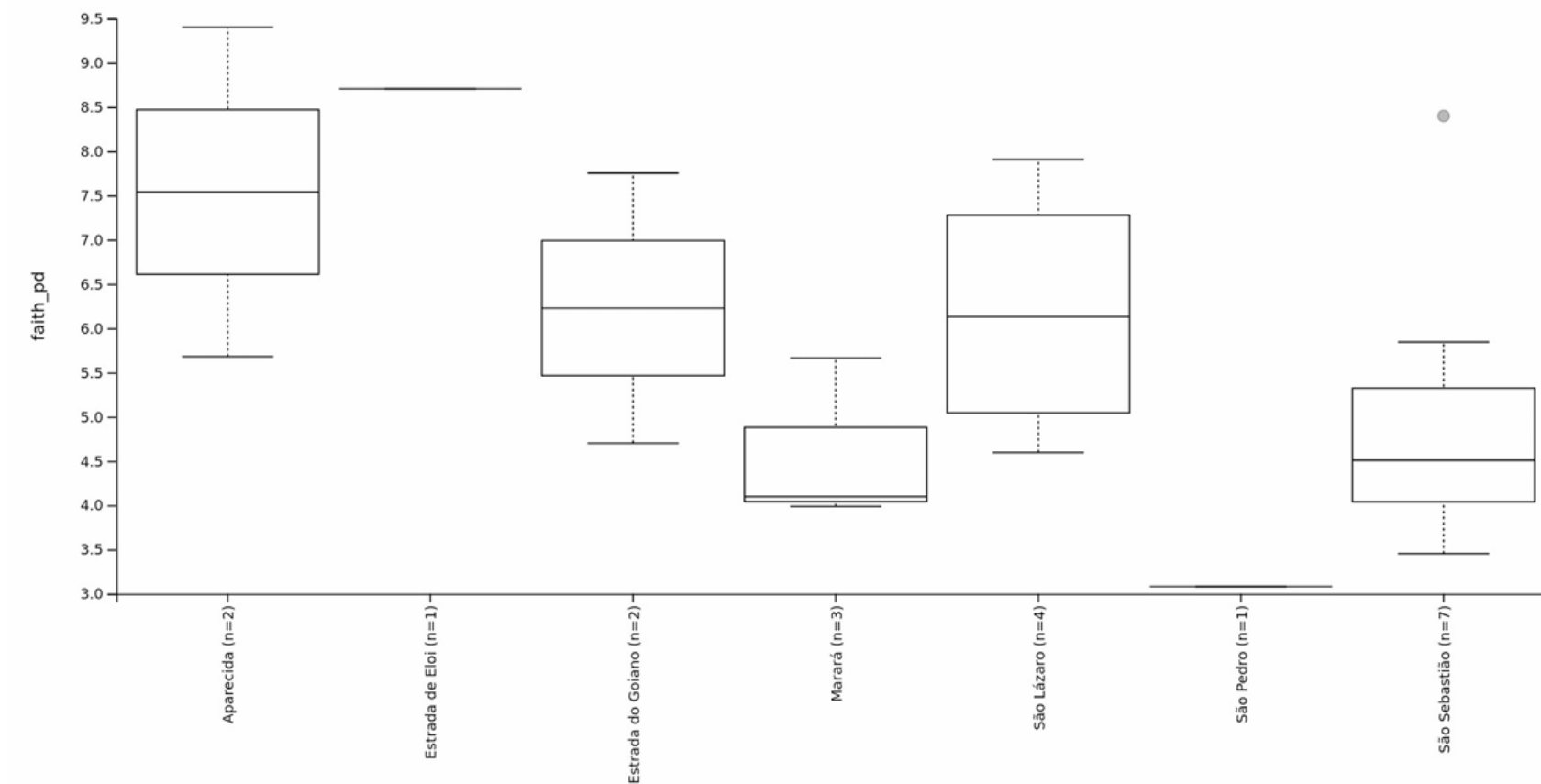
Ao analisarmos os valores do índice gerados pela análise podemos observar que os bairros de Aparecida (n=2) e na Estrada de Elói (n=1) apresentaram as maiores estimativas, com valores entre 7,5 e 8,5, respectivamente, o que sugere que as comunidades microbianas são mais diversas nessas áreas.

Já São Lázaro (n=4) e a Estrada do Goiano (n=2) apresentaram valores intermediários de diversidade, com uma mediana próxima a 6,0 e uma ampla variação entre as amostras, o que indica uma diversidade moderada a elevada.

Houve regiões com baixa diversidade filogenética, como Marara (n=3) e São Pedro (n=1), que exibiram medianas próximas de 4,0 e 3,0.

São Sebastião (n=7) apresentou uma mediana em torno de 4,5 e uma dispersão de valores moderada, o que indicou uma diversidade filogenética intermediária em relação as outras regiões.

Figura 4 : Indica a diversidade filogenética por local de coleta entre a microbiota presente em cada amostra de larvas de *Anopheles darlingi*.



Fonte: elaborada pelo autor

A Análise de Componentes Principais (PCA) também foi realizada (figura 5), ela mostra como as amostras de diferentes localidades se distribuem em eixos que resumem a variação de dados. Cada ponto representa uma amostra e a sua cor representa o local de coleta. Os eixos (Axis 1, Axis 2 e Axis 3) representam combinações lineares das variáveis originais e explicam uma porcentagem da variação de dados: o eixo 1 explica cerca de 30,93%, o eixo 2 cerca 17,21% e o eixo 3 cerca de 8,24%. Quanto mais próximas as amostras no gráfico mais semelhante é o seu perfil, ou seja, no caso, mais semelhante é a composição da microbiota.

A análise do PCA mostrou uma separação das amostras ao longo do Eixo 1 (30,93% da variação explicada) com as amostras de São Sebastião se agrupando distante das outras localidades estudadas, que estão no lado oposto.

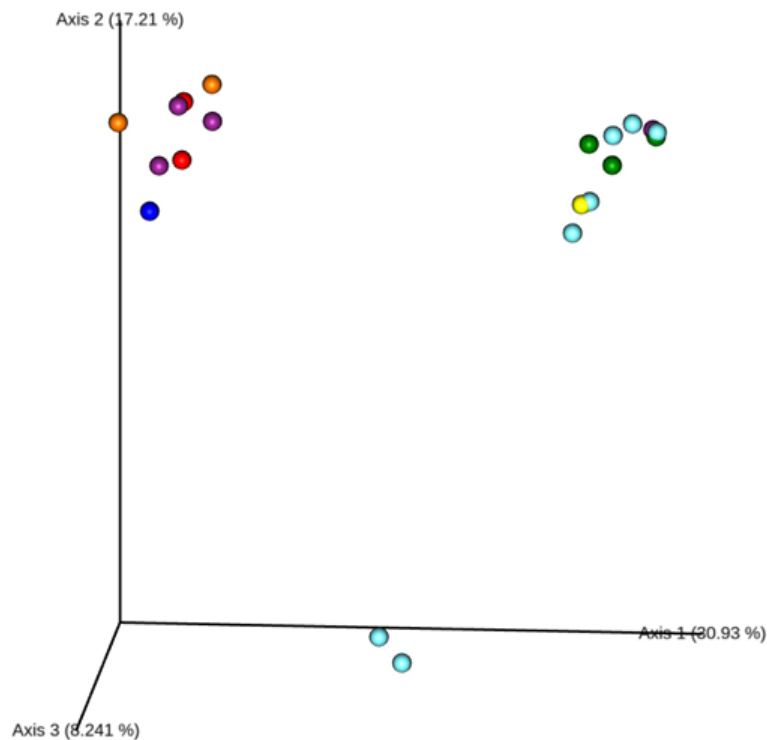


Figura 5: **Análise dos Componentes Principais (PCA)**. Cada cor representa uma região em que foi coletada as larvas, o vermelho representa Aparecida, o azul representa a Estrada de Eloi, o laranja representa a Estrada do Goiano, o verde representa Marara, o roxo representa São Lázaro e o amarelo representa São Pedro.

Fonte: elaborada pelo autor

As amostras de Aparecida, Estrada de Elói, Estrada do Goiano, Marará e São Lázaro se agruparam próximas, indicando um perfil de comunidade semelhante, enquanto São Pedro se

encontrou mais isolada ao longo do Eixo 3, o que sugere uma composição diferente em relação aos outros locais.

#### 4. DISCUSSÃO

Os dados obtidos pela análise metagenômica das amostras de larvas de *Anopheles darlingi* coletadas no município de Barcelos revelaram um gradiente de diversidade filogenética entre as localidades amostradas. As regiões de Aparecida e Estrada de Elói apresentaram os maiores valores do índice Faith's Phylogenetic Diversity (Faith PD), sugerindo comunidades microbianas larvais mais ricas, enquanto Marará e São Pedro exibiram menor diversidade, com São Lázaro, Estrada do Goiano e São Sebastião ocupando posições intermediárias.

Apesar desses padrões, o número desigual de amostras por localidade e a exclusão de algumas devido à baixa qualidade do DNA limitam a robustez das estimativas de diversidade e as comparações inter-regionais. Assim, os resultados devem ser interpretados com cautela, destacando a necessidade de maior número de amostras em estudos futuros.

A análise de componentes principais (PCA) evidenciou os achados anteriores, mostrando diferenças na composição beta da microbiota. As amostras de Aparecida, Estrada de Elói, Estrada do Goiano, Marará e São Lázaro agruparam-se em uma região próxima do espaço de ordenação, enquanto São Sebastião formou cluster separado e São Pedro posicionou-se de forma isolada.

Com as informações obtidas por meio do PCA, observa-se maior similaridade entre as comunidades microbianas de localidades geograficamente próximas ou com características ambientais semelhantes (Aparecida, Estrada de Elói, Estrada do Goiano, Marará e São Lázaro), possivelmente influenciada pela proximidade espacial, como ilustrado na Figura 6, na qual os locais de coleta estão marcados e relacionados às amostras analisadas. Esse padrão tem sido descrito em estudos de microbiota de vetores na Amazônia. Em contraste, a distinção de São Sebastião e São Pedro pode refletir maior distanciamento geográfico ou diferenças ambientais, embora as coordenadas exatas não tenham sido analisadas quantitativamente neste trabalho.

Em conjunto, os resultados demonstram variação espacial na diversidade filogenética (alfa) e composição (beta) da microbiota larval de *A. darlingi* em Barcelos, enfatizando a heterogeneidade dos criadouros aquáticos na ecologia microbiana do vetor principal de malária na região. Contudo, a identificação taxonômica detalhada das comunidades bacterianas não foi possível, limitada pela qualidade variável do DNA extraído (suficiente apenas para uma análise) e pelo número desigual de amostras por localidade. Estudos futuros poderiam superar essas

restrições com sequenciamento shotgun ou maior número de réplicas, permitindo correlacionar táxons específicos à competência vetorial.

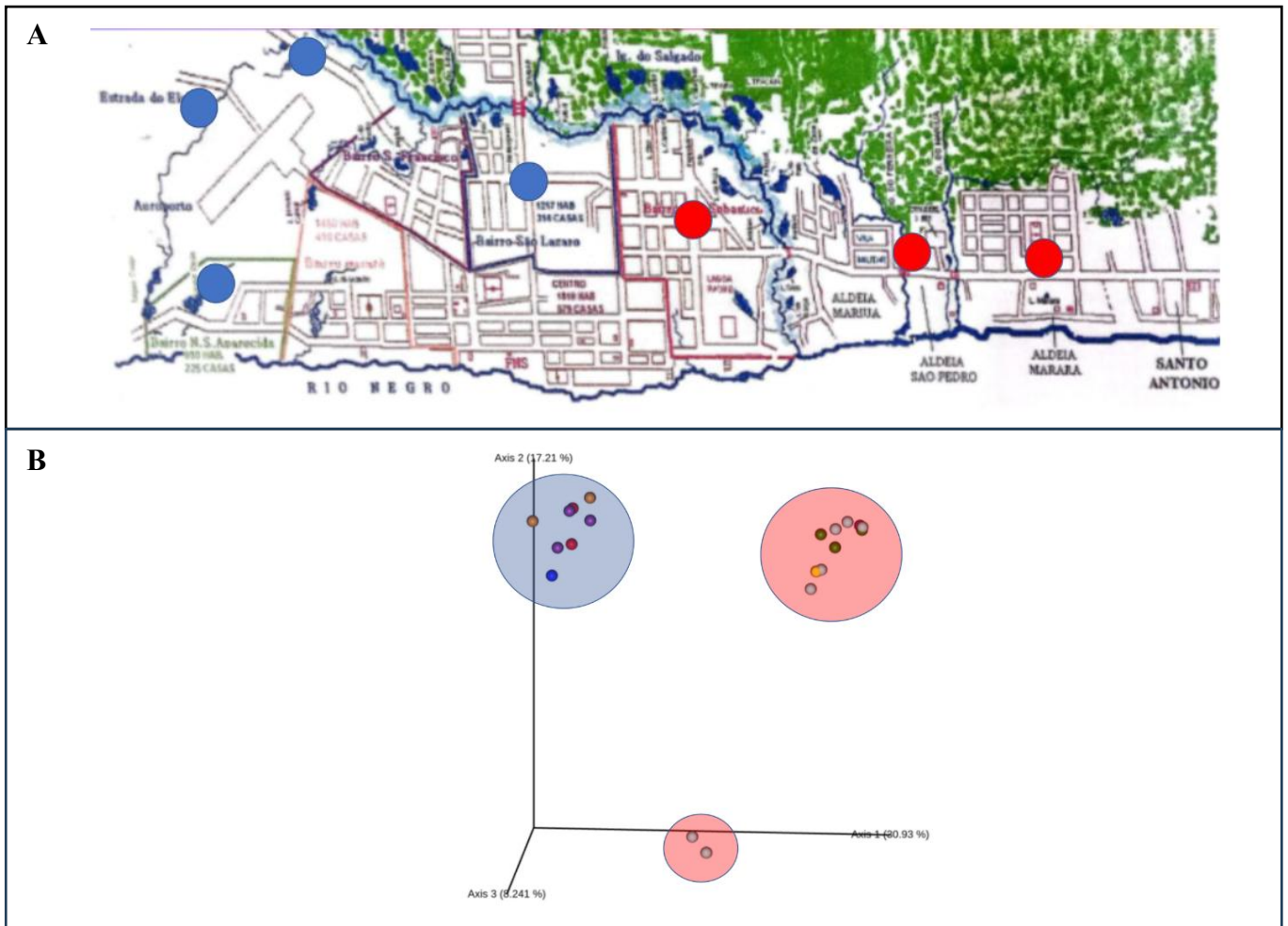


Figura 6 : A) Mapa de Barcelos indicando por círculos azuis e vermelhos os locais de coleta das larvas do *Anopheles darlingi*. B) PCA com círculos maiores em vermelho e azul envolta das amostras, relacionando a análise de PCA com os bairros em que foram realizadas as coletas.

Fonte: elaborada pelo autor.

## 5. CONCLUSÃO

O estudo da composição da microbiota das larvas do *Anopheles darlingi* coletada em oito locais de Barcelos (AM) revelou uma alta diversidade filogenética em Aparecida e Estrada de Elói e menores em Marará e São Pedro. A análise de componentes principais (PCA) demonstrou que existem diferentes taxonômicas da microbiota, com a presença de agrupamentos em localidade próximas e a separação em locais mais distante, como São Sebastiao e São Pedro. Isso indica que os fatores ambientais podem influenciar na formação e composição da microbiota larval de vetores da doença. Apesar das limitações presentes, os resultados mostram uma heterogeneidade microbiana em *A. darlingi* no contexto endêmico amazônico. Por meio deste estudo, é possível compreender a variação espacial da microbiota vetorial, oferecendo subsídios para investigações futura sobre a relação entre comunidades microbianas, características dos habitats e o potencial de transmissão da malária. Através disso, é possível criar ferramentas de controle e vigilância mais eficazes no combate à malária no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. **Malária**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/malaria>. Acesso em: 7 out. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Inteligência Epidemiológica e Vigilância Genômica. *Malária*. Atualizado em: 18 nov. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/cnie/painel-malaria>. Acesso em: 3 nov. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária*. Ano de referência: 2024, atualizado em: 02 set. 2025. Arquivo em PDF. Acesso em: 3 nov. 2025.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Barcelos (AM) – *Panorama*. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/barcelos/panorama>. Acesso em: 3 nov. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Guia de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 76 p. ISBN 978-85-334-2754-9. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/malaria/tratamento/guia\\_tratamento\\_malaria\\_2nov21\\_isbn\\_site.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/malaria/tratamento/guia_tratamento_malaria_2nov21_isbn_site.pdf/view)
- BASTOS, Alexandre Augusto Santos *et al.* O Perfil epidemiológico de internações e óbitos por malária no Brasil, entre 2013 e 2023. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 9, p. 2102–2116, 10 set. 2024.
- CANSADO-UTRILLA, Cintia *et al.* The microbiome and mosquito vectorial capacity: rich potential for discovery and translation. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 111, 18 maio 2021.
- DA SILVA, Amanda Gonzalez *et al.* Tips and tools to obtain and assess mosquito viromes. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 3, p. 132, 1 mar. 2024.
- DOS SANTOS, Fátima *et al.* Characterization of larval habitats of Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi and associated species in malaria areas in western Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 119, p. e240116, 2024.
- FEREIRA, Marcelo U. **Parasitologia Contemporânea**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020. *E-book*. p.25. ISBN 9788527737166. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527737166/>. Acesso em: 7 out. 2025.
- GARCIA, Klauss Kleydmann Sabino *et al.* Malaria time series in the extra-Amazon region of Brazil: epidemiological scenario and a two-year prediction model. **Malaria Journal**, v. 21, n. 1, p. 157, 31 maio 2022.
- HOOKS, Katarzyna B.; O'MALLEY, Maureen A. Dysbiosis and Its Discontents. **mBio**, v. 8, n. 5, p. e01492-17, 10 out. 2017.

IEBBA, Valerio *et al.* Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. **The New Microbiologica**, v. 39, n. 1, p. 1–12, jan. 2016.

IMWONG, Mallika *et al.* Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 7, p. 927–933, 1 abr. 2007.

MARTINS, Yuri Chaves *et al.* The Relationship Between Malaria and Pain: A Mini-Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 2, p. 264–268, 6 ago. 2025.

MOUTINHO, Paulo Rufalco *et al.* Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. **Malaria Journal**, v. 10, p. 174, 24 jun. 2011.

PINA-COSTA, Anielle de *et al.* Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 618–633, 2014.

**PLASMODIUM SP. – Atlas de Parasitologia.** , [S.d.]. Disponível em: <<https://www.unifal-mg.edu.br/atlasdeparasitologia/plasmodium/>>. Acesso em: 28 nov. 2025

POPKES, Miriam; VALENZANO, Dario Riccardo. Microbiota–host interactions shape ageing dynamics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 375, n. 1808, p. 20190596, 28 set. 2020.

REY, Luís. **Parasitologia, 4ª edição.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. *E-book*. p.729. ISBN 978-85-277-2027-4. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-2027-4/>. Acesso em: 12 dez. 2025.

ROMOLI, Ottavia; GENDRIN, Mathilde. The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and *Plasmodium*. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 200, 20 mar. 2018.

SANTOS, Najara Akira Costa Dos *et al.* Bacterial Microbiota from Lab-Reared and Field-Captured *Anopheles darlingi* Midgut and Salivary Gland. **Microorganisms**, v. 11, n. 5, p. 1145, 28 abr. 2023.

SATO, Shigeharu. *Plasmodium*-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 40, n. 1, p. 1, 7 jan. 2021.

SU, Xin-Zhuan *et al.* *Plasmodium* Genomics and Genetics: New Insights into Malaria Pathogenesis, Drug Resistance, Epidemiology, and Evolution. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. e00019-19, 18 set. 2019.

TRAMPUZ, Andrej *et al.* Clinical review: Severe malaria. **Critical Care**, v. 7, n. 4, p. 315, 14 abr. 2003.

VILLEGAS, Luis Martínez; PIMENTA, Paulo Filemon Paolucci. Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 672–684, 2014.

WHITE, Nicholas J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 10, p. 297, 11 out. 2011.