

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO – MCTI
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA – PPGENT

MALÁRIA NO MARANHÃO: ASPECTOS BIOECOLÓGICOS
DE ESPÉCIES DE *ANOPHELES* MEIGEN, 1818 E DINÂMICA
DE TRANSMISSÃO NOS MUNICÍPIOS DE BURITICUPU E
SÃO JOSÉ DE RIBAMAR.

Vera Lúcia Lopes de Barros

Manaus – Amazonas

2012

VERA LÚCIA LOPES DE BARROS

MALÁRIA NO MARANHÃO: ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DE ESPÉCIES DE *ANOPHELES* MEIGEN, 1818 E DINÂMICA DE TRANSMISSÃO NOS MUNICÍPIOS DE BURITICUPU E SÃO JOSÉ DE RIBAMAR.

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Entomologia.

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei,
Co-orientador: Dr. Antônio Rafael da Silva,

Manaus, AM

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS.
TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – INPA Instituto Nacional de
Pesquisa da Amazônia

Bibliotecária responsável: INPA

B277

Vera Lúcia Lopes de Barros.

Malária no Maranhão: aspectos bioecológicos de espécies de
Anopheles Meigen, 1818 e dinâmica de transmissão nos Municípios
de Buriticupu e São José de Ribamar.

Xv, 112 f.:il

Tese (doutorado) – INPA, Manaus, 2012.

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-orientador: Dr. Antônio Rafael da Silva

Área de concentração: Entomologia

1.*Anopheles*. 2.*Plasmodium* sp, 3.Malária, 4.Dinâmica de transmissão,
5.Maranhão.

Sinopse:

Malária no estado do Maranhão: aspectos bioecológicos das espécies
de *Anopheles* Meigen, 1818 e dinâmica de transmissão nos Municípios
de Buriticupu e São José de Ribamar.

Palavras chaves: *Anopheles*, *Plasmodium* sp, Malária, Dinâmica de
transmissão, Maranhão.

MALÁRIA NO MARANHÃO: ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DE ESPÉCIES DE *ANOPHELES* MEIGEN, 1818 E DINÂMICA DE TRANSMISSÃO NOS MUNICÍPIOS DE BURITICUPU E SÃO JOSÉ DE RIBAMAR.

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA)

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Rafael da Silva
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Banca examinadora:

Profa. Dra. Vera Margarete Scarpassa
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. (INPA)

Prof. Dr. Delsio Natal
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Jansen Fernandes Medeiros
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. (INPA)

Profa. Dra. Márcia Rubia da Silva Melo
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. (INPA)

Profa. Dra. Antônia Maria R. Fanco
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. (INPA)

Manaus, 27 de Agosto de 2012.

*Feliz é o homem que acha sabedoria, e o
homem que adquire entendimento.
Provérbios 3:13*

Dedico este trabalho a meus filhos Vagner e Samir, a minha irmã Ana Maria de Barros, que me ajudaram a enfrentar essa batalha longe deles. À memória de meu pai Luís Lopes da Silva e minha mãe Generosa Antônia de Barros.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Senhor e meu Deus. Que foi a razão de tudo acontecer. Responsável pela minha recuperação em momentos difíceis da minha saúde;
- Ao Cardiologista Jérsei que me atendeu corretamente e me proporcionou alívio e recuperação de uma crise cardíaca;
- À meu orientador, Dr. Wanderli Pedro Tadei pela orientação científica e força na execução do trabalho. Assistência na saúde e por tudo;
- À meu Co-orientador Dr. Antônio Rafael da Silva pela dedicação, atenção e paciência no acompanhamento do trabalho de campo, tabulação de dados e escrita da tese. Minha eterna gratidão por ter me concedido essa oportunidade;
- Ao Centro de Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Maranhão, onde tenho a maior honra de trabalhar e realizei as análises e identificação do material;
- À Rede de Malária pelo apoio na realização da PCR;
- Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia pelo apoio institucional durante o doutorado;
- Aos técnicos e amigos do laboratório de Entomologia Médica da FNS/MS e CRDIP-UFMA. Gildário Amorim Alves, Francisco das Chagas, José Augusto Vieira, Edilson Santos;
- Ao Professor Ricardo Barbieri responsável pelo laboratório de Limnologia da UFMA, pelo apoio durante a realização dos aspectos físicos e químicos da água;
- À Dra. Eloisa da Graça Gonçalves pelo apoio científico nas correções e tabulações de dados;
- Ao amigo Dr. Denílson da Silva Bezerra Professor de Botânica da UFMA;
- À Waléria Dasso Pinheiro e Monique pelo apoio durante a realização da PCR;
- À meu grande amigo Fábio Medeiros da Costa da Universidade Federal de Rondônia (UNIR) e Dr. Rodrigo da Embrapa Porto Velho, Rondônia pelo apoio científico e análise estatística;
- À minha irmã Ana Maria de Barros por todo apoio familiar;
- Ao Dr. Elias Seixas Lorosa pelo apoio na Precipitina (FIOCRUZ-RJ).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de <i>Plasmodium</i> sp. no homem. Fonte: http://malariabrasil.blogspot.com.br/2011	20
Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> sp. no mosquito vetor. Fonte: Jacobs-Lorena (cortesia).	21
Figura 3 - Situação global da malária segundo risco de transmissão da doença. Fonte: WHO, 2011.	23
Figura 4 - Incidência dos casos de malária por 1.000 habitantes em (2006). Fonte: WHO, 2008.....	23
Figura 5 – Áreas de risco de transmissão da malária na Amazônia Legal do Brasil (2011), por município de notificação epidemiológica. Fonte: Ministério da Saúde, 2011.	25
Figura 6 - Distribuição global do gênero <i>Anopheles</i> . Fonte: WHO, 2012 http://www.who.int/research/en/ Acesso 2012.....	27
Figura 7 - Localização geográfica dos pontos de coleta em Buritizinho no município de Buriticupu (A) e de Guarapiranga no município de São José de Ribamar (B), Estado do Maranhão.	38
Figura 8 - Métodos de coletas utilizados em Buriticupu e São José de Ribamar: A – busca ativa de fêmeas pousadas sobre superfícies; B – captura com atração humana. Fonte: Barros, V. L. L (2012).	40
Figura 9 - Coletas de larvas nos criadouros, com o uso de concha entomológica....	41
Figura 10 - Representação gráfica da incidência das espécies de <i>Anopheles</i> nos ambientes intra, peri e extradomicílio, durante janeiro de 2006 a dezembro de 2011, Município de Buriticupu, Estado do Maranhão, Brasil.	56
Figura 11 - Representação gráfica da incidência das espécies de <i>Anopheles</i> nos ambientes intra e peridomicílio, durante janeiro de 2006 a dezembro de 2011, município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, Brasil.....	59
Figura 12 - Frequência mensal de adultos <i>A. darlingi</i> correlacionada positivamente com a precipitação ($P \leq 0,05$) no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2006-2011.	61
Figura 13 - Frequência mensal entre adultos de <i>A. albitarsis</i> e <i>A. aquasalis</i> correlacionadas positivamente com a precipitação ($P \leq 0,05$) no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, 2006-2011.	64
Figura 14 - <i>Nested</i> -PCR para fonte alimentar sanguínea para <i>Anopheles darlingi</i> alimentado em humano no intradomicílio em Buriticupu, Estado do Maranhão, Brasil, 2011.	73
Figura 15 - <i>Nested</i> -PCR para <i>Plasmodium vivax</i> em Buriticupu, Estado do Maranhão, com amostras de <i>Anopheles</i> sp., 2010 a 2011.	76
Figura 16 - <i>Nested</i> -PCR para <i>P. falciparum</i> por meio da técnica de PCR em Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 a 2011.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de <i>Anopheles</i> spp. adultos nos diferentes ambientes domiciliares no município de Buriticupu, Estado do Maranhão.	40
Tabela 2 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de <i>Anopheles</i> spp. adultos nos diferentes ambientes domiciliares no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão.	40
Tabela 3 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das formas imaturas do gênero <i>Anopheles</i> spp. no ambiente extradomiciliar no município de Buriticupu, Estado do Maranhão.	41
Tabela 4 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das formas imaturas de <i>Anopheles</i> spp. no ambiente peridomicílio no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão.	41
Tabela 5 - Ordem de iniciadores específicos de cada grupo utilizados na análise. ...	46
Tabela 6 - Sequência dos iniciadores para o gênero <i>Plasmodium</i> ssp, usando primers para região 18S do RNA ribossomal.....	48
Tabela 7 - Incidência das espécies de <i>Anopheles</i> spp. coletadas, por horário, no intradomicílio, município de Buriticupu, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.	52
Tabela 8 - Incidência mensal das espécies de <i>Anopheles</i> spp. coletadas no intradomicílio, município de Buriticupu, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.	52
Tabela 9 - Incidência das espécies de <i>Anopheles</i> spp. coletadas, por horário, no peridomicílio, do município de Buriticupu, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.	53
Tabela 10 - Incidência mensal das espécies de <i>Anopheles</i> spp. coletadas no peridomicílio do município de Buriticupu no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.	54
Tabela 11 - Incidência das espécies de <i>Anopheles</i> spp. coletadas, por horário, no extradomicílio do município de Buriticupu, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.	54
Tabela 12 - Incidência mensal das espécies de <i>Anopheles</i> spp. coletadas no extradomicílio do município de Buriticupu, no período de janeiro 2006 a dezembro de 2011.	54
Tabela 13 - Incidência das espécies de <i>Anopheles</i> spp. capturadas nos três ambientes, município de Buriticupu, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.	55
Tabela 14 - Incidência das espécies de <i>Anopheles</i> spp. no estágio imaturo coletadas em criadouros no município de Buriticupu, de janeiro a dezembro de 2009.	57
Tabela 15 - Incidência das espécies de <i>Anopheles</i> spp. coletadas, por horário, no peridomicílio, município de São José de Ribamar, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.	57
Tabela 16 - Incidência mensal das espécies de <i>Anopheles</i> spp. coletadas no peridomicílio do município de São José do Maranhão, no período de janeiro 2006 a dezembro de 2011.	58
Tabela 17 - Incidência das espécies de <i>Anopheles</i> spp. capturadas em dois ambientes, município de São José de Ribamar, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.	58

Tabela 18 - Incidência das espécies de <i>Anopheles</i> no estágio imaturo coletadas em criadouros no município de São José de Ribamar, de janeiro a junho de 2007.....	60
Tabela 19 - Estimativas de correlação parcial entre fatores climáticos e ocorrência de adultos das espécies de <i>Anopheles</i> spp. no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2006-2011.....	61
Tabela 20 - Estimativas de correlação parcial entre adultos das espécies de <i>Anopheles</i> spp. (coexistência) no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2006-2011.....	62
Tabela 21 - Valores da frequência média de mosquitos do gênero <i>Anopheles</i> spp. por ambientes no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2006 a 2011.....	62
Tabela 22 - Estimativas de correlação parcial entre fatores climáticos e ocorrência de adultos das espécies de <i>Anopheles</i> spp. no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, 2006-2011.....	63
Tabela 23 - Estimativas de correlação parcial entre espécies adultas de <i>Anopheles</i> spp. (coexistência) no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, 2006-2011.....	65
Tabela 24 - Valores de frequência média de mosquitos do gênero <i>Anopheles</i> spp. por ambientes no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, 2006 a 2011.....	65
Tabela 25 - Valores de frequência média de imaturos de espécies de <i>Anopheles</i> spp., riqueza e abundância entre os municípios de Buriticupu e São José de Ribamar, Estado do Maranhão, 2007-2009.....	65
Tabela 26 - Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas em criadouros em Buriticupu e São José de Ribamar em setembro de 2007.....	67
Tabela 27 - Lista de Macrófitas aquáticas coletadas em Buriticupu e São José de Ribamar, Estado do Maranhão, Brasil.....	68
Tabela 28 - Dados da reação simples da precipitina para análise da preferência alimentar de <i>A. darlingi</i> e <i>A. aquasalis</i> capturados nos ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e extradomiciliar no município de Buriticupu, Estado do Maranhão de 2007 a 2009.....	70
Tabela 29 - Dados da reação dupla da precipitina para análise da preferência alimentar de <i>A. darlingi</i> e <i>A. aquasalis</i> capturados nos ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e extradomiciliar no município de Buriticupu, Estado do Maranhão de 2007 a 2009.....	71
Tabela 30 - Preferência alimentar do <i>A. aquasalis</i> coletados de 2006 à 2007 nos ambientes intra e peridomicílio, na localidade de Guarapiranga município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão.....	72
Tabela 31 - Análise por PCR da preferência alimentar sanguínea das espécies de <i>Anopheles</i> coletadas em 2011, nos ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e extradomiciliar no município de Buriticupu, Estado do Maranhão.....	73
Tabela 32 - Espécies de anofelinos analisados por horário de atividade hematofágica e positividade para <i>Plasmodium</i> spp. detectados pela técnica da PCR no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 e 2011.....	74
Tabela 33 - Espécies de anofelinos analisados por horário de atividade hematofágica, ambiente e positividade para <i>Plasmodium</i> spp. detectados pela técnica da PCR no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 e 2011.....	75
Tabela 34 - Total de mosquitos analisados por espécies de anofelinos e as respectivas amostras positivas para <i>Plasmodium vivax</i> pela técnica de PCR em Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 a 2011.....	76

Tabela 35 - Total de mosquitos analisados por espécies de anofelinos e as respectivas amostras positivos para <i>Plasmodium falciparum</i> pela técnica de PCR em Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 a 2011.	76
Tabela 36 - Resultado de infecção mista por <i>Plasmodium vivax</i> e <i>Plasmodium falciparum</i> em <i>A. oswaldoi</i> analisados pela técnica de PCR em Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 a 2011.	77

RESUMO

No presente trabalho foram realizados estudos entomológicos nos municípios de Buriticupu e São José de Ribamar, no estado do Maranhão, objetivando conhecer parâmetros entomológicos, relacionados com a dinâmica de transmissão da malária e seu controle. Coletas de mosquitos foram realizadas no intra, peri e extradomicílio das 18h às 06h, no período de 2006 a 2011. Realizaram-se também coletas das formas imaturas e foram obtidos dados sobre densidade das espécies de anofelinos, diversidade de macrófitas e dados limnológicos, com ênfase nos aspectos físico e químicos da água. Os alados foram analisados quanto à infecção por plasmódio e quanto ao diagnóstico do sangue ingerido. No município de Buriticupu foram coletadas nove espécies e 2.832 exemplares no total. Considerando as espécies mais frequentes, *Anopheles darlingi* representou 63,59% da amostra, *Anopheles albitarsis lato sensu* 22,96% e *Anopheles oswaldoi* 5,67%. Quando se considera as coletas no intra, no peri e no extradomicílio verifica-se que as três espécies mostraram percentuais muito próximos, nos três ambientes, respectivamente, cerca de 23%, 53% e 22%. Na área litorânea de São José de Ribamar foram coletados apenas 75 exemplares de adultos, sendo 35 exemplares de *A. aquasalis*, 23 de *A. albitarsis lato sensu* e cinco de *A. darlingi*. Em relação às formas imaturas, em Buriticupu foram capturados 130 espécimes e *A. darlingi* representou 60% da amostragem e *A. albitarsis lato sensu* 24,61%. Em São José de Ribamar foram capturadas 62 larvas sendo 61,29% de *A. aquasalis* e 22,59% de *A. albitarsis*. Os dados da preferência alimentar mostraram que *A. darlingi* e *A. aquasalis* tinham maior relação com o hospedeiro humano. Os resultados da PCR foram positivos para *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* e foram detectados espécimes infectados de *A. darlingi*, *A. albitarsis lato sensu*, *A. oswaldoi* e *A. nuneztovari*. Os valores da Taxa Mínima de Infecção (TMI) das quatro espécies foram 2,8, 2,2, 4,6 e 8,3, respectivamente. Considerando-se as duas localidades estudadas, *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. albitarsis lato sensu* e *A. oswaldoi* foram encontradas predominantemente no peridomicílio e mostraram comportamento de antropofilia e zoofilia. Estas espécies mostraram comportamento eclético entre os hospedeiros. Na Ilha de São Luis a densidade de *Anopheles* foi baixa, mas a área é endêmica da doença e a presença de *A. darlingi* foi novamente detectada, após ter sido registrada em 1940. Na caracterização dos criadouros, quanto à vegetação associada, detectaram-se cinco gêneros em cada município, sendo apenas o gênero *Nymphaea* comum às duas localidades.

ABSTRACT

Entomological studies were conducted, based on data from the municipalities of San Jose and Buriticupu Ribamar, in the state of Maranhão, in order to equate entomological parameters related to the dynamics of malaria transmission and control. Collections of mosquitoes were performed in intra, peri and extradomicílio from 18h to 06h, in the period 2006 to 2011. Also conducted sampling of immature forms and data were obtained on density of *Anopheles* species, diversity of macrophytes and limnological data, with emphasis on physical and chemical aspects of the water. The mosquitoes were analyzed for infection by the plasmodium and the diagnosis of blood ingested. In the city of Buriticupu nine species were collected and 2,832 copies in total. Considering the most frequent species, *Anopheles darlingi* accounted for 63.59% of the sample, 22.96% *Anopheles albitarsis latus senso* and *Anopheles oswaldoi* 5.67%. When one considers the collections in intra, peri and extradomicílio it appears that the three species showed very similar percentages in all three environments, respectively, about 23%, 53% and 22%. In the coastal area of San José de Ribamar were collected only 75 specimens of adults, and 35 specimens of *A. aquasalis* 23 *A. albitarsis latus, senso* and 5 *A. darlingi*. Regarding immature, Buriticupu 130 specimens were captured and *A. darlingi* accounted for 60% of samples, and *A. albitarsis latus senso* 24.61%. In San José de Ribamar 62 larvae were captured with 61.29% of *A. aquasalis* and 22.59% of *A. albitarsis latus senso*. The data showed that dietary source *A. darlingi* and *A. aquasalis* had more relation with the human host. The PCR data were positive for *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, and were detected *A. darlingi*, *A. albitarsis latus senso*, *A. oswaldoi* and *A. nuneztovari* infected species. The values of Minimum Rate of Infection of the four species were 2.8, 2.2, 4.6 and 8.3, respectively. Considering the two localities studied, *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. albitarsis latus senso* and *A. oswaldoi* were found predominantly in animal sheds and showed anthropophilic and zoophilic behavior. These species showed among hosts eclectic behavior. The *Anopheles* density on São Luis island was low, but the area is endemic for the disease and the presence of *A. darlingi* in Guarapiranga was detected again after had been recorded in 1940. In the characterization of breeding, as the associated vegetation, five genera were detected in each municipality, only the genus *Nymphaea* common both sites.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Família Culicidae.....	16
1.2 Estudos entomológicos	18
1.3 Malária e espécies de <i>Anopheles</i> vetores no Brasil e no mundo	19
1.4 Malária e espécies de <i>Anopheles</i> incriminadas como vetores no Estado do Maranhão	29
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	36
3.1 Geral.....	36
3.2 Específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Área de Estudo.....	38
4.2 Descrição dos procedimentos:	38
4.2.1 Flutuação sazonal e densidade de <i>Anopheles</i> sp.	38
4.2.2 Coletas de imaturos de anofelinos	40
4.2.3 Análises da água dos criadouros	41
4.2.4 Determinação das espécies de vegetais aquáticas nos criadouros	43
4.2.5 Preferência alimentar sanguínea de <i>Anopheles</i> em diferentes ambientes.	44
4.2.6. Análise da taxa de infecção natural de anofelinos, por espécies de <i>Plasmodium</i> spp.....	46
4.3 Análises estatísticas	49
5. RESULTADOS	51
5.1 Município de Buriticupu	51
5.1.1 Coletas de adultos.....	51
5.1.2 Coletas de imaturos	56
5.2 Município de São José de Ribamar.....	57
5.2.1 Coletas de adultos.....	57
5.2.2 Coletas de imaturos	59
5.3 Análises estatísticas de correlações de adultos e imaturos de	60
<i>Anopheles</i> spp.....	60
5.3.1 Município de Buriticupu	60
5.3.2 Município de São José de Ribamar	63

5.4 Análises limnológicas em criadouros de Buriticupu e São José de Ribamar .	66
5.5 Macrófitas aquáticas.....	67
5.5.1 Preferência alimentar sanguínea de <i>Anopheles</i> spp. em diferentes ambientes.....	68
5.5.2 Análise por meio do teste da Precipitina	68
5.5.3 Análise por meio da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	72
5.6 Análise da infecção natural por <i>Plasmodium</i> spp.....	73
6. DISCUSSÃO	79
8. CONCLUSÕES	89
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
10. ANEXOS.....	106
10.1 Vegetais identificados na localidade de Buritizinho, Município de Buriticupu	106
10.2 Vegetais identificados na localidade Guarapiranga, município de São José de Ribamar.....	109
10.3 Manejo ambiental de criadouro em Gurapiranga	112

I. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família Culicidae

Os mosquitos pertencem à Ordem Diptera e à Família Culicidae e são conhecidos popularmente como pernilongos, muriçocas ou carapanãs. Os adultos são alados e de vida terrestre, possuem pernas e antenas longas e são, na maioria, hematófagos, enquanto que as fases imaturas são aquáticas e alimentam-se de microorganismos planctônicos e matéria orgânica. O ciclo biológico dos mosquitos, assim como todos os Diptera, é holometábolo, compreendendo os estágios de ovo, larva, pupa e adulto (Consoli e Lorenço-de-Oliveira, 1994).

As coleções aquáticas onde se desenvolvem as larvas dos mosquitos são também chamadas de criadouros (*Breeding sites* – no inglês). Nesses ambientes, a fêmea adulta realiza a oviposição e, subsequentemente, as larvas se desenvolvem até a emergência dos adultos. Desta forma, tanto os ovos como larvas e pupas ocupam o mesmo ecótopo, cuja natureza e conhecimento revestem-se de elevado interesse epidemiológico (Forattini, 2002).

Em decorrência de eficientes mecanismos de adaptação e evolução, os mosquitos adquiriram a capacidade de se desenvolver nos mais variados ambientes aquáticos, em amplo espectro de condições bióticas e abióticas. Esse apreciável valor de adaptação à diversas condições, traduz-se pela multiplicidade de ambientes para o desenvolvimento das formas imaturas (Becker, 1989). Este ecletismo lhes permite resultados positivos de sobrevivência, inclusive em meios modificados pelos humanos (Forattini, 2002).

Os parâmetros limnológicos dos criadouros, ou seja, os aspectos físicos e químicos da água podem interferir na presença ou ausência do mosquito. A detecção de formas imaturas de *Anopheles* Meigen 1818 desenvolvendo em recipientes artificiais fora do ambiente de laboratório é considerada inusitada e por esse motivo pode ser considerado de importância epidemiológica.

Os imaturos (larvas) de mosquitos, de modo geral, se desenvolvem em criadouros naturais e artificiais. Os naturais constituem aqueles ambientes que acumulam água das chuvas como poças de água, buracos e troncos de árvores,

entre outros, os quais são considerados de pequeno porte. Já os de grande porte como lagos, lagoas, remansos de rios e áreas alagadas, que sofrem influência de pulsos de enchentes e de vazante, são também exemplos de criadouros naturais. Consideram-se criadouros artificiais aqueles construídos ou produzidos pela atividade humana na exploração de recursos naturais, despejos de dejetos ou aqueles oriundos do consumo de produtos manufaturados. São exemplos de criadouros artificiais os açudes, as barragens, os tanques de piscicultura, caixas d'água, cisternas, bueiros, caixas de empréstimos em rodovias, copos, latas, garrafas, entre outros, que possam acumular água e possuam condições ideais para a oviposição e desenvolvimento das formas imaturas até a emergência dos alados (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002;).

Os anofelinos preferencialmente ocupam grandes criadouros, geralmente os naturais como lagos, lagoas, remansos de rios e áreas alagadas, que sofrem pulsos de enchentes e de vazante. No entanto, estes mosquitos também podem colonizar espaços de alterações ambientais provocadas pelo homem e se desenvolvem em criadouros artificiais como açudes, barragens e tanques de piscicultura, entre outros (Tadei, 2001; Tadei *et al.*, 2003; 2008).

Contudo, em relação a criadouros, são exceções os representantes do subgênero *Kerteszia* dentre os quais, *Anopheles homunculus* Komp 1937, *Anopheles bellator* Dyar & Knab 1906 e *Anopheles cruzii* Dyar & Knab 1908, que se utilizam de bromélias, enquanto *Anopheles bambusicolus* Komp 1937 adaptou-se aos internódios de bambu. Destes achados, pode-se mencionar *A. cruzii*, observado em vasos de barro na área de Paranaguá e a *A. bambusicolus* criando-se em pneus abandonados ou armadilhas para ovos (APO) em Foz do Iguaçu, Estado do Paraná (Luz *et al.*, 1987).

Forattini *et al.* (1998) observou o comportamento de anofelinos potencialmente vetores de *Plasmodium* sp. (agente etiológico da malária), no Estado de São Paulo, onde foram encontradas formas imaturas de anofelinos em recipientes artificiais. Duas espécies, *Anopheles bellator* e *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribáizaga 1878, ocorreram na localidade de Pedrinhas, no Município de Ilha Comprida, em criadouros experimentais instalados.

Dentre os culicídeos, o gênero *Anopheles* tem especial interesse médico por serem vetores do *Plasmodium* sp., causador da malária humana. No Brasil são registradas, até o momento, 57 espécies de *Anopheles*, pertencentes a cinco

subgêneros: *Anopheles* Meigen (1818); *Nyssorhynchus* Blanchard (1902); *Stethomyia* Theobald (1902); *Kerteszia* Theobald (1905); *Lophopodomomyia* Antunes (1937) (Deane, 1986; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

1.2 Estudos entomológicos

Os inquéritos entomológicos possibilitam o conhecimento da diversidade de espécies de anofelinos e analisar aquelas incriminadas na transmissão da malária, permitindo avaliar os fatores ambientais e biológicos que aumentam os riscos aos agravos da transmissão da doença (Tadei *et al.*, 1988; 1998; 2008).

No Brasil, dentre as espécies de anofelinos registradas (aproximadamente 57) apenas cinco têm envolvimento na transmissão da malária humana, segundo dados do Ministério da Saúde. Considerando o subgênero *Nyssorhynchus*, registra-se *Anopheles darlingi*, *Anopheles aquasalis* e *Anopheles albitarsis*. Já no subgênero *Kerteszia* considera-se *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator*. Vale ressaltar que o destaque é indicado para o *Anopheles darlingi* no interior, *Anopheles cruzii* na Serra do Mar e *Anopheles aquasalis* na área litorânea (Ministério da Saúde, 2008; Gomes *et al.*, 2008).

De acordo com Tadei *et al.* (1998) a densidade populacional de anofelinos na Amazônia sofre variação em diferentes épocas do ano, tanto para as formas adultas como para as formas imaturas. Esses autores apontam uma correlação da redução da densidade de anofelinos com o período do inverno amazônico, sendo mais evidente para as formas adultas do que as formas imaturas (Tadei *et al.*, 2003; 2010), uma vez que no período chuvoso os mosquitos são deslocados dos criadouros permanentes, da terra firme, para lagos e lagoas que se formam junto às margens dos rios, durante as enchentes. À medida que as águas sobem o nível das áreas alagadas originam os criadouros temporários localizados em meio à mata. (Tadei *et al.*, 1998; 2010).

Tadei *et al.* (1998, 2010) afirmam que a disponibilidade de abrigos ou criadouros na estação chuvosa facilita o aumento de sítios de reprodução e extensão da ocorrência de anofelinos, com reflexos na prevalência da malária, pois proporciona maior contato entre o homem e vetor. Isto decorre do fato que em regiões onde os criadouros permanentes estão distanciados das habitações humanas, na época das chuvas, pela formação de criadouros temporários, estes ficam próximos às habitações humanas intensificando o contato homem/vetor.

Os estudos acima corroboram Galvão *et al.* (1942), na cidade de Belém, Estado do Pará e Deane *et al.* (1948) levando em conta diferentes regiões da Amazônia, ambos consideraram que a intensa reprodução do *A. darlingi* no período das chuvas está associada aos inúmeros criadouros que se formam na região neste período, além da presença de *A. darlingi* associado à ação antrópica, que promove mudanças no habitat natural dos mosquitos.

O processo de acentuadas alterações ambientais, segundo Póvoa *et al.* (2003), no ambiente natural do município de Belém, condicionou o ressurgimento de *A. darlingi* a partir dos anos 90, após mais de vinte anos sem registro desta espécie nessa área. Com os impactos ambientais, ocorreu o surgimento de novos focos com possível influência no elenco de espécies locais e mudanças no padrão de distribuição, biologia e comportamento desses mosquitos.

Das várias funções da vigilância entomológica destaca-se: “promover a agilização” na identificação por meio de características morfológicas dos *Anopheles* sp. para a análise dos riscos epidemiológicos, com objetivo de proporcionar as intervenções oportunas, e orientar medidas de prevenção e controle através de análises específicas com qualidade das informações sobre vetores, para acompanhamento contínuo dos indicadores de controle. Além disso, a vigilância deseja agir com um olhar especial da área de saúde pública, visto que o registro dos casos autóctones aumenta a probabilidade de risco da reintrodução do *Plasmodium*, agente etiológico da malária em outras localidades (Silva *et al.*, 2009).

1.3 Malária e espécies de *Anopheles* vetores no Brasil e no mundo

O ciclo de vida do *Plasmodium* sp. é caracterizado por uma fase e assexuada endógena (esquizogônica), onde ocorre a multiplicação no homem (hospedeiro intermediário) em células parenquimatosas do fígado (esquizogonia hepática) ou nos eritrócitos (esquizogonia eritrocitária) e uma sexuada exógena (esporogônica), durante a mesma ocorre a multiplicação dos parasitos nos mosquitos do gênero *Anopheles* (hospedeiro definitivo) (Sinnis e Coppi 2007; Neves *et al.* 2005).

A Figura 1 mostra o processo da infecção durante o repasto sanguíneo na fêmea do gênero *Anopheles* infectada quando esta inocula, juntamente com a saliva,

os esporozoítos que penetram na corrente sanguínea. Estes, por sua vez, invadem os hepatócitos onde crescem e se multiplicam, diferenciando-se em esquizontes hepáticos. A esta fase chama-se esquizogonia hepática, cuja duração depende da espécie de *Plasmodium*. No ciclo de vida do *P. vivax* e do *P. ovale* os esporozoítos podem originar hipnozoítos, que permanecem no hepatócito, em um estado dormente, durante o qual não se dividem até meses ou mesmo por anos. No ciclo do *P. falciparum* e do *P. malariae*, inicia-se de imediato a maturação dos esquizontes hepáticos da qual resultam os merozoítos hepáticos que são liberados para a corrente sanguínea por lise dos hepatócitos (Neves *et al.*, 2005).

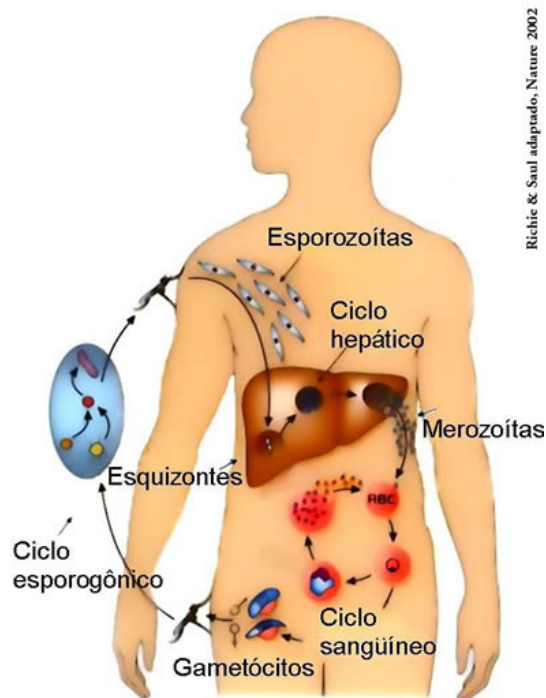


Figura 1 - Ciclo de *Plasmodium* sp. no homem. Fonte: <http://malariabrasil.blogspot.com.br/2011>

A Figura 2 apresenta o ciclo de vida do agente causador da malária no mosquito *Anopheles* sp., onde os gametócitos (1 e 2) diferenciam-se em gametas (3 e 4). O gameta masculino fertiliza o gameta feminino (5), gerando o zigoto (6), que se diferencia em oocineto (7). O oocineto maduro atravessa a matriz peritrófica e o epitélio do intestino (8), para então formar o oocisto (9). Após o desenvolvimento do oocisto (10 e 11), esporozoítos são liberados na hemolinfa (12) e invadem as glândulas salivares (13) (Neves *et al.*, 2005).



Figura 2 - Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. no mosquito vetor. Fonte: Jacobs-Lorena (cortesia).

Atualmente, os países endêmicos de malária estão localizados na área tropical do planeta e representam uma ampla área de transmissão, onde residem cerca de 40% da população mundial ou mais de 2,4 bilhões de pessoas doentes ou assintomáticas, que estão permanentemente expostas ao risco de contrair a doença. A malária não ocorre, obviamente, em áreas onde não existe o vetor e nas áreas geladas, de altitude acima de 1.500 metros e desérticas do planeta (WHO 2012).

Nas Américas, a transmissão ocorre em 22 países, estimando-se que 137 milhões de pessoas vivem em áreas com diferentes intensidade de transmissão, já que diferem em características sociais, econômicas e ecológicas. No ano de 2006 foram registrados aproximadamente um milhão de casos de malária nas Américas, e o país com maior contingente de casos notificados foi o Brasil (52,7%), em decorrência de possuir em seu território a maior área de transmissão na Amazônia seguido pela Bolívia (20,0%) e Colômbia (11,5%) (WHO, 2008).

A distribuição geográfica do *P. falciparum* se sobrepõe a do *P. vivax*, exceto em regiões temperadas, tais como na península coreana, devido ao fato do *P. vivax* completar seu ciclo de desenvolvimento em regiões mais frias. Outra exceção ocorre

em regiões da África Subsaariana, mas por outra razão, pois, uma grande parcela da população não apresenta o antígeno Duffy que o único receptor para o *P. vivax*, um receptor eritrocítico que permite a invasão do *P. vivax* (Miller *et al.* 1976). Nestas regiões, o *P. falciparum* ocasiona mais de 90% dos casos, o que contribui para a grande mortalidade registrada neste continente associada a esta espécie (WHO, 2008).

Segundo Rey (2001), a zona malarígena se divide em três regiões: uma ao norte do Planalto Mexicano, tendo como principais vetores os mosquitos *Anopheles quadrimaculatus* Say, 1824 e *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald, 1901 (Narang *et al.*, 1989; Manguin *et al.*, 1995); outra abrangendo toda a América Central e Antilhas até a costa norte da Colômbia e Venezuela, tendo como principal vetor *Anopheles albimanus* (Narang *et al.*, 1991) e por último grande parte do Continente Sul-Americano, tendo como principal transmissor o *A. darlingi*.

A malária é também uma doença re-emergente em áreas onde estava sob controle ou erradicada, como em repúblicas da Ásia Central e na Coreia. Além disso, nos últimos anos, foi verificado um aumento de casos em países onde a doença não é endêmica, por intensas migrações (WHO, 2008).

Vale ressaltar que em função do fenômeno do aquecimento global, a malária, assim como outras doenças transmitidas por mosquitos, apresenta alto risco de expansão para inúmeras regiões do planeta (Patz e Olson, 2006).

Na Figura 3, representando a situação da malária no mundo, indica que apesar de esforços no controle da doença, ainda há graves problemas de saúde pública no mundo. As informações de áreas onde ocorre a transmissão da malária, ou áreas com risco limitado e sem malária mostram que a maior distribuição no mundo ainda são aquelas em que ocorrem maior transmissão. Isso implica na necessidade de políticas públicas voltadas para as doenças infecciosas em todo o mundo.

A Figura 4, destaca a incidência da malária calculada por 1.000 habitantes em 2006, mostrando que as regiões de maior índice de malária são o continente africano, seguido da Ásia e da América Latina. Na África, a incidência é superior a 200 casos por 1.000 habitantes. A malária vem sendo um problema desafiador para população mundial. Os seres humanos estão susceptíveis e são infectados pelos plasmódios, agentes causadores da malária desde a.C. (WHO, 2012). Um dos principais fatores é a ação antrópica sobre o meio ambiente, pois provoca alterações

ambientais com reflexo sobre a densidade de vetores, propiciando aumento no contato homem/vetor, promovendo aumento da incidência da malária em diferentes regiões do planeta (WHO, 2012).

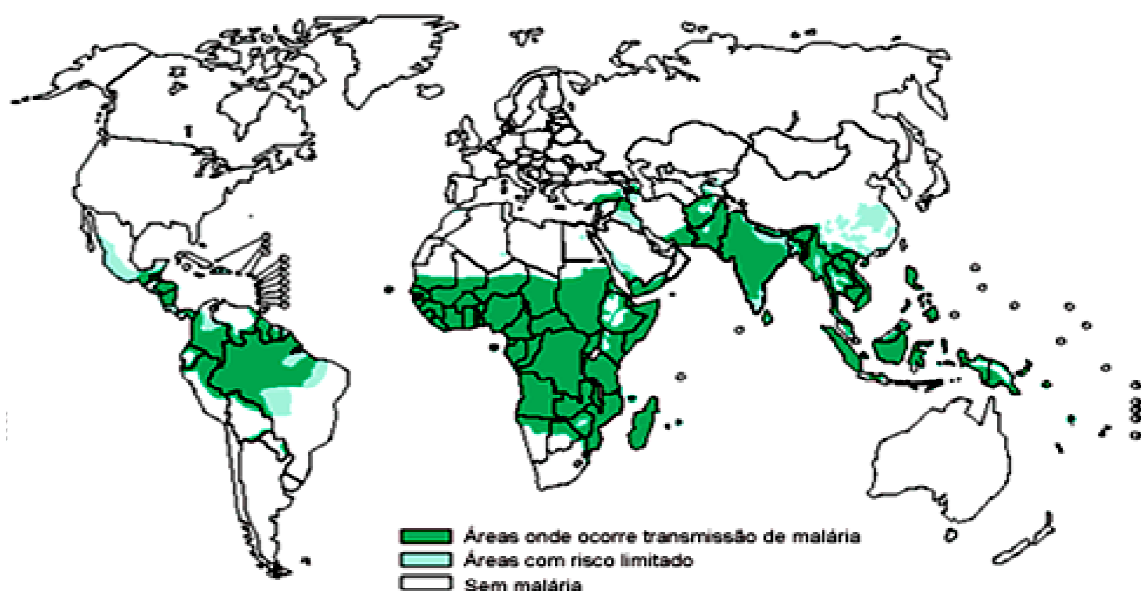


Figura 3 - Situação global da malária segundo risco de transmissão da doença. Fonte: WHO, 2011.

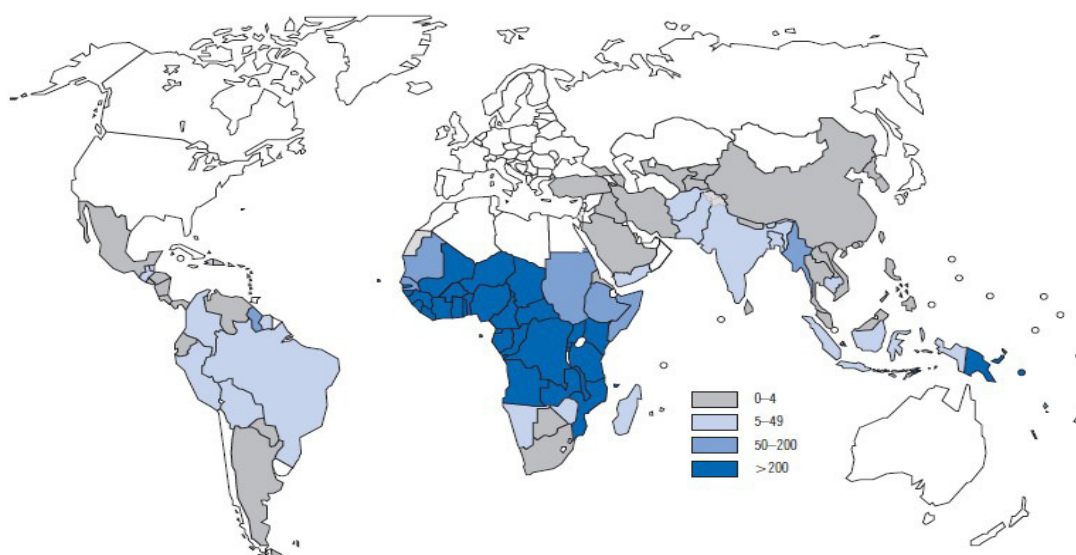


Figura 4 - Incidência dos casos de malária por 1.000 habitantes em (2006). Fonte: WHO, 2008.

No Brasil, a situação da malária já era considerada grave mesmo antes de 1946, pois nessa época a doença disseminava-se por quase todo o país, ficando fora da área de abrangência da infecção somente as áreas mais altas, parte do sertão nordestino e os extremos meridionais. Durante a década de 60, após a realização de campanhas de erradicação, houve a redução dos casos clínicos de malária na região amazônica, sendo notificados em 1970 apenas 52.469 casos (Deane, 1986).

Os dados da Organização Mundial da Saúde - WHO (2012) revelam que ainda é grave o problema de saúde nos estados da Amazônia Legal, a qual envolve os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Segundo Ministério da saúde (SIVEP/Malária, 2012), a maioria dos casos de malária do Brasil está concentrada na Amazônia Legal, onde foram diagnosticados 333.429 casos de malária em 2010 e 263.323 em 2011, distribuída, respectivamente: 74.135 casos (2010) e 59.279 casos (2011) no Amazonas; 135.246 casos (2010) e 113.461 casos (2011) no Pará; 43.576 casos (2010) e 30.371 casos (2011) em Rondônia; 36.905 casos (2010) e 22.584 casos (2011) no Acre; 15.388 casos (2010) e 18.437 casos (2011) no Amapá; 21.806 casos (2010) e 13.982 casos (2011) em Roraima.

O estado do Pará registrou o maior número de casos de malária comparado com outros estados da Amazônia Legal nestes últimos dois anos. A queda mais expressiva no número de casos foi observada no estado do Maranhão (39%), seguida do Mato Grosso (31%). O estado do Amapá foi o único que apresentou aumento no período (20%) (SIVEP/Malária, 2012).

Com a intensificação das ações de controle da malária no Brasil vem-se alcançando resultados positivos, reduzindo a incidência da doença. Nesta última década, houve diminuição no número de casos clínicos da malária e dos municípios considerados de alto risco (Incidência Parasitária Anual – IPA acima de 49,9 casos/1.000 habitantes) de internações e óbitos por malária (OPAS, 2005).

Contudo, o fluxo migratório na região amazônica para outros estados brasileiros, com potencial malarígeno, têm levado ao surgimento de surtos epidêmicos de malária, como nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Ceará, Minas Gerais e Bahia (SIVEP/Malária, 2012).

A Figura 5, representa as regiões acometidas por malária no Brasil. Na Amazônia têm sido registrados surtos de malária, que resultam da introdução da doença por migrantes infectados vindo das áreas de transmissão (Ministério da Saúde, 2012). Pela imagem é possível perceber que a maior parte da Amazônia Legal é considerada área de médio e de alto risco de transmissão da doença (Ministério da Saúde, 2012).

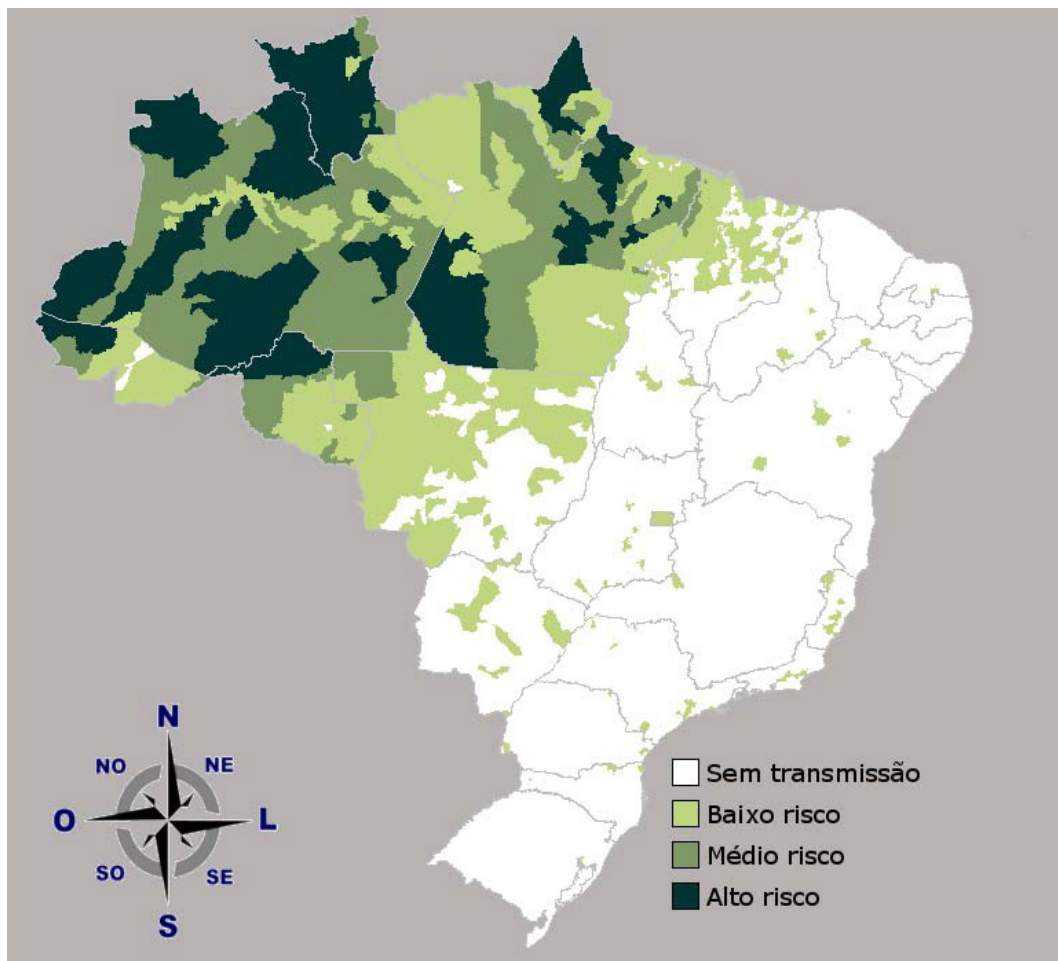


Figura 5 – Áreas de risco de transmissão da malária na Amazônia Legal do Brasil (2011), por município de notificação epidemiológica. Fonte: Ministério da Saúde, 2011.

A maioria dos casos de malária, em outras regiões do país está localizada às margens do lago do reservatório da hidrelétrica de Itaipu; em áreas cobertas pela Mata Atlântica nos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Ministério da Saúde, 2008). Em regiões localizadas ao Sul do país, Póvoa *et al.* (2003) registraram em Santa Catarina casos de malária autóctone.

Em regiões de Mata Atlântica, Curado *et al.* (1997) registraram que a malária está associada à existência de plantas da família Bromeliaceae, que funcionam como criadouros de anofelinos do subgênero *Kerteszia*.

Em relação ao perfil epidemiológico das espécies de *Plasmodium* presentes na Amazônia legal, houve uma redução no número de casos de malária a partir da intensificação das ações de controle de *P. falciparum*, durante o período entre 1984 a 1988. Este procedimento resultou em alteração da relação *P. falciparum*/*P. vivax* na região, no qual houve o aumento de casos clínicos de malária por *P. vivax* na Amazônia legal. Assim, a partir deste período registrou-se um novo perfil epidemiológico da malária nessa região, no qual o *P. vivax* novamente figura como a espécie predominante na malária no Brasil (Coura *et al.*, 2006).

A eficácia das ações de controle da malária faz-se necessário conhecer a biologia dos vetores, enfocando os parâmetros de preferência alimentar, padrão da atividade de picar, locais de pouso após repasto no domicílio, entre outros. Mendoza *et al.* (1996) realizaram no estado do Rio de Janeiro análise do conteúdo estomacal de *A. aquasalis* utilizando a técnica da Reação de Precipitina (Bull e King, 1923). Estes autores verificaram que dentre os espécimes reagentes, 356 (75,3%) haviam se alimentado em apenas uma fonte sanguínea, mais da metade deles havia se alimentado com sangue bovino 186 (52,2%) e apenas 04 (1,1%) com sangue humano. Nenhuma das amostras reagiu com o anti-soro de roedor. O conteúdo intestinal de 117 espécimes (24,7%) reagiu com mais de uma fonte sanguínea, sendo mais frequente a combinação boi + cavalo (83,7%), seguida de longe por homem + boi (5,1%), dentre outras.

Esta técnica tem servido de indicador eficiente em estudos ecológicos relativos a insetos hematófagos transmissores de doenças de importância para a saúde pública. Usada por Romaña (1939) e posteriormente por Correa e Aguiar (1952) apresentou-se útil na identificação das fontes alimentares dos insetos que praticam a hematofagia. Esta análise se faz necessária para comprovação da preferência alimentar do *Anopheles* e fazer uma associação com a presença dos animais junto às residências e o surgimento dos casos de malária na região (Romaña, 1939).

Um parâmetro relevante nos estudos das populações de anofelinos é o nível de exofilia e endofilia relacionados ao hábito do mosquito de picar fora e dentro dos domicílios, respectivamente (Tadei *et al.*, 1993; 1998). Os estudos realizados por

Tadei *et al.* (1983) na região da Hidrelétrica de Tucuruí mostraram um percentual mais elevado de endofilia para *Anopheles nuneztovari* Galbadón 1940. Nos pólos de colonização situados às margens do lago, a incidência de *A. darlingi* foi muito baixa e a espécie predominante foi *A. nuneztovari*. O índice foi de 3.006 (40%) da amostra total de anofelinos capturados, dentre eles o *A. nuneztovari* foi a mais abundante com 85% do total seguida de *A. darlingi* com 15%. Algumas espécies de mosquitos como *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis*, têm preferência antropófila, por isso o humano é um de seus atrativos.

Padrões de acentuada antropofilia e endofagia são observados por diferentes espécies de vetores de malária em todo o mundo. No continente africano a principal espécie incriminada na transmissão da malária é o *Anopheles gambiae* Giles 1926, respondendo por boa parte das transmissões entre os países da região. A Figura 6 mostra a distribuição dos mosquitos do gênero *Anopheles* transmissores de malária no mundo. Onde existe o vetor sempre existe a possibilidade de se contrair malária, em qualquer região do planeta, inclusive nos países desenvolvidos e de primeiro mundo, desde que haja a presença dos plasmódios infectando esses mosquitos (WHO, 2012).

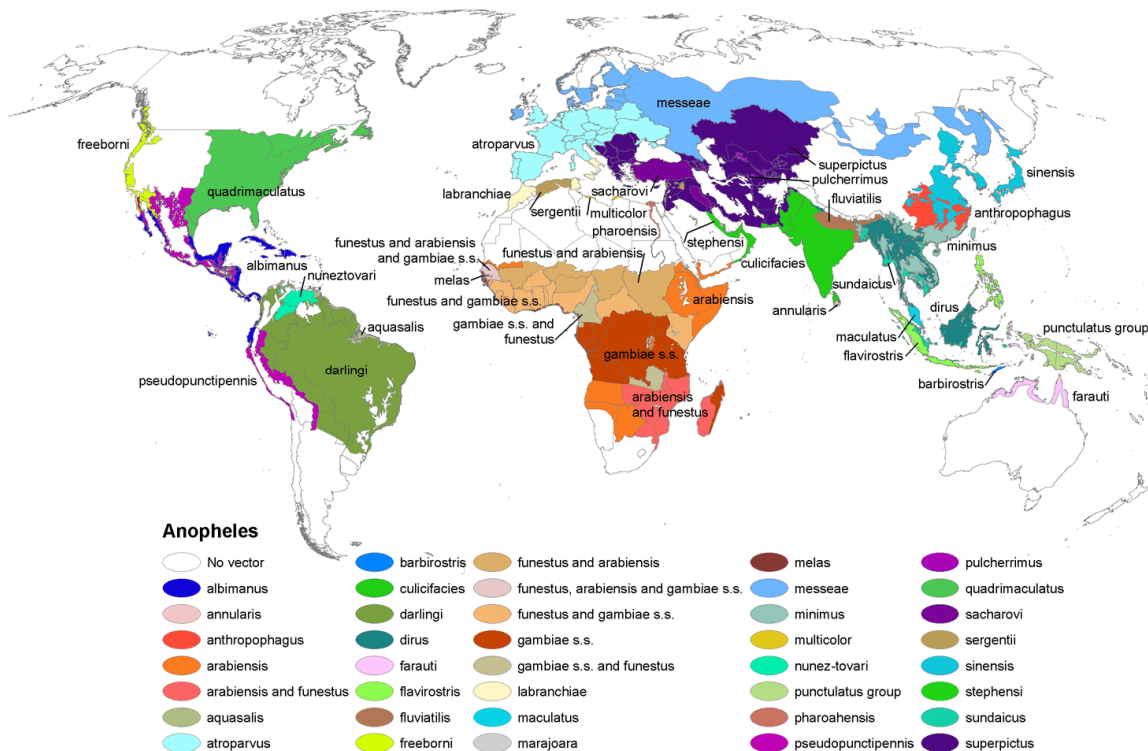


Figura 6 - Distribuição global do gênero *Anopheles*. Fonte: WHO, 2012 <http://www.who.int/research/en/> Acesso 2012.

No Brasil, o principal vetor é o *A. darlingi* e está distribuído praticamente em todas as regiões do país. Na região litorânea o vetor é o *A. aquasalis* e em regiões da Mata Atlântica é o *A. cruzii* (Forattini, 2002). Desde os anos trinta têm sido reportadas, em várias regiões brasileiras, infecções naturais no *A. darlingi* onde, em algumas áreas é considerado o único transmissor importante (Deane *et al.*, 1948; Deane, 1986).

Forattini *et al.* (1996; 1999) analisaram o potencial sinantrópica de *A. bellator* e *A. cruzii* estudando localidades rurais circundadas por ambientes primitivos, representadas por floresta pluvial rica em bromélias, principal criadouro destas espécies. Os autores registraram acentuada exofilia para *A. cruzii* e maior endofilia para *A. Bellator*.

Forattini *et al.* (1996; 1998) mostraram que as populações de *Kertezsia*, logo após o repasto, vão à procura de um abrigo no meio natural circundante. *Anopheles bellator* apresentou afinidade para picar o homem e formas imaturas foram encontradas em recipientes artificiais, o que poderia indicar um processo de adaptação ao meio modificado. Com base nos reduzidos graus de sinantropia apresentados pelas duas espécies de *Kertezsia*, em comparação com *Culex quinquefasciatus* Say 1823, os autores admitiram que dificilmente estas duas espécies pudessem se adaptar ao meio que houvesse ação antrópica.

Na Amazônia, as espécies de anofelinos que fazem parte do ciclo de transmissão da malária são aquelas do subgênero *Nyssorhynchus*: *A. darlingi*; *A. aquasalis*; complexo *A. albitarsis lato sensu* (incluindo *Anopheles marajoara*; *Anopheles deaneorum* Rosa-Freitas, 1989); *A. oswaldoi* Peryassú, 1922; *A. nuneztovari* e *Anopheles triannulatus* (Neiva e Pinto, 1922). Dentre estas espécies, *A. darlingi* é considerada o principal vetor na Amazônia, constatada a presença de oocistos e esporozoítos, respectivamente, na análise do estômago e das glândulas salivares desses mosquitos. A análise pelo teste de Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) revelou a infecção por três espécies de *Plasmodium* que causam a malária humana: *P. falciparum* *P. vivax* e *P. malariae* (Deane *et al.*, 1948; Deane 1986; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 1989; Tadei e Dutary-Thatcher 2000). *A. darlingi* apresenta acentuada antropofilia, além de ser a espécie que possui maior susceptibilidade à infecção, desenvolvimento e transmissão dos plasmódios, é

também a espécie de maior densidade em todas as regiões onde ocorrem epidemias de malária (Deane 1986; Tadei *et al.*, 1988).

Em estudo das populações de anofelinos no estado de Rondônia, Tadei (1988) e Tadei *et al.* (1993; 1998) verificaram que a redução da densidade populacional de *A. darlingi* está relacionada com o desaparecimento da infecção por *Plasmodium* das outras espécies de *Anopheles*. O mesmo foi verificado em populações do Amapá, onde a infecção pode também estar associada com a redução da densidade populacional de *A. darlingi*. Os autores enfatizaram que esta é uma forte evidência do papel principal de *A. darlingi* como vetor da malária humana na Amazônia.

1.4 Malária e espécies de *Anopheles* incriminadas como vetores no Estado do Maranhão

No Estado do Maranhão, em 2010, foram notificados 3.904 casos de malária, sendo 2.987 por *Plasmodium vivax* e 804 por *P. falciparum*. Em 2011 foram diagnosticados 2.789 casos de malária, distribuídos em 48 casos por *P. falciparum* e 2.741 por *P. vivax* (SIVEP/Malária, 2012).

Baseados nos registros de casos de malária no Maranhão há predominância de infecções por *P. vivax*. Estes dados corroboram a importância dos trabalhos realizados pela equipe do Centro em Doenças Infecciosas e Parasitaria da Universidade Federal do Maranhão, com o intuito de reduzir a cada ano os casos clínicos de malária, com ênfase especial para os casos de *P. falciparum*.

No segundo Município em 2006 foram diagnosticados 57 casos de malária no sexo masculino e 35 no feminino. Em 2007, 18 para o sexo masculino e 12 no feminino. No ano de 2008, 16 para o sexo masculino e 05 no feminino. Em 2009 registrou-se 12 para o masculino e 11 no feminino (SIVEP/Malária, 2012).

Já no ano de 2010 foram notificados seis casos apenas no sexo masculino. Estes dados indicam que as medidas de controle aplicadas, tais como borrifação residual intradomiciliar e a abertura de um canal ligando o criadouro permanente com o temporário em São José de Ribamar teve mais êxito do que as aplicadas no município de Buriticupu. A BR 222 nas proximidades desse Município encontra-se em obras para ampliação da mesma. Vale enfatizar que esta ação antrópica provavelmente está favorecendo para migração do vetor para os ambientes

domiciliares e provavelmente associados ao aumento de casos no Município (SIVEP/Malária 2012; CREDIP – UFMA 2012).

No município de Buriticupu, a introdução da malária se deu durante a implantação da colonização agrícola, que fixou em 1974 as primeiras 69 famílias de agricultores. As características socioeconômicas observadas na população tais como baixa renda, pouca escolaridade, condições precárias de moradia e de saneamento, refletem situações de deslocamentos e assentamentos humanos em regiões sem infraestrutura adequada. O perfil da área de transmissão é o resultado do processo em que foi gerando um desequilíbrio no ecossistema natural das espécies de *Anopheles*, com incremento do número de criadouros dos vetores e maior exposição à infecção (Silva *et al.*, 1979).

Em relação aos casos de malária em 2005, na localidade de Buritizinho (município de Buriticupu), foram registrados nove casos em pacientes com faixa etária entre dez e 59 anos. O sexo mais acometido foi o feminino com sete casos e masculino com dois. Com as medidas de controle, borrifação com Alpha Cipermetrina a cada três meses, houve uma redução em 2006 para apenas quatro casos (CREDIP-UFMA 2005; 2006). Em 2007 foi registrado aumento de casos na comunidade, sendo registrados cinco casos por *P. falciparum* e 38 por *P. vivax*. Em 2008, o registro de casos continuou elevado, sendo registrados cinco casos de *P. falciparum* e 26 *P. vivax*. O número de cinco casos de *P. falciparum* se repetiu novamente em 2009 e de *P. vivax* reduziu para 19 casos. No ano de 2010 houve um aumento elevado de *P. falciparum* - passou para 12 casos e também o de *P. vivax* - 48 casos. Em 2011 foi registrada a redução da malária, registrando-se apenas três casos, todos por *P. vivax* (SIVEP/Malária, 2012).

Na localidade de Guarapiranga (município de São José de Ribamar) existem 51 moradias, totalizando uma população de 257 habitantes. Em 2006 foram diagnosticados 22 casos de malária, distribuídos em ambos os sexos, dos quais o mais acometido foi o sexo masculino - com 18 casos (75%) e o feminino, quatro casos (25%), sendo a faixa etária entre sete e 63 anos. Na mesma área, entre os anos de 2008 a 2011, não foram registrados casos clínicos de malária em Guarapiranga (SIVEP/Malária 2012).

Apesar da incômoda situação do Maranhão em relação à transmissão da malária, conhece-se muito pouco sobre a dinâmica de transmissão das espécies de anofelinos que ocorrem no estado. Até o momento, há apenas o levantamento

realizado na Amazônia maranhense por Silva (1980). Rebêlo *et al.* (1997) estudaram a fauna de anofelinos no município de Buriticupu e detectaram a presença de *A. darlingi*, inclusive dentro dos domicílios e o incriminaram como o principal vetor da malária humana naquela região. No Estado estão presentes as principais espécies de vetores - *A. darlingi*, *A. aquasalis* e *A. albitarsis lato sensu*, as espécies mais importantes na transmissão da malária no Brasil. Xavier e Rebêlo (1999) destacaram essas mesmas espécies como mais no Estado: *A. darlingi*; *A. albitarsis lato sensu*; *Anopheles oswaldoi*; *A. triannulatus*; *Anopheles galvaoui* Causey, Deane & Deane, 1943; *A. argyritarsis*; *Anopheles. braziliensis* Chagas, 1907; *Anopheles rondoni*, Neiva & Pinto, 1922; *Anopheles strodei* Root, 1926; *Anopheles evansae* Brèthes, 1926; *A. nuneztovari* e *Anopheles rangeli* Gabaldón, Cova-Garcia e Lopez, 1940, entre outros.

A espécie *A. darlingi* predomina o interior do Estado e constitui-se no principal vetor da malária, principalmente na Amazônia Maranhense, onde existem casos de malária relacionados com esta espécie (Rebêlo *et al.*, 1997), e na Baixada Ocidental (Pereira *et al.*, 2000). Na Ilha de São Luís (MA), as espécies de anofelinos mais frequentes no intradomicílio foram *A. aquasalis* (77%), seguida por *A. oswaldoi* (75,7%) e *A. albitarsis lato sensu* (70%). *A. aquasalis* apresentou alta frequência tanto no intra quanto no peridomicílio, representando na área 82% da amostra total (Xavier e Rebêlo, 1999).

Assim, neste trabalho foram analisados dados entomológicos do CREDIP-UFMA, que mantém atividades contínuas de monitoramento entomológico nos Municípios de Buritizinho e São José de Ribamar, estado do Maranhão, objetivando entender o comportamento da malária e nortear ações de intervenção e/ou prevenção da malária, sendo essencial a compreensão da dinâmica de transmissão da malária e determinar os parâmetros relevantes envolvidos neste processo.

II. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

No estado do Maranhão o conhecimento sobre o comportamento vetorial das espécies de *Anopheles* ainda é insuficiente para se esclarecer o papel das espécies na envolvidas na transmissão. Contudo, na área de estudo fatores ambientais e sócioeconômicos que vêm contribuindo para a manutenção da malária no Estado. Este estudo objetivou buscar respostas sobre a dinâmica de transmissão da malária e o comportamento dos anofelinos em relação aos tipos de criadouros, vegetais aquáticos e caracteres limnológicos, em duas localidades no estado do Maranhão.

A influência do clima no ambiente em áreas com características amazônicas reúnem todas as condições adaptativas necessárias para o desenvolvimento das espécies de anofelinos (Tadei *et al.*, 1993). Estas condições estão inseridas em um processo que sofre variações naturais gradativas, intimamente relacionadas ao ciclo hidrológico característico da região, que compreende um período de chuva e outro de seca. No período de chuvas há um aumento dos criadouros naturais e da concentração de matéria orgânica, que se tornam ecótopos ideais para o ciclo reprodutivo dos vetores da malária principalmente o competente vetor de área litorânea, o *Anopheles aquasalis*, e de outras áreas, o *A. darlingi* (Tadei *et al.*, 2001).

O estudo da fauna anofélica é considerado indispensável no controle dessa endemia, pois esta é uma doença grave que tem causado grave problema à Saúde Pública no Brasil. Silva (1980) realizou um estudo entomológico na Ilha de São Luis e demonstrou que a espécie *A. aquasalis* foi a mais frequente, ou seja, o maior número de indivíduos coletados nos ambientes intra, peri e extradomicílio.

A existência de áreas de alta transmissão de malária vem-se constituindo em importante problema de Saúde Pública, pois tem exercido fortes pressões nas áreas vizinhas, inclusive, afetando a área deste estudo. Dentro deste contexto, a Ilha de São Luís, situada na zona do golfão maranhense, tem sofrido sérias consequências, pois tem sido alvo constante do fluxo migratório das populações interioranas. Este fenômeno vem causando a ampliação das áreas urbanas e, conseqüentemente, produzindo alterações nos habitats naturais dos vetores, gerando surtos epidêmicos (Xavier e Rebêlo 1999).

Diante da situação de endemismo da malária nos municípios de Buriticupu e São José de Ribamar julga-se importante que haja o monitoramento e controle vetorial dessa doença em caráter interdisciplinar e multiprofissional, compatibilizando as ações de saúde, educativas e sociais que possam contribuir para a efetividade do controle da endemia.

Devido à importância epidemiológica da malária, os estudos que abordam a bioecologia e diversidade das espécies incriminadas na transmissão da doença, são relevantes para a implementação de medidas de controle, considerando a biologia do vetor, atingindo-se pontos específicos do processo reprodutivo desses vetores. Assim, neste trabalho, pretende-se estudar as espécies de *Anopheles* em ambientes domiciliares e intradomiciliares de áreas endêmicas de malária do município de Buriticupu e município de São José de Ribamar, Ilha de São Luís Estado do Maranhão. Além disso, pretendem-se ampliar os conhecimentos sobre estes importantes vetores para que se possam indicar meios que contribuam junto aos Órgãos de Saúde do Estado e às comunidades no sentido de diminuir o contato homem-vetor e, desta forma, prevenir o aumento da malária no Estado do Maranhão.

III. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Conhecer os aspectos bioecológicos de espécies de *Anopheles* sp. e a dinâmica de transmissão da malária humana nos municípios de Buriticupu e São José de Ribamar - MA.

3.2 Específicos

- Determinar a composição da fauna anofélica;
- Estudar as frequências mensal das espécies de *Anopheles* nos ambientes intra, peri e extradomicílio;
- Estudar a frequência horária dos anofelinos;
- Caracterizar os parâmetros limnológicos dos criadouros considerando aspectos físicos e químicos da água;
- Associar a vegetação aquática à presença de larvas de anofelinos nos criadouros;
- Determinar a preferência alimentar sanguínea das espécies de *Anopheles*;
- Analisar a taxa de infecção natural por *Plasmodium* sp. das espécies de *Anopheles*.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado nos seguintes municípios do Estado do Maranhão: Buriticupu, localizado em região intercontinental do Estado; e São José de Ribamar, localizado na região litorânea da Ilha de São Luís. Em Buriticupu a área amostrada é denominada Guarapiranga. Já em São José de Ribamar a região estudada denomina-se Buritizinho (Figura 7).

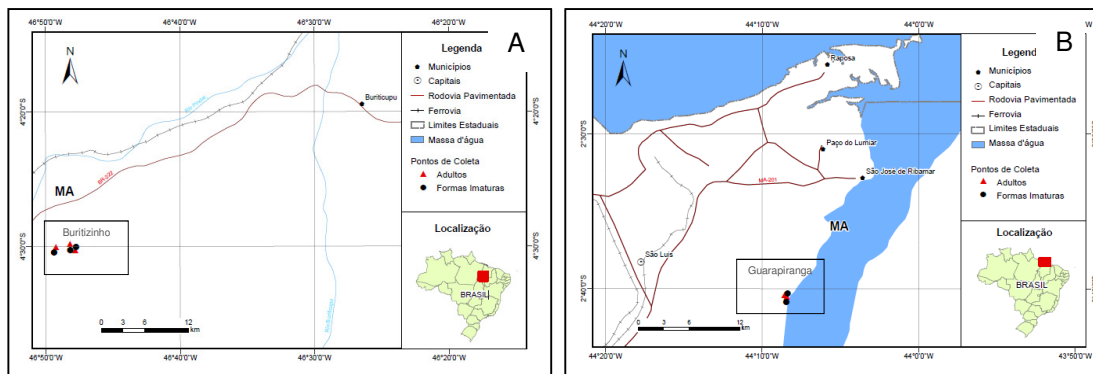


Figura 7 - Localização geográfica dos pontos de coleta em Buritizinho no município de Buriticupu (A) e de Guarapiranga no município de São José de Ribamar (B), Estado do Maranhão.

4.2 Descrição dos procedimentos:

4.2.1 Flutuação sazonal e densidade de *Anopheles* sp.

Em Buritizinho as coletas de anofelinos foram realizadas nos três ambientes intra, peri, e extradomicílio. As capturas foram realizadas mensalmente, entre Janeiro de 2006 a Fevereiro de 2011, uma noite por mês, no intervalo entre 18h e 06h horas. Já em Guarapiranga foram desenvolvidas coletas com o mesmo formato, com exceção apenas do ambiente extradomiciliar. Os métodos utilizados nas duas áreas de estudo foram busca ativa de fêmeas que eventualmente estavam se alimentando nos animais domésticos, ou pousadas sobre as paredes das residências, além da captura com atração humana feita por técnicos qualificados

(Figura 8). Durante as coletas, os técnicos coletores estavam portando os equipamentos de proteção individual, constituído de: camisas e calças longas ou macacão e meias pretas usadas na forma dupla, o que impossibilitava os mosquitos realizarem hematofagia nesses indivíduos. O macacão foi reforçado nas costas, cotovelos, base das coxas com tecido, objetivando proteção contra a picada dos mosquitos. Em cada ambiente permaneceram três pessoas coletando sistematicamente durante 20 minutos de cada hora, no intervalo de 12 horas ininterruptas. Para o procedimento das coletas foram utilizados tubos de sucção do tipo Castro e lanternas para visualização dos anofelinos.

Todos os pontos de coleta de adultos foram georreferenciados por meio de aparelho GPS e as coordenadas geográficas estão dispostas nas Tabelas 1 e 2. Adicionalmente foram registrados os dados climáticos como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação de cada localidade para avaliar a influência desses fatores na densidade das espécies coletadas.

Os espécimes capturados foram separados a cada horário de escotofase, devidamente etiquetados e acondicionados em frascos. Ao final da captura, todo material foi conduzido ao Laboratório de Entomologia do Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Maranhão, para identificação das espécies. Na identificação, utilizaram-se as chaves para identificação de gênero e espécie de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) e de Forattini (2002).



Figura 8 - Métodos de coletas utilizados em Buriticupu e São José de Ribamar: A – busca ativa de fêmeas pousadas sobre superfícies; B – captura com atração humana. Fonte: Barros, V. L. L (2012).

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de *Anopheles* spp. adultos nos diferentes ambientes domiciliares no município de Buriticupu, Estado do Maranhão.

Pontos de coleta de adultos		Coordenadas geográficas	
NÚMERO	REFERÊNCIA	LONGITUDE	LATITUDE
1	Buritizinho intra	-46° 49' 273" W	-4°:30' 341" S
2	Buritizinho peri	-46° 48' 029" W	-4° 30' 141" S
3	Buritizinho extra	-46° 47' 890" W	-4°:30' 207" S

Tabela 2 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de *Anopheles* spp. adultos nos diferentes ambientes domiciliares no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão.

Pontos de coleta de adultos		Coordenadas geográficas	
NÚMERO	REFERÊNCIA	LONGITUDE	LATITUDE
1	Guarapiranga intra	-44° 08' 439" W	-02°:40' 521" S
2	Guarapiranga peri	-44° 08' 436" W	-02° 40' 509" S

4.2.2 Coletas de imaturos de anofelinos

As coletas de larvas de *Anopheles* spp. em criadouros foram realizadas no período de Janeiro a Dezembro de 2009 entre os horários de 07h às 09h. Foram utilizadas conchas entomológicas para amostragem nos criadouros selecionados em cada localidade, sendo o número de larvas e pupas quantificado e em seguida,

aconditionado em tubos de vidro com solução conservante para identificação em laboratório (Figura 9). Os procedimentos para condução em laboratório e identificação das espécies ocorreram conforme descritos no item anterior. Os criadouros amostrados foram georreferenciados e os dados das respectivas coordenadas geográficas encontram-se dispostos nas Tabelas 3 e 4.



Figura 9 - Coletas de larvas nos criadouros, com o uso de concha entomológica.

Tabela 3 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das formas imaturas do gênero *Anopheles* spp. no ambiente extradomiciliar no município de Buriticupu, Estado do Maranhão.

Pontos de coleta das formas imaturas		Coordenadas geográficas	
NÚMERO	REFERÊNCIA	LONGITUDE	LATITUDE
1	Buritizinho extra	-46° 49' 346" W	-4°:30' 349" S
2	Buritizinho extra	-46° 48' 024" W	-4° 30' 202" S
3	Buritizinho extra	-46° 47' 838" W	-4°:30'156" S

Tabela 4 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das formas imaturas de *Anopheles* spp. no ambiente peridomicílio no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão.

Pontos de coleta das formas imaturas		Coordenadas geográficas	
NÚMERO	REFERÊNCIA	LONGITUDE	LATITUDE
1	Criadouro permanente	-44° 08' 437" W	-02°:40' 512" S
2	Criadouro temporário	-44° 08' 844" W	-02° 40' 503" S

4.2.3 Análises da água dos criadouros

4.2.3.1 Variáveis Físicoquímicas

As variáveis físicoquímicas da água dos criadouros (pH, temperatura, condutividade, sólidos totais dissolvidos) foram obtidas por meio de aparelhos portáteis (HORIBA U-10), com exceção do oxigênio dissolvido, para o qual foi utilizado também o método de Winkler *apud* Golterman *et al.* (1978) e material em suspensão, onde foi empregada a técnica gravimétrica descrita por Teixeira *et al.* (1965) e Tundisi (1969).

A amostragem foi realizada em janeiro e em setembro de 2009, uma vez em cada estação do ano em lagos de Guarapiranga e Buritizinho para comprovar a presença dos nutrientes nos criadouros. As amostras foram coletadas na profundidade de 10 cm, com auxílio de garrafas coletoras, devidamente lavadas e descontaminadas, e o volume coletado era aproximadamente um litro, os quais eram acondicionados em caixas de isopor com gelo. Tanto as medidas do pH como as de temperatura foram realizadas por meio de sondas apropriadas, aferidas, a uma profundidade de 10cm. Os dados de pH e temperatura foram obtidos no local de amostragem com o equipamento digital, em 10 intervalos de 20 segundos.

A condutividade elétrica foi medida em laboratório, utilizando-se um condutivímetro com eletrodo, devidamente aferido. Foi monitorado o controle da temperatura e da salinidade, no instante da dosagem. As amostras foram levadas para o laboratório de Geoquímica do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

As análises de nitrito, nitrato, amônia e fósforo total foram realizados no mesmo dia da amostragem, logo após a chegada das amostras no laboratório. As amostras destinadas à dosagem química foram filtradas utilizando-se papel de filtro quantitativo de 42 micra de abertura e as determinações ocorreram em prazos que não excediam 18 horas após as amostragens (Mackereth *et al.*, 1978).

No Laboratório de Limnologia da UFMA foi realizada a análise da amônia com 50mL da amostra, 1mL da solução de citrato trissódico e o material foi agitado com auxílio de vortex. Em seguida acrescentou-se 1mL hipoclorito agitando a solução, que ficou em repouso por 24 horas. Em seguida foi feita a leitura no espectrofotômetro a 630nm (namômetro), em cubeta de 1 cm, também foi analisado o Nitrito com 50 mL da amostra filtrada, com 1 mL do primeiro reagente (uma solução de sulfanilamida) e reagente segunda (Bicloridrato de N-1- Naftil), e transportado para o espectrômetro para a realização da leitura (Mackereth *et al.*, 1978).

A análise do Nitrato foi realizada com 50 mL de água deionizada para 10 mL da amostra, acrescentou-se 1 mL de cloreto de amônia (NH_4Cl), logo após colocou-se 20 mL da solução para lavar suavemente a bureta e depois foi recolhido 25 mL para análise de nitrato. Colocou-se o primeiro reagente - Solução de molibdato de amônia (R1) e após 10 minutos adicionou o segundo reagente – Solução de Ácido Ascórbico (R2), após 10 minutos iniciou o procedimento de leitura no espectrômetro. O método usado para análise foi descrito por Mackereth *et al.* (1978).

O Fósforo Total – O fósforo está presente sob várias formas nas águas naturais, efluentes domésticos e industriais. Os ortofosfatos são largamente empregados como fertilizantes comuns e são levados pelas chuvas até os cursos d'água. São abundantes nos esgotos domésticos e podem mineralizar a matéria orgânica. O fósforo é essencial no crescimento de organismos das águas superficiais, como por exemplo, o fitoplâncton, e pode ser fator limitante da produtividade dessas águas. O ortofosfato ou somente fosfato solúvel é determinado pelo método do ácido ascórbico, que consiste em reagir este composto com molibdato de amônio e tartarato de potássio em meio ácido e, reduzir o ácido fosfomolibdico formado a azul de molibdênio. A intensidade da cor é proporcional à concentração de fosfato na amostra. O procedimento foi realizado com 30mL da amostra, adicionado 3mL de R1 e 30mL do R2 ao finalizar foi procedida a leitura no espectrômetro (Nanzel e Valand, 1964).

4.2.4 Determinação das espécies de vegetais aquáticas nos criadouros

4.2.4.1 Macrófitas aquáticas

As coletas dos vegetais aquáticos foram desenvolvidas em Janeiro de 2009, época em que um especialista no grupo pode realizar o acompanhamento em campo nas duas áreas de estudo. Para a identificação botânica foram utilizados indivíduos férteis (com flores e/ou frutos) de cada tipo vegetal. As amostras foram identificadas no Laboratório de Botânica da UFMA, utilizando-se metodologia descrita por (Cook *et al.*, 1974, Christopher *et al.*, 1974, Pott e Pott, 2000). Esta identificação foi um trabalho do CREDIP-UFMA em parceria com o Laboratório de Botânica da UFMA e por ser um trabalho do CREDIP, os exemplares coletados foram depositados na mesma. Os vegetais de maior porte, a exemplo do manguezal, foram identificados em campo.

4.2.5 Preferência alimentar sanguínea de *Anopheles* em diferentes ambientes

4.2.5.1 Técnica da Precipitina

Na determinação da preferência alimentar sanguínea de *A. darlingi* e *A. Aquasalis*, em diferentes ambientes, foram analisados espécimes capturados de Janeiro de 2009 a Fevereiro de 2010. Todas as fêmeas ingurgitadas foram congeladas e transferidas para frascos de polietileno, transportados para o Laboratório de Entomologia Médica da Universidade Federal do Maranhão para aplicação técnica de Precipitina, para detectar se a fonte alimentar presente era sangue humano e/ou de outros animais (Bull e King, 1923).

A identificação das preferências alimentares foi realizada segundo Siqueira (1960), com modificações. Os tubos digestivos dos exemplares de *A. darlingi* e *A. aquasalis* foram removidos e triturados em tubos de ensaio (13x100mm) contendo solução salina pH 7,0 e este macerado permaneceu em repouso por 12hs, à temperatura de 4 a 8°C e, posteriormente, foi centrifugado a 1.800 rpm por 5min e diluído. Em seguida, foi examinado com anti-soros de aves, mamíferos, répteis e anfíbios (Lorosa *et al.*, 1998).

A bateria de anti-soros e seus respectivos títulos testados foram: anti-humano 1:15.000; ave 1:10.000; cão 1:15.000; gato 1:12.000; cavalo 1:16.000; cabra 1:14.000; boi 1:15.000; porco 1:10.000; carneiro 1:8.000; lagarto 1:14.000; roedor 1:17.000; gambá 1:15.000; tatu 1:15.000 e sapo 1:16.000.

Todos os testes de Precipitina foram realizados em parceria com os laboratórios de Patologia e de Parasitologia da FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

4.2.5.2 Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

A preferência alimentar foi analisada também por meio da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR de fêmeas de anofelinos ingurgitadas capturadas no Município de Buriticupu. As capturas foram realizadas no período de 2010 a 2011, nos ambientes intra, peri e extradomicílio, que consistem em habitações humanas, abrigos de animais, estábulos de bovinos e cavalos, galinheiro e pocilgas. Os mosquitos foram acondicionados em frascos plásticos fechados com filó, contendo identificação do local, data e hora da coleta. Em seguida, foram armazenados em

uma caixa de isopor com gelo seco e, posteriormente, transportados ao Laboratório de Entomologia Médica da UFMA para identificação das espécies.

As análises moleculares foram realizadas por meio da técnica de PCR, no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA em Manaus - AM. Os mosquitos foram mantidos a temperatura de -20°C para preservação do material genético. A extração do DNA genômico foi realizada com o QUIamp®DNA Mini Kit – 250 (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), conforme o protocolo indicado pelo fabricante.

As fêmeas de *Anopheles* ingurgitadas foram separadas individualmente e acondicionadas em microtubos de 1,5mL contendo 20µL de Proteínase K e adicionou-se PBS 1x até o volume de 200µL. Cada amostra foi macerada com auxílio de pistilo plástico e em seguida, adicionada 200µL de Tampão AL. Posteriormente foram homogeneizadas em vortex por 15 segundos e incubadas em banho-maria por 10 minutos a 56°C. Em seguida, centrifugado para a remoção de bolhas e adicionados 200µL de Etanol 100%.

Novamente foram homogeneizadas em vortex por 15 segundos e o sobrenadante transferido cuidadosamente para um tubo filtro. Depois de centrifugado a 8000rpm por 1 minuto, o filtrado foi descartado. O tubo filtro foi transferido para um tubo coletor novo, adicionado 500µL de Tampão AW1 e centrifugado a 8000rpm por 1min. Novamente o tubo filtro foi colocado em um novo tubo coletor, adicionado 500µL de Tampão AW2 e centrifugado a 14000rpm por 3 minutos. Finalmente, o tubo filtro foi colocado em um tubo de 1,5mL, centrifugado a 14000rpm por 1minuto para a separação do DNA do filtrado que foi descartado juntamente com o tubo coletor. Cuidadosamente foi adicionado 50µL de Tampão AE no tubo filtro e incubado a temperatura ambiente por 1 minuto antes da última centrifugação a 14000rpm por 1 minuto. O DNA foi armazenado a -80°C até a realização da PCR.

Seguindo-se a técnica utilizada por Chang *et al.* (2008), com pequenas modificações, foram utilizados na reação da PCR, 15,2µL de água deionizada (Milli-Q), 0,5µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 0,6µL de magnésio (MgCl₂) e 2µL de tampão da enzima, ao qual foram acrescentados 0,5µL de Taq DNA-polimerase (Invitrogen, San Diego, CA), 0,2µL de cada iniciadores e 1µL de DNA do mosquito, para um volume final de 20µL da reação. Como controles positivos foram utilizados DNA de sangue de cada hospedeiro e, como controle negativo, a água.

As reações foram transferidas para o termociclador Mastercycler, marca Eppendorf com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos consistindo de 94°C por 30 segundos, anelamento a 56-70°C por 30 segundos (temperatura detalhada para cada iniciador listado na tabela 5) e extensão a 72°C por 30 segundos, com uma extensão final de 72°C durante 20 min e mantida a 4°C.

As sequências dos primers específicos, utilizados para a amplificação do DNA do sangue do hospedeiro ingurgitado pelo mosquito, descritos por Kramer (2003), estão apresentadas na tabela 5, a seguir:

Tabela 5 - Ordem de iniciadores específicos de cada grupo utilizados na análise.

Animais	Sequência Forward F: 5'-3'e Reverse R: 3'-5'	Temp. C de anelamento	Pb
Galinha	F: GGGACACCCTCCCCCTTAATGACA R: GGAGGGCTGGAAGAAGGAGTG	69	266
Bovina	F: GCCATATACTCTCCTTGGTGACA R: GTAGGCTTGGGAATAGTACGA	61	271
Cão	F: TTCTCAGGATATACCCTTGACA, R: GAAAGAGCCCATTGAGGAAATC	67	153
Cavalo	F: CCCTAAGCCTCCTAATCCGT R: AGGAATGATGGGGGAAGTAA	56	135
Humano	F: TTCGGCGCATGAGCTGGAGTCC R: TATGCGGGGAAACGCCATATCG	70	228
Ratos	F: CGGCCACCCAGAAGTGTACATC R: GGCTCGGGTGTCTACATCTAGG	67	196

Um volume de 5µL de amostras de produtos de PCR foi aplicado em gel de agarose a 2% com 3µL de Gel Red para visualização dos fragmentos do DNA, amplificados por eletroforese. A corrida do gel ocorreu em tampão TBE 1X em corrente elétrica de 100v por cerca de 45 minutos e visualizadas sob luz UV. A referência do peso molecular utilizado foi o marcador 100 Ladder (Invitrogen).

4.2.6. Análise da taxa de infecção natural de anofelinos, por espécies de *Plasmodium spp.*

A estimativa da taxa de infecção por *Plasmodium ssp.* nas espécies de *Anopheles* também foi realizada por meio da técnica da PCR, descrita por Snounou

et al. (1993). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Malária e Dengue no INPA, em Manaus.

As fêmeas dos mosquitos foram coletadas na primeira semana de cada mês, de janeiro de 2006 a fevereiro de 2011. Foram selecionadas as espécies *A. aquasalis*, *A. darlingi*, *A. albitarsis* l.s., *A. oswaldoi*, *A. triannulatus*, *A. galvaoi* e *A. evansae* de todos os ambientes (intra, peri e extradomicílio) de Buritizinho e Guarapiranga.

A extração do DNA foi realizada utilizando a resina Chelex® Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratórios). As fêmeas tiveram a cabeça e o torax, dissecados com auxílio de estiletos entomológicos e a finalidade desta técnica foi análise da infecção por *Plasmodium* ssp., a partir das glândulas salivares. Em seguida, as fêmeas foram acondicionadas em microtubos de 1,5mL e cada amostra separada em “pools” de 10 exemplares, sempre que possível, considerando a espécie, o local e horários de coleta.

O material foi macerado com auxílio de um pistilo plástico contendo 300µL de Chelex® a 5% diluída em água deionizada (Milli-Q), homogeneizadas em vortex, por aproximadamente 20 segundos e levadas ao banho-maria por 15 minutos. Em seguida foram centrifugadas a 14000rpm por 10 minutos para a precipitação da resina. O sobrenadante contendo o DNA extraído foi transferido para microtubos novos e armazenados a temperatura de -20°C até a realização da PCR.

A reação de semi *nested*-PCR corresponde a duas reações, com um volume total de 20µL, a primeira reação do PCR continha os seguintes reagentes: 13,35µL de água deionizada (Milli-Q), 1,5µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 0,45µL de magnésio (MgCl₂) e 1,5µL de tampão da enzima (10x), ao qual foram acrescentados 0,2µL de Taq DNA-polimerase (Invitrogen, San Diego, CA), 1µL de cada primers e 1µL do DNA extraído do mosquito.

Na segunda reação foi utilizado como molde de oligonucleotídeos específicos, 1µL do produto amplificado da primeira reação. As duas reações foram transferidas para o termociclador Mastercycler, marca Eppendorf programado para desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 minutos, conforme Wilkerson *et al.* (1995), com alterações. Os controles positivos e negativos utilizados foram de DNA de sangue infectado por *Plasmodium* ssp. e água, respectivamente.

As sequências dos primers específicos para o diagnóstico de *Plasmodium* spp., bem como de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, foram descritos por Snounou *et al.* (1993), cujas sequências estão descritas na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6. Sequência dos iniciadores para o gênero *Plasmodium* ssp, usando primers para região 18S do RNA ribossomal.

Primer	Sequência Forward F: 5'-3'e Reverse R: 3'-5'	Pb
rPlu5	F: CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	
rPlu6	R: TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	<i>Plasmodium</i> sp (120pb)
rFal1	F: TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	
rFal2	R: ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	<i>P. falciparum</i> (205 pb)
rViv1	F: CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	
rViv2	R: ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	<i>P. vivax</i> (120pb)

rPlu: *Plasmodium* sp.; rFal: *Plasmodium falciparum*.; rViv: *Plasmodium vivax*; pb: pares de base.

Um volume de 3 μ L da amostra do produto da PCR foi aplicado em gel de agarose a 2% com 3 μ L de Gel Red para visualização dos fragmentos do DNA amplificado. A corrida do gel ocorreu em tampão TBE 1X, em corrente elétrica de 100v por cerca de 45 minutos e visualizadas sob luz UV. A referência do peso molecular utilizado foi o marcador 100 Ladder (Invitrogen).

Através da detecção das espécies de *P. vivax* e *P. falciparum* que circulam nas espécies de *Anopheles* ssp., pela técnica da PCR, foi possível verificar as espécies infectadas, segundo o local e período de coleta e, simultaneamente, à avaliação da taxa de infecção natural.

Para os mosquitos agrupados em “pool” foi calculada a taxa mínima de infecção (TMI), adotando-se a seguinte fórmula adaptada por Forattini (2002): $TMI=N/I$ onde:

N = números de conjuntos positivos ao teste;

I = números totais de *pools* testados de uma espécie.

4.3 Análises estatísticas

A média dos mosquitos adultos coletados nos meses de Janeiro de 2006 até Dezembro de 2011, para os dois ambientes foi interpretada considerando associações com os índices meteorológicos de temperatura média (°C), umidade relativa (%) e precipitação (mm). Para quantificar as associações entre as condições climáticas e a presença das espécies foram obtidas as estimativas de correlação simples e parcial (R Development Core Team 2013).

A significância dos coeficientes de correlação entre as espécies e o ambiente, e entre as espécies de *Anopheles*, foi avaliada pelo teste t, em 5% e 1% de probabilidade (Steel e Torrie, 1980). As estimativas dos coeficientes de correlação parcial foram obtidas utilizando a expressão com uso do programa estatístico Genes[®] (Cruz, 2006).

As médias de frequência dos espécimes de imaturos de *Anopheles* sp., nos dois ambientes (Guarapiranga e Buritizinho) foram submetidas ao teste de médias de Scott Knot, em nível de 5% de probabilidade. Foi submetido à análise de variância ANOVA, considerando a distribuição por eventos raros (distribuição de Poisson). Ambos os testes foram analisados pelo programa estatístico Genes[®], (Cruz, 2006).

Os dados das médias dos adultos por espécie capturados no intra, peri e extradomicílio foram submetidos a testes de ANOVA. Considerou-se os dados inteiramente casualizados, tendo como tratamentos os três ambientes e as repetições nos meses de coleta. Em seguida foram submetidos ao teste de Tukey, em nível de $P \leq 0,05$, para verificar diferenças entre esses ambientes. Os dados foram tabulados e analisados por meio de Excel da Microsoft Office (2007).

V. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Nas coletas realizadas nos dois municípios coletou-se 09 espécies de *Anopheles* Meigen, (1818), pertencentes ao Subgênero *Nyssorhynchus*. No município de Buriticupu a amostra totalizou 2.832 espécimes adultos e 130 na forma imatura, enquanto que no município de São José de Ribamar foram coletados 75 indivíduos alados e 62 imaturos (larvas). As espécies capturadas foram:

Subgênero *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902

Anopheles darlingi Root, 1926

Anopheles aquasalis Curry, 1932

*Anopheles albitarsis*¹ Lynch Arribálzaga, 1878

*Anopheles nuneztovari*¹ Gabaldón, 1940

*Anopheles oswaldoi*¹ (Peryassú, 1922)

*Anopheles triannulatus*¹ (Neiva & Pinto, 1922)

Anopheles galvaoi Causey, Deane e Deane, 1943

Anopheles strodei Roots, 1926

Anopheles evansae (Brèthes, 1926)

¹ Estas espécies não foram diferenciadas quanto aos membros dos complexos a que pertencem e são referenciadas, portanto como *lato sensu*.

5.1 Município de Buriticupu

5.1.1 Coletas de adultos

Na Tabela 7, constam os resultados obtidos com as capturas das espécies de *Anopheles spp.*, na forma adulta, no intradomicílio, considerando 12 horas de observação, das 18h até às 6h da manhã do dia seguinte. Observaram-se dois picos de atividade, sendo o primeiro ao anoitecer, entre 18h e 21h, e o outro no amanhecer, entre 04h e 06h da manhã.

Considerando os dados mensais no intradomicílio observa-se que no mês de março foram coletados 224 (37,25%) indivíduos, em abril 117 (19,63%) e maio com 122 (20,46%). Dentre os espécimes capturados, *A. darlingi* e *A. albitarsis* estiveram

presentes durante todos os meses de coleta. Na estação chuvosa (Janeiro a Junho), foram coletados 495 exemplares (83,05%) de anofelinos, enquanto que na estação seca (Julho a Dezembro) apenas 101 (16,95%) (Tabela 8).

Tabela 7 - Incidência das espécies de *Anopheles* spp. coletadas, por horário, no intradomicílio, município de Buriticupu, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.

ESPÉCIES	INTERVALO DE HORÁRIOS (horas)												TOTAL	%
	18 19	19 20	20 21	21 22	22 23	23 00	00 01	01 02	02 03	03 04	04 05	05 06		
<i>A. darlingi</i>	98	152	58	10	4	8	2	1	2	5	19	30	389	63,75
<i>A. albitarsis</i>	26	94	20	5	2	0	0	0	0	0	4	5	156	26,17
<i>A. oswaldoi</i>	9	12	9	0	0	0	0	0	0	0	3	6	39	6,54
<i>A. nuneztovari</i>	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,83
<i>A. aquasalis</i>	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,67
<i>A. galvaoi</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,50
TOTAL	135	265	89	16	6	8	2	1	2	5	26	41	596	100,00

Tabela 8 - Incidência mensal das espécies de *Anopheles* spp. coletadas no intradomicílio, município de Buriticupu, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.

ESPÉCIES	MESES												TOTAL	%
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez		
<i>A. darlingi</i>	1	3	140	96	98	10	5	5	2	9	12	8	389	63,75
<i>A. albitarsis</i>	6	4	58	14	12	2	6	4	12	20	8	10	156	26,17
<i>A. oswaldoi</i>	3	1	20	5	10	0	0	0	0	0	0	0	39	6,54
<i>A. nuneztovari</i>	1	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	5	0,83
<i>A. aquasalis</i>	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	4	0,67
<i>A. galvaoi</i>	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0,50
TOTAL	11	8	224	117	122	13	11	9	14	29	20	18	596	100,00
ESTAÇÃO CHUVOSA: 495 (83,05%)						ESTAÇÃO SECA: 101 (16,95%)								

No peridomicílio foram coletados 1.636 anofelinos nos horários entre 18h e 06h da manhã. Os exemplares de *A. darlingi* e *A. albitarsis* estiveram presentes em todos os horários de coleta. Semelhante ao padrão observado no intradomicílio, no peridomicílio também foi observado o pico bimodal, onde as espécies estiveram mais frequentes no início da noite e outro ao amanhecer em menor densidade (Tabela 9).

Tabela 9 - Incidência das espécies de *Anopheles* spp. coletadas, por horário, no peridomicílio, do município de Buriticupu, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.

ESPÉCIES	INTERVALO DE HORÁRIOS (horas)												TOTAL	%
	18 19	19 20	20 21	21 22	22 23	23 00	00 01	01 02	02 03	03 04	04 05	05 06		
<i>A. darlingi</i>	202	590	58	20	12	6	14	8	9	8	60	43	1.030	63,59
<i>A. albitarsis</i>	98	140	30	8	6	2	10	6	2	16	10	20	348	22,96
<i>A. oswaldoi</i>	30	25	10	8	0	0	0	0	0	0	2	10	85	5,67
<i>A. nuneztovari</i>	12	16	2	1	0	0	0	0	0	0	4	6	41	2,53
<i>A. evansae</i>	30	42	6	4	0	0	0	0	0	0	2	8	92	5,23
<i>A. galvaoi</i>	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0,63
<i>A. aquasalis</i>	0	10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0,59
<i>A. strodei</i>	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	0,45
<i>A. triannulatus</i>	2	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	0,35
TOTAL	381	836	110	41	18	8	24	14	11	24	78	91	1.636	100,00

Considerando os dados obtidos no período de estudo (2006 a 2009), observou-se a presença de *A. darlingi* em todos os meses do ano e para *A. albitarsis* o mesmo padrão com exceção do mês de Novembro. Dentre os meses de coleta os que tiveram abundância relativa maior foram março com 826 espécimes (50,89%), abril com 260 (16,01%) e outubro com 136 (8,37%). No período chuvoso teve maior frequência do *A. darlingi* com 1.308 (79,95 %), correspondendo a mais de 50% da amostra total. Enquanto que na estação seca coletou-se apenas 328 (20,21%) (Tabela 10).

No extradomicílio observou-se que *A. darlingi* ocorreu a noite inteira (63,62%). *A. albitarsis* teve maior pico entre 18 e 20h igualmente ao ocorrido para *A. nuneztovari*, *A. oswaldoi* e *A. galvoi*. As maiores densidades de anofelinos foram registradas entre 18 e 23h e houve também uma elevação da densidade entre 5 e 6h. (Tabela 11).

A análise da distribuição mensal das espécies de *Anopheles* no ambiente extradomiciliar permite destacar que *A. darlingi* e *A. albitarsis* estiveram presentes durante todos os meses dos anos de coleta, sendo a primeira a mais frequente neste ambiente. O mês que registrou a maior abundância de anofelinos foi março com 213 exemplares, seguido por outubro com 99, abril com 80 e maio com 74 (Tabela 12).

Tabela 10 - Incidência mensal das espécies de *Anopheles* spp. coletadas no peridomicílio do município de Buriticupu no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.

ESPÉCIES	MESES												TOTAL	%	
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez			
<i>A.darlingi</i>	38	26	490	201	56	20	12	15	8	64	38	62	1.030	63,59	
<i>A.albitarsis</i>	8	10	230	42	8	5	15	10	8	8	0	4	348	22,96	
<i>A.oswaldoi</i>	10	5	45	2	8	1	4	0	0	5	0	5	85	5,67	
<i>A.evansae</i>	0	0	35	0	15	0	0	0	0	42	0	0	92	5,23	
<i>A.nuneztovari</i>	0	0	12	5	3	0	0	0	0	10	0	11	41	2,53	
<i>A.galvaei</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	0	2	0	0	5	0,63	
<i>A.aquasalis</i>	0	0	0	4	9	0	0	0	0	0	0	0	13	0,59	
<i>A.strodei</i>	0	0	8	2	0	0	0	0	0	2	0	0	12	0,45	
<i>A.triannulatus</i>	0	0	4	3	0	0	0	0	0	3	0	0	10	0,35	
TOTAL	56	41	826	260	99	26	31	25	16	136	38	82	1.636	100,00	
ESTAÇÃO CHUVOSA				1.308 (79,95%)				ESTAÇÃO SECA				328 (20,05%)			

Tabela 11 - Incidência das espécies de *Anopheles* spp. coletadas, por horário, no extradomicílio do município de Buriticupu, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.

ESPÉCIES	INTERVALO DE HORÁRIOS (horas)												TOTAL	%
	18	19	20	21	22	23	0	1	2	3	4	5		
	19	20	21	22	23	0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. darlingi</i>	96	152	54	12	20	4	6	8	5	8	2	23	390	63,62
<i>A.albitarsis</i>	28	82	12	8	4	6	5	0	0	0	0	4	149	24,3
<i>A.oswaldoi</i>	2	26	2	4	0	0	0	0	0	0	0	3	37	6,04
<i>A.nuneztovari</i>	2	10	4	2	3	0	0	0	0	0	2	3	26	4,25
<i>A.galvaei</i>	2	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	1,63
<i>A.strodei</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,16
TOTAL	130	275	74	26	27	10	11	8	5	8	4	35	613	100

Tabela 12 - Incidência mensal das espécies de *Anopheles* spp. coletadas no extradomicílio do município de Buriticupu, no período de janeiro 2006 a dezembro de 2011.

ESPÉCIES	MESES												TOTAL	%									
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez											
<i>A. darlingi</i>	12	8	158	52	36	14	4	6	12	60	8	20	390	63,62									
<i>A. albitarsis</i>	6	4	26	14	20	10	2	4	8	32	10	13	149	24,3									
<i>A. oswaldoi</i>	0	0	12	8	16	0	1	0	0	0	0	0	37	6,04									
<i>A. strodei</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,16									
<i>A. nuneztovari</i>	0	0	12	4	0	0	4	0	0	5	0	1	26	4,25									
<i>A. galvaei</i>	0	0	4	2	2	0	0	0	0	2	0	0	10	1,63									
TOTAL	18	12	213	80	74	24	11	10	20	99	18	34	613	100									
ESTAÇÃO CHUVOSA						421 (68,68%)						ESTAÇÃO SECA						192 (31,32%)					

Considerando-se os três ambientes de coleta – intra, peri e extradomicílio, na Tabela 9, constam os dados da abundância relativas das espécies em Buriticupu. No intradomicílio foram capturados 6 espécies com um total de 596 exemplares, sendo 389 (65,27%) de *A. darlingi*, 156 (26,18%) de *A. albitarsis* e 39 (6,54%) de *A. oswaldoi*. Outras espécies foram encontradas com menor proporção: *A. nuneztovari* (0,84%), *A. aquasalis* (0,67%) e *A. galvoi* (0,50%) (Tabela 13).

No peridomicílio capturou-se 9 espécies com um total de 1.636 exemplares. Destes, 1.030 (62,96%) de *A. darlingi*, 348 (21,28%) de *A. albitarsis*. Outras espécies ocorreram em menor proporção semelhante ao observado no peridomicílio (Tabela 13).

No extradomicílio foram 6 espécies com 613 exemplares capturados. As mais abundantes foram *A. darlingi* com 390 (63,62%) espécimes, *A. albitarsis* com 149 (24,30%) exemplares, *A. oswaldoi* com 37 (6,04%) e *A. nuneztovari* com 26 (4,25%). Também no extradomicílio foram registradas espécies em menor proporção (Tabela 13).

Tabela 13 - Incidência das espécies de *Anopheles* spp. capturadas nos três ambientes, município de Buriticupu, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.

ESPÉCIES	AMBIENTES			TOTAL	%
	INTRADOMICILIO	PERIDOMICILIO	EXTRADOMICILIO		
<i>A. darlingi</i>	389 (65,27%)	1.030 (62,96%)	390 (63,62%)	1.809	63,59
<i>A. albitarsis</i>	156 (26,18%)	348 (21,28%)	149 (24,30%)	653	22,96
<i>A. oswaldoi</i>	39 (6,54%)	85 (5,19%)	37 (6,04%)	161	5,67
<i>A. evansae</i>	0	92 (5,63%)	0	92	3,23
<i>A. nuneztovari</i>	5 (0,84%)	41 (2,50%)	26 (4,25%)	72	2,53
<i>A. galvai</i>	3 (0,50%)	5 (0,30%)	10 (1,63%)	18	0,63
<i>A. aquasalis</i>	4 (0,67%)	13 (0,79%)	0	17	0,59
<i>A. strodei</i>	0	12 (0,73%)	1 (0,16%)	13	0,45
<i>A. triannulatus</i>	0	10 (0,62%)	0	10	0,35
TOTAL	596 (100,00%)	1.636 (100,00%)	613 (100,00%)	2.845	100,00%

Na Figura 10 consta a representação gráfica da abundância relativa das espécies de *Anopheles* em cada ano. *A. darlingi* mais abundante (1.808 exemplares) e foi a única espécie capturada em todos os anos de coleta. Em 2009 houve um declínio do número de espécimes, onde somente foi observada a presença de *A. darlingi* (64 exemplares) na localidade.

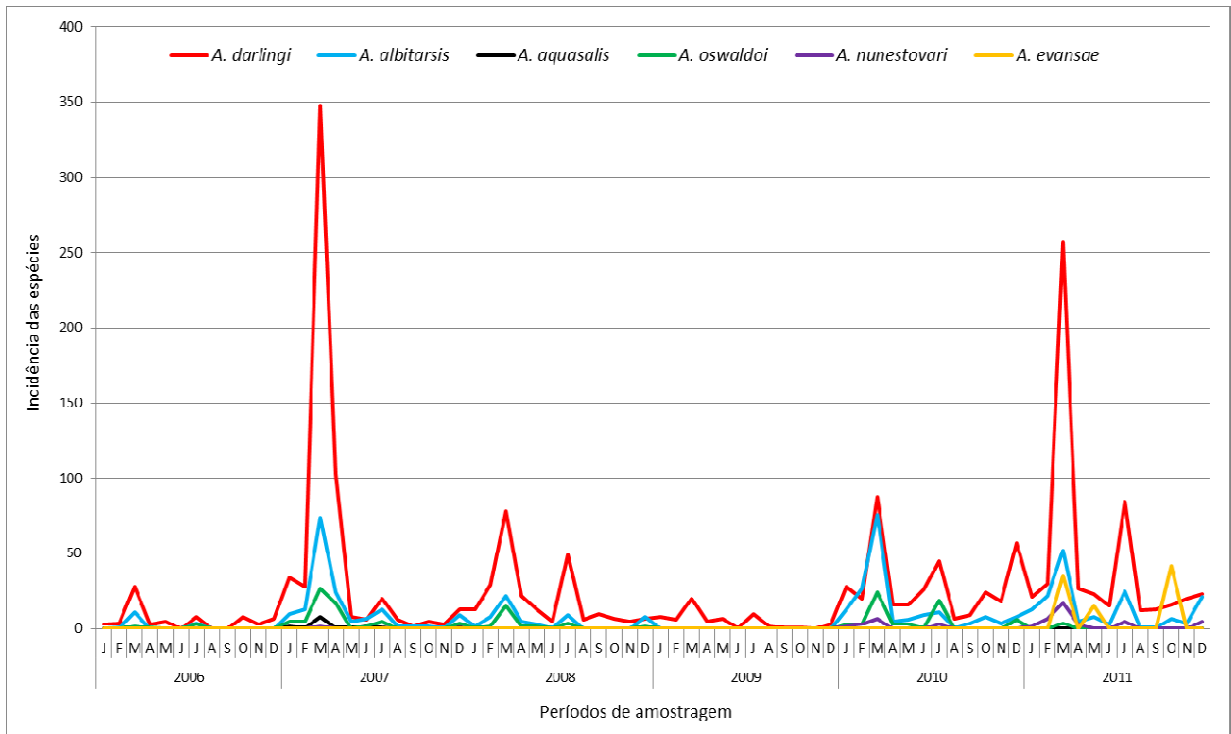


Figura 10 - Representação gráfica da incidência das espécies de *Anopheles* nos ambientes intra, peri e extradomicílio, durante janeiro de 2006 a dezembro de 2011, Município de Buriticupu, Estado do Maranhão, Brasil.

5.1.2 Coletas de imaturos

Foram inspecionados três criadouros, sendo dois positivos para a presença de anofelinos, dos quais foram coletadas 130 larvas de *Anopheles*. Em um dos criadouros foram coletadas 123 larvas de anofelinos, sendo 76 exemplares de *A. darlingi*, 29 de *A. albitarsis*, 11 de *A. nuneztovari*, 5 de *A. oswaldoi* e 2 *A. aquasalis*. *A. darlingi* foi o mais abundante representando 61,69% da amostragem. No segundo criadouro foram coletados 7 exemplares de imaturos, sendo 3 de *A. albitarsis*, 2 de *A. darlingi* e 1 exemplar cada de *A. oswaldoi* e *A. nuneztovari*. (Tabela 14).

No criadouro 2 foram coletados 7 exemplares de imaturos distribuídos 2 (28,57%) *A. darlingi*, 3 (42,85%) *A. albitarsis*, 1 (14,29%) *A. oswaldoi* e 1 (14,29%) *A. nuneztovari*. No criadouro 3 não foi registrada a presença de imaturos (Tabela 14).

Tabela 14 - Incidência das espécies de *Anopheles* spp. no estágio imaturo coletadas em criadouros no município de Buriticupu, de janeiro a dezembro de 2009.

ESPÉCIES/CRIDADOUROS	CRIDADOURO 1	CRIDADOURO 2	CRIDADOURO 3	TOTAL	%
<i>A. darlingi</i>	76(61,69%)	2 (28,57%)	0	78	60,0
<i>A. albitarsis</i>	29 (23,59%)	3 (42,85%)	0	32	24,6
<i>A. nuneztovari</i>	11(8,94)	1 (14,29%)	0	12	9,2
<i>A. oswaldoi</i>	5 (4,06%)	1 (14,29%)	0	6	4,6
<i>A. aquasalis</i>	2(1,62%)	0	0	2	1,5
TOTAL	123 (100,00)	07 (100,00)	0	130	100,00

5.2 Município de São José de Ribamar

5.2.1 Coletas de adultos

Na Tabela 15 constam os dados da incidência das espécies de *Anopheles* capturadas, na forma adulta, no peridomicílio, considerando 12 horas de observação, das 18h até às 6h da manhã do dia seguinte. A densidade anofélica foi muito baixa nesta localidade, não permitindo identificar picos maiores de atividades em horários específicos. *A. aquasalis* foi a espécie mais frequente (46,5%), seguida por *A. albitarsis* (31%). Foram registrados 4 exemplares de *A. darlingi*, sendo 2 entre 21-22h e mais 2 ao amanhecer entre 4-5h.

Tabela 15 - Incidência das espécies de *Anopheles* spp. coletadas, por horário, no peridomicílio, município de São José de Ribamar, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.

ESPÉCIES	INTERVALO DE HORÁRIOS (HORAS)												TOTAL	%
	18	19	20	21	22	23	0	1	2	3	4	5		
	19	20	21	22	23	0	1	2	3	4	5	6		
<i>A. aquasalis</i>	3	5	0	0	3	0	10	0	5	6	1	0	33	46,5
<i>A. albitarsis</i>	0	2	0	2	6	5	2	0	1	0	4	0	22	31,0
<i>A. oswaldoi</i>	0	0	2	0	5	0	0	0	2	0	0	0	9	12,7
<i>A. darlingi</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	4	5,6
<i>A. nuneztovari</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	4,2
TOTAL	3	7	2	4	14	5	12	0	8	7	8	1	71	100,00

Foram coletados 71 exemplares, sendo: 33 (46,48%) de *A. aquasalis*, 22 (30,99%) de *A. albitarsis*, 9 (12,68%) de *A. oswaldoi*, 4 (5,63%) de *A. darlingi* e 3

(4,23%) de *A. nuneztovari*. Em relação às frequências mensais, os maiores valores foram registrados no segundo semestre dos anos (Tabela 16).

Tabela 16 - Incidência mensal das espécies de *Anopheles* spp. coletadas no peridomicílio do município de São José do Maranhão, no período de janeiro 2006 a dezembro de 2011.

ESPÉCIES	MESES												TOTAL	%
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez		
<i>A. aquasalis</i>	1	0	1	0	2	15	0	0	9	1	1	3	33	46,48
<i>A. albitarsis</i>	1	0	0	0	0	3	0	0	0	2	7	9	22	30,99
<i>A. oswaldoi</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	2	3	1	1	9	12,68
<i>A. darlingi</i>	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	1	4	5,63
<i>A. nuneztovari</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	3	4,23
TOTAL	2	0	1	0	2	22	0	2	13	6	9	14	71	100,00

Em São José de Ribamar, chama-se atenção o fato das coletas terem sido positivas apenas no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2008. Não foram realizadas coletas no extradomicílio pelo fato do ambiente não existir na área por se tratar de uma localidade situada a beira-mar. Foram coletados 75 exemplares, sendo que 71 foram encontrados no peridomicílio e 4 no intradomicílio. *A. aquasalis* foi a mais frequente (46,67%), seguida por *A. albitarsis* (30,67%) e *A. oswaldoi* (12,00%). No intradomicílio coletou-se 4 indivíduos sendo 2 *A. aquasalis*, 1 exemplar cada de *A. darlingi* e *A. albitarsis*. Esses exemplares foram capturados entre 1 e 4 horas da manhã (Tabela 17).

Tabela 17 - Incidência das espécies de *Anopheles* spp. capturadas em dois ambientes, município de São José de Ribamar, no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2011.

ESPÉCIES	AMBIENTES		TOTAL	%
	INTRADOMICÍLIO	PERIDOMICÍLIO		
<i>A. aquasalis</i>	2	33	35	46,67
<i>A. albitarsis</i>	1	22	23	30,67
<i>A. oswaldoi</i>	0	9	9	12,00
<i>A. darlingi</i>	1	4	5	6,67
<i>A. nuneztovari</i>	0	3	3	4,00
TOTAL	4 (5,33%)	71 (94,67%)	75	100,00

A incidência das espécies de *Anopheles* em São José de Ribamar foi muito baixa, sendo que a maioria dos exemplares foi de *A. aquasalis* e *A. albitarsis*

ocorrendo principalmente no último mês do primeiro semestre – junho, e no período de setembro a dezembro do segundo semestre (Figura 11).

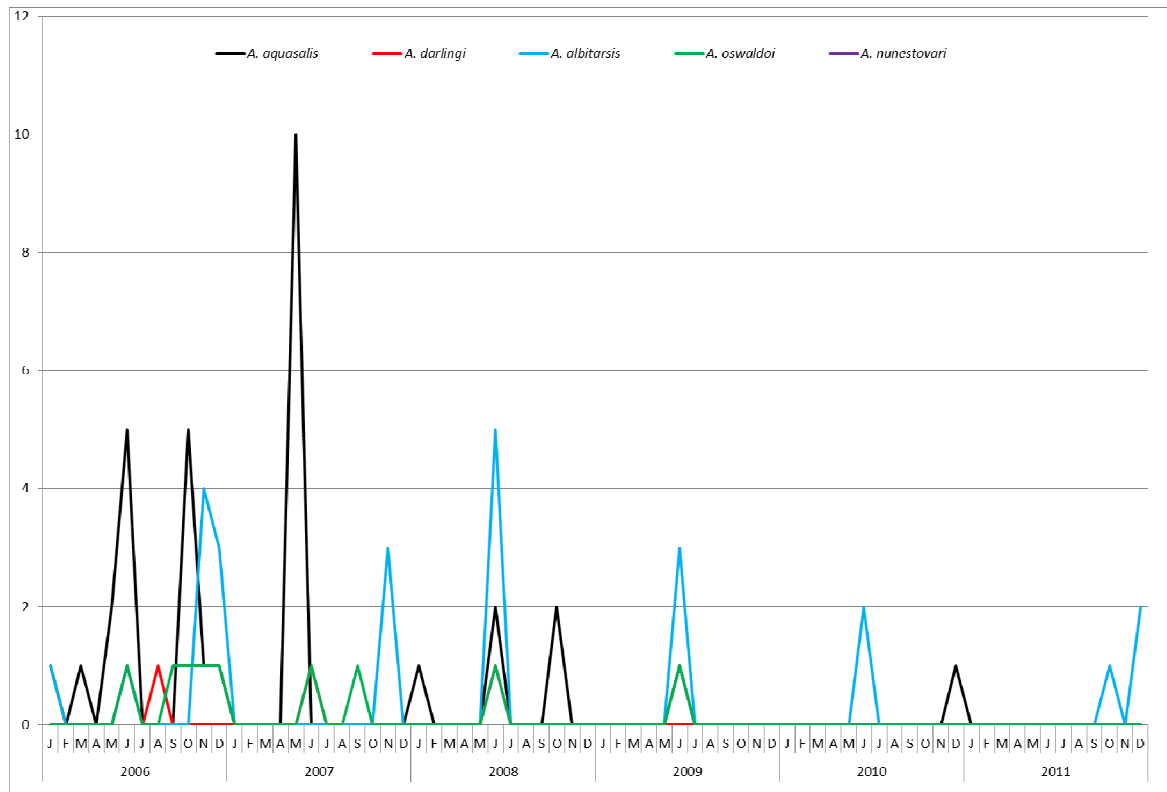


Figura 11 - Representação gráfica da incidência das espécies de *Anopheles* nos ambientes intra e peridomicílio, durante janeiro de 2006 a dezembro de 2011, município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, Brasil.

5.2.2 Coletas de imaturos

Foram inspecionados 3 criadouros, sendo que apenas um foi positivo para larvas de *Anopheles*. Todos os indivíduos coletados estavam na forma larvária. Foram capturadas 62 larvas, sendo 38 de *A. aquasalis* (61,29%), 14 de *A. albitarsis* (22,59%), 6 de *A. nuneztovari* (9,67%) e 4 de *A. oswaldoi* (6,45%) (Tabela 18).

Tabela 18 - Incidência das espécies de *Anopheles* no estágio imaturo coletadas em criadouros no município de São José de Ribamar, de janeiro a junho de 2007.

ESPÉCIES/CRIDADOUROS	CRIDADOURO 1	CRIDADOURO 2	CRIDADOURO 3	TOTAL	%
<i>A. aquasalis</i>	38 (61,29%)	0	0	38	61,29
<i>A. albitarsis</i>	14 (22,59%)	0	0	14	22,58
<i>A. nuneztovari</i>	6 (9,67%)	0	0	6	9,68
<i>A. oswaldoi</i>	4 (6,45%)	0	0	4	6,45
TOTAL	62 (100,00)	0	0	62	100,00

5.3 Análises estatísticas de correlações de adultos e imaturos de *Anopheles* spp.

5.3.1 Município de Buriticupu

Os dados obtidos em Buriticupu para as correlações parciais entre as variáveis climáticas e as espécies de *Anopheles* spp., estão disponíveis na Tabela 19. Apenas *A. darlingi* apresentou correlação significativa, sendo esta para a precipitação, cujas respostas acusaram tendência positiva para a variável climática. *A. darlingi* em Buriticupu foi dependente da precipitação para sua ocorrência. Durante os meses de estudo foi perceptível à ocorrência de *A. darlingi* associado a períodos chuvosos, quando o ambiente oferece condições para proliferação da espécie (Figura 12).

Detectou-se ainda que *A. darlingi* coexiste positivamente significativo com *A. albitarsis*, *A. oswaldoi*, *A. nuneztovari* e *A. evansae* em Buriticupu. No entanto, *A. albitarsis* foi dominante sobre as mesmas espécies, com exceção de *A. darlingi*. Este comportamento revela o potencial de *A. darlingi* como vetor principal no ambiente e o *A. albitarsis* como vetor associado (Tabela 20).

Com relação aos ambientes *A. darlingi* foi mais abundante no peridomicílio diferindo significativamente do intradomicílio e do extradomicílio, igualmente ao *A. albitarsis*. Para as demais espécies não houve diferenças significativas entre as frequências nos três ambientes estudados (Tabela 21).

Tabela 19 - Estimativas de correlação parcial entre fatores climáticos e ocorrência de adultos das espécies de *Anopheles* spp. no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2006-2011.

Pares de variáveis	r simples	r parcial	t	Probabilidade
TempMed x <i>A. darlingi</i>	-0,06	0,0001	0.0008ns	99,4708
TempMed x <i>A. albitarsis</i>	-0,09	-0,0479	-0.3778ns	70,8115
TempMed x <i>A. oswaldoi</i>	-0,04	-0,0491	-0.3867ns	70,1942
TempMed x <i>A. strodei</i>	0,14	0,1494	1.1897ns	23,6966
TempMed x <i>A. nuneztovari</i>	-0,1	-0,0334	-0.2634ns	78,9111
TempMed x <i>A. galvaoi</i>	0,01	0,0358	0.2818ns	77,5759
TempMed x <i>A. evansae</i>	0,27	0,1753	1.4023ns	16,2118
Precip x <i>A. darlingi</i>	0,34	0,2723	2.2282*	2,7958
Precip x <i>A. albitarsis</i>	0,19	-0,088	-0.6955ns	50,37
Precip x <i>A. oswaldoi</i>	0,17	0,0713	0.5629ns	58,2459
Precip x <i>A. strodei</i>	-0,07	-0,0437	-0.3443ns	73,1444
Precip x <i>A. nuneztovari</i>	-0,02	-0,1015	-0.8033ns	56,9712
Precip x <i>A. galvaoi</i>	0,16	0,119	0.9434ns	64,8407
Precip x <i>A. evansae</i>	0,04	-0,0511	-0.4031ns	69,0654
UR x <i>A. darlingi</i>	0,1	0,1088	0.8616ns	60,3463
UR x <i>A. albitarsis</i>	0,07	-0,05	-0.3943ns	69,6746
UR x <i>A. oswaldoi</i>	-0,09	-0,1395	-1.1089ns	27,1245
UR x <i>A. strodei</i>	0,08	0,1623	1.2951ns	19,7148
UR x <i>A. nuneztovari</i>	0,21	0,1512	1.2047ns	23,0956
UR x <i>A. galvaoi</i>	0,05	0,0924	0.731ns	52,5915
UR x <i>A. evansae</i>	-0,21	-0,1947	-1.5628ns	11,91

Legenda: ns = não significativo / ** ou * = significativo

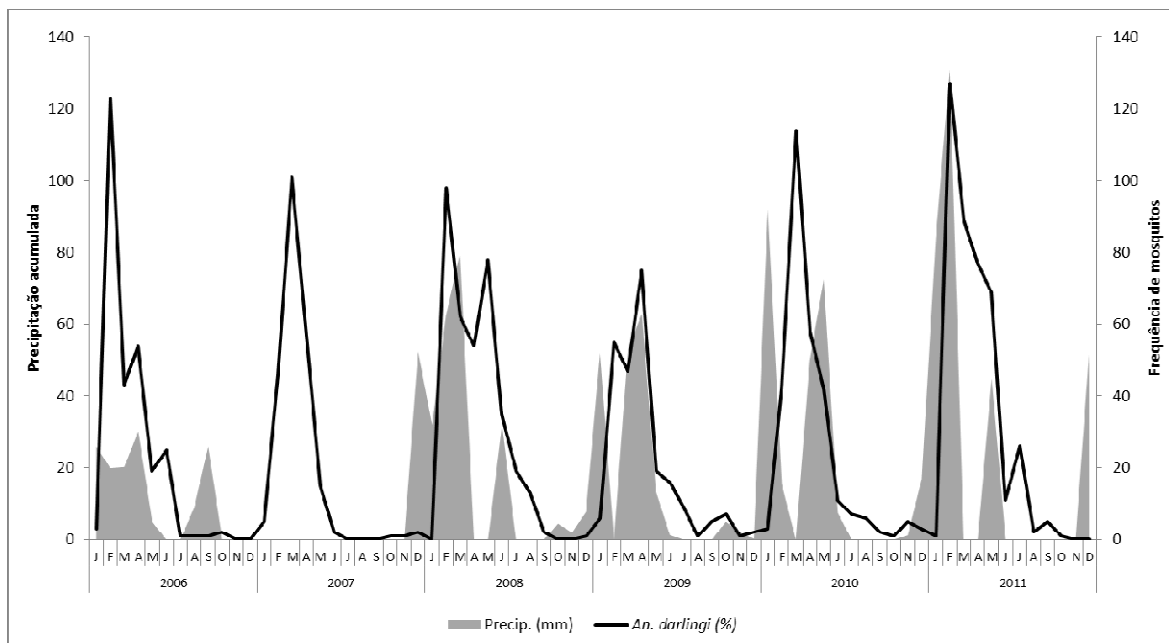


Figura 12 - Frequência mensal de adultos *A. darlingi* correlacionada positivamente com a precipitação ($P \leq 0,05$) no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2006-2011.

Tabela 20 - Estimativas de correlação parcial entre adultos das espécies de *Anopheles* spp. (coexistência) no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2006-2011.

PARES DE VARIÁVEIS	r SIMPLES	r PARCIAL	t	PROBABILIDADE
<i>A. darlingi</i> x <i>A. albitarsis</i>	0,72	0,776	9.6873**	0,00001
<i>A. darlingi</i> x <i>A. oswaldoi</i>	0,17	0,295	2.4314*	1,7134
<i>A. darlingi</i> x <i>A. strodei</i>	0	-0,0279	-0.2201ns	82,131
<i>An. darlingi</i> x <i>A. nuneztovari</i>	0,21	0,3746	3.1814**	0,2417
<i>A. darlingi</i> x <i>A. galvaoi</i>	0,07	0,0998	0.7898ns	56,1646
<i>An. darlingi</i> x <i>A. evansae</i>	0,21	0,362	3.0576**	0,3388
<i>A. albitarsis</i> x <i>A. oswaldoi</i>	-0,02	-0,2564	-2.0889*	3,8655
<i>A. albitarsis</i> x <i>A. strodei</i>	0,02	0,0388	0.3057ns	75,8651
<i>A. albitarsis</i> x <i>A. nuneztovari</i>	-0,04	-0,3264	-2.7193**	0,8291
<i>A. albitarsis</i> x <i>A. galvaoi</i>	-0,03	-0,1181	-0.9365ns	64,4759
<i>A. albitarsis</i> x <i>A. evansae</i>	0	-0,2684	-2.1938*	3,0314
<i>A. oswaldoi</i> x <i>A. strodei</i>	-0,08	-0,023	-0.1815ns	85,0987
<i>A. oswaldoi</i> x <i>A. nuneztovari</i>	-0,01	-0,0967	-0.765ns	54,6767
<i>A. oswaldoi</i> x <i>A. galvaoi</i>	0,07	0,0172	0.1357ns	88,7787
<i>A. oswaldoi</i> x <i>A. evansae</i>	-0,07	-0,1797	-1.4382ns	15,1545
<i>A. strodei</i> x <i>A. nuneztovari</i>	-0,02	-0,0351	-0.2762ns	77,9814
<i>A. strodei</i> x <i>A. galvaoi</i>	-0,09	-0,0937	-0.7413ns	53,2293
<i>A. strodei</i> x <i>A. evansae</i>	0,14	0,1341	1.0657ns	29,0937
<i>A. nuneztovari</i> x <i>A. galvaoi</i>	-0,07	-0,1215	-0.9641ns	65,9329
<i>A. nuneztovari</i> x <i>A. evansae</i>	0,01	-0,0696	-0.549ns	59,1715
<i>A. galvaoi</i> x <i>A. evansae</i>	0,03	0,0134	0.1057ns	91,2711

Legenda: ns = não significativo / ** ou * = significativo

Tabela 21 - Valores da frequência média de mosquitos do gênero *Anopheles* spp. por ambientes no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2006 a 2011.

ESPÉCIES	INTRADOMICÍLIO		PERIDOMICÍLIO		EXTRADOMICÍLIO		ANOVA	
	\bar{x}	DP (±)	\bar{x}	DP (±)	\bar{x}	DP (±)	F	CV (%)
<i>A. darlingi</i>	5,51b	4,99	12,75a	9,86	7,42ab	5,24	4,95*	48,22
<i>A. albitarsis</i>	2,00ab	1,79	4,67a	3,57	1,25b	1,07	6,50*	65,38
<i>A. aquasalis</i>	0,06a	0,12	0,18a	0,40	0,00a	0,00	1,00	288,44
<i>A. oswaldoi</i>	0,44a	0,53	1,32a	1,36	0,53a	0,50	3,32	84,90
<i>A. strodei</i>	0,00a	0,00	0,00a	0,00	0,01a	0,03	1,00	424,26
<i>A. nuneztovari</i>	0,07a	0,07	0,43a	0,67	0,28a	0,46	1,69	131,09
<i>A. trianullatus</i>	0,03a	0,04	0,08a	0,12	0,04a	0,09	1,54	112,13
<i>A. galvaoi</i>	0,07a	0,12	0,14a	0,17	0,10a	0,14	1,33	73,83
<i>A. evansae</i>	0,00a	0,00	1,28a	2,86	0,00a	0,00	1,00	424,26

Nas médias letras iguais entre si não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de $P \leq 0,05$; DP= desvio padrão; F= valor de ANOVA; CV= coeficiente de variação. *significativo estatisticamente pelo teste de ANOVA em nível de $P \leq 0,05$.

5.3.2 Município de São José de Ribamar

Os resultados das correlações parciais entre variáveis climáticas (temperatura, umidade relativa e precipitação) e a frequência de adultos das espécies de *Anopheles* spp. em São José de Ribamar estão disponíveis na Tabela 22. As correlações foram significativas apenas para precipitação e a presença de *A. albitarsis* e a precipitação e *A. aquasalis*, indicando que estas duas espécies tem relação positiva com a ocorrência de chuva.

Observa-se no gráfico da Figura 13 que a frequência das duas espécies está relacionada aos períodos chuvosos, os quais são mais frequentes nos três primeiros meses do ano, quando os criadouros se formam e oferecem condições ideais para proliferação das espécies.

Tabela 22 - Estimativas de correlação parcial entre fatores climáticos e ocorrência de adultos das espécies de *Anopheles* spp. no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, 2006-2011.

PARES DE VARIÁVEIS	r SIMPLES	r PARCIAL	t	PROBABILIDADE
TempMed x <i>A. darlingi</i>	-0,10	0,0165	0.1318ns	89,0997
TempMed x <i>A. albitarsis</i>	-0,10	-0,0707	-0.567ns	57,9678
TempMed x <i>A. aquasalis</i>	-0,11	-0,1713	-1.3907ns	16,5481
TempMed x <i>A. oswaldoi</i>	0,01	0,0018	0.0144ns	98,5492
TempMed x <i>A. nuneztovari</i>	0,08	0,0481	0.3854ns	70,2813
Precip x <i>A. darlingi</i>	0,55	-0,2206	-1.8094ns	7,1587
Precip x <i>A. albitarsis</i>	0,65	0,4257	3.7632**	0,0456
Precip x <i>A. aquasalis</i>	0,51	0,3409	2.9005**	0,5117
Precip x <i>A. oswaldoi</i>	-0,03	0,035	0.2805ns	77,6724
Precip x <i>A. nuneztovari</i>	0,03	0,0165	0.1316ns	89,1131
UR x <i>A. darlingi</i>	-0,05	-0,0173	-0.1387ns	88,5285
UR x <i>A. albitarsis</i>	-0,06	0,0287	0.2299ns	81,3889
UR x <i>A. aquasalis</i>	-0,23	-0,2221	-1.8227ns	6,9585
UR x <i>An. oswaldoi</i>	0,13	0,1442	1.1662ns	24,6475
UR x <i>An. nuneztovari</i>	-0,09	-0,1232	-0.9936ns	67,4717

n.s. = não significativo / ** = significativo

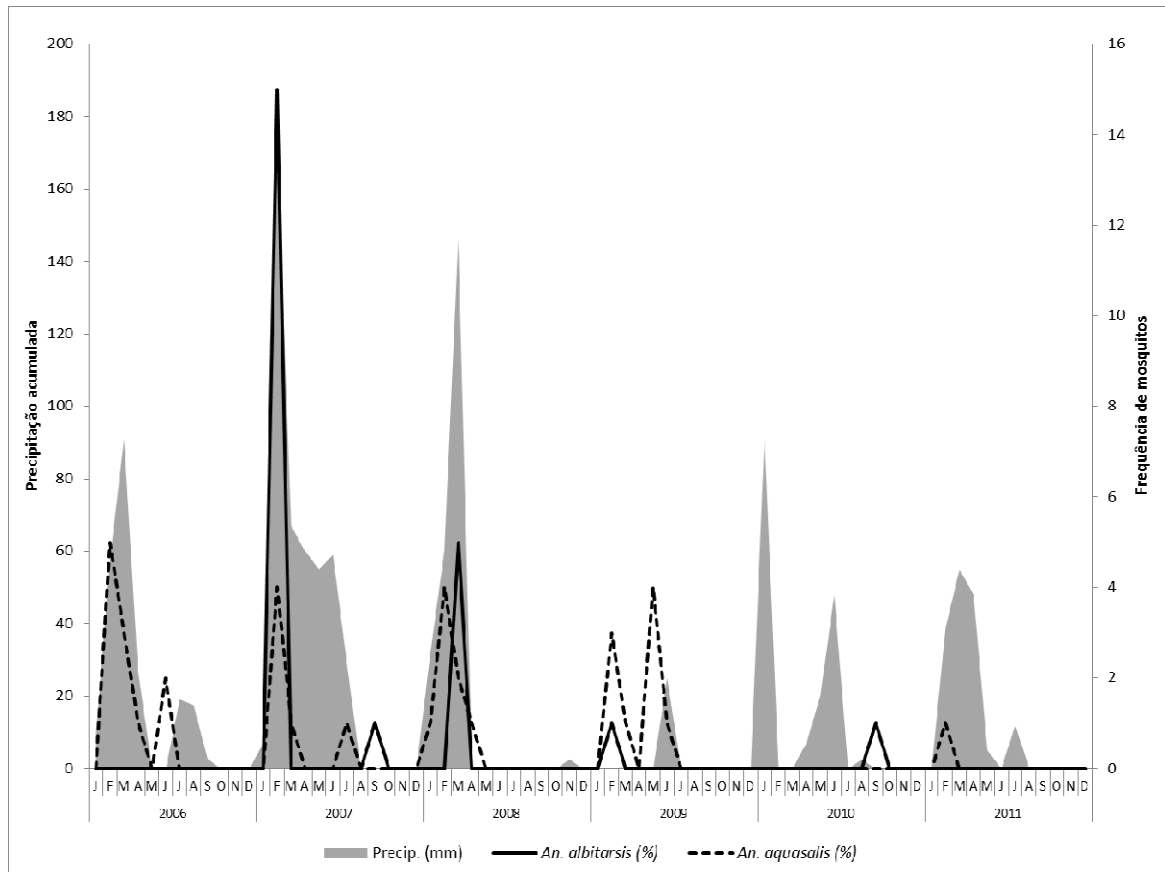


Figura 13 - Frequência mensal entre adultos de *A. albitarsis* e *A. aquasalis* correlacionadas positivamente com a precipitação ($P \leq 0,05$) no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, 2006-2011.

Os dados de correlação calculados para todas as alternativas de coexistência das espécies foram significativos para *A. darlingi* e *A. albitarsis*, e entre *A. oswaldoi* e *A. nuneztovari*. As espécies *A. darlingi* e *A. albitarsis* coexistem naquela localidade de forma positiva entre os ambientes avaliados, da mesma forma que *A. oswaldoi* e *A. nuneztovari* (Tabela 23).

Com relação aos ambientes estudados em São José de Ribamar não foram detectadas diferenças significativas entre a frequência das espécies na localidade, uma vez que o número de espécimes capturados foi reduzido (Tabela 24).

Os dados relativos às formas imaturas foram analisados considerando os dois municípios. Diferenças significativas foram encontradas entre os criadouros de Buriticupu e São José de Ribamar em duas espécies, sendo *A. darlingi* é frequente em Buriticupu e praticamente ausente em São José de Ribamar. Outra diferença registrada entre as duas localidades foi quanto a frequência de *A. aquasalis* que ocorreu em maior proporção em São José de Ribamar. Para as demais espécies não foram detectadas diferenças significativas entre as duas localidades. O mesmo

se observa quanto se considera os parâmetros riqueza e abundância entre os dois municípios (Tabela 25).

Tabela 23 - Estimativas de correlação parcial entre espécies adultas de *Anopheles* spp. (coexistência) no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, 2006-2011.

PARES DE VARIÁVEIS	r SIMPLES	r PARCIAL	t	PROBABILIDADE
<i>A. darlingi</i> x <i>A. albitarsis</i>	0,94	0,9153	18.1843**	0,00001
<i>A. darlingi</i> x <i>A. aquasalis</i>	0,37	-0,0003	-0.0024ns	99,3478
<i>A. darlingi</i> x <i>A. oswaldoi</i>	-0,04	0,0404	0.3237ns	74,5862
<i>A. darlingi</i> x <i>A. nuneztovari</i>	-0,02	-0,0625	-0.5013ns	62,3665
<i>A. albitarsis</i> x <i>A. aquasalis</i>	0,42	0,0463	0.3709ns	71,2857
<i>A. albitarsis</i> x <i>A. oswaldoi</i>	-0,05	-0,0495	-0.3968ns	69,4932
<i>A. albitarsis</i> x <i>A. nuneztovari</i>	0,00	0,0587	0.4703ns	64,4675
<i>A. aquasalis</i> x <i>A. oswaldoi</i>	-0,10	-0,0515	-0.4124ns	68,4191
<i>A. aquasalis</i> x <i>A. nuneztovari</i>	-0,03	-0,041	-0.3283ns	74,2676
<i>A. oswaldoi</i> x <i>A. nuneztovari</i>	0,28	0,2929	2.4509*	1,6242

Legenda: ns = não significativo / ** ou * = significativo

Tabela 24 - Valores de frequência média de mosquitos do gênero *Anopheles* spp. por ambientes no município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão, 2006 a 2011.

ESPÉCIES	INTRADOMICÍLIO		PERIDOMICÍLIO		ANOVA	
	\bar{x}	DP (\pm)	\bar{x}	DP (\pm)	F	CV (%)
<i>A. darlingi</i>	0,01a	0,03	0,06a	0,09	2,14	141,99
<i>A. albitarsis</i>	0,01a	0,03	0,28a	0,44	2,41	201,90
<i>A. aquasalis</i>	0,03a	0,04	0,46a	0,79	1,98	218,26
<i>A. oswaldoi</i>	0,00a	0,00	0,13a	0,21	2,50	219,09
<i>A. nuneztovari</i>	0,00a	0,00	0,04a	0,07	2,14	236,65

Nas médias letras iguais entre si não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de $P \leq 0,05$; *significativo estatisticamente pelo teste de ANOVA em nível de $P \leq 0,05$. DP= desvio padrão; F= valor de ANOVA; CV= coeficiente de variação;

Tabela 25 - Valores de frequência média de imaturos de espécies de *Anopheles* spp., riqueza e abundância entre os municípios de Buriticupu e São José de Ribamar, Estado do Maranhão, 2007-2009.

ESPÉCIES	BURITICUPU		SÃO JOSÉ DE RIBAMAR	
	\bar{x}	DP (\pm)	\bar{x}	DP (\pm)
<i>A. aquasalis</i>	0,002bc	0,005	0,061ab	0,046
<i>A. albitarsis</i>	0,022abc	0,031	0,023abc	0,030
<i>A. oswaldoi</i>	0,004abc	0,007	0,006abc	0,014
<i>A. nuneztovari</i>	0,008abc	0,012	0,010abc	0,017
<i>A. darlingi</i>	0,064a	0,111	0,000c	0,000

ANOVA	F = 3,30**	CV (%) 206,32	GL 81
Riqueza	n		n
	5		4
ANOVA	F = 0,42	CV (%) 84,65	GL 5
Abundância	n		n
	130		62
ANOVA	F = 0,54	CV (%) 171,40	GL 5

Nível de significância: **: 1%; *: 5%. GL: graus de liberdade; DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação.

5.4 Análises limnológicas em criadouros de Buriticupu e São José de Ribamar

Com relação à temperatura da água verificaram-se valores muito próximos entre Buriticupu e São José de Ribamar, respectivamente 21°C e 20°C. O pH também variou pouco entre os ambientes, respectivamente 5,18 e 5,91. Já a condutividade elétrica foi de 0,263 S/m⁻¹ para Buriticupu e 1,240 S/m⁻¹ para São José de Ribamar. O total de sólidos dissolvidos - TDS foi de 131 mg/L em Buriticupu e 23,5 mg/L para São José de Ribamar. A salinidade foi nula em Buriticupu e 0,5/1000 em São José de Ribamar (Tabela 26).

Na análise química do nitrito foi realizada a partir de duas amostras obtidas em criadouros de Buriticupu e São José de Ribamar. Em Buriticupu foram encontrados valores de 0,242 mg/L e 9,259 mg/L. Já em São José de Ribamar os valores foram maiores para as duas amostras: 0,751 e 0,749 mg/L (Tabela 26).

Com relação ao nitrato as amostras de Buriticupu quantificaram 1,417 e 1,429 mg/L. Já em São José de Ribamar os valores encontrados foram elevados, respectivamente 16,136 e 16,164 mg/L (Tabela 26).

Quanto ao teor de amônia nos criadouros os valores foram menores em Buriticupu – 5,9520 e 3,3248 mg/L; já em São José de Ribamar os valores bem mais elevados – 22,000 e 21,224 mg/L (Tabela 26).

Quanto ao fósforo dissolvido nos criadouros as concentrações registradas em Buriticupu foram 57,380 e 57,493 mg/L. As concentrações em São José de Ribamar foram menores com redução de duas unidades apenas – 55,002 e 55,073 mg/L (Tabela 26).

Tabela 26 - Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas em criadouros em Buriticupu e São José de Ribamar em setembro de 2007.

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	LOCALIDADES		
	BURITICUPU	SÃO JOSÉ DE RIBAMAR	
Temperatura (°C)	21	20	
pH	5,18	5,91	
Condutividade elétrica (σ) ¹	0,263	1,24	
TDS ² (mg/L)	131	23,5	
Salinidade (partes/1.000)	0	0,5	
Concentração de Nitrito – NO ⁻¹ (mg/L)	Amostra 1	0,242	0,751
	Amostra 2	0,259	0,749
Concentração de Nitrato – NO ³⁻¹ (mg/L)	Amostra 1	1,417	16,136
	Amostra 2	1,429	16,164
Concentração de Amônia – NH ₃ (mg/L)	Amostra 1	5,952	22
	Amostra 2	3,3248	21,224
Concentração de Fósforo – (mg/L)	Amostra 1	57,38	55,002
	Amostra 2	57,493	55,073

¹ (S/m⁻¹) ou Siemens por metro; ² Total de Sólidos Dissolvidos.

5.5 Macrófitas aquáticas

Foram coletadas em Buriticupu quatro ordens de Macrófitas: Poales, Zingiberales, Caryophyllales e Nymphaeales, distribuídas em cinco famílias: Poaceae, Cyperaceae, Marantaceae, Polygonaceae e Nyphaeaceae. E destas, foram identificados 5 gêneros: *Oryza*, *Cyperus*, *Calathea*, *Polygonum*, e *Nymphaea*. As Macrófitas encontradas nos criadouros eram comuns nos três pontos de coleta de formas imaturas de *Anopheles* (Tabela 27).

Na área de São José de Ribamar foram coletadas cinco ordens de Macrófitas (Malpighiales, Myrtales, Lamiales, Poales, Nymphaeales), distribuídas em cinco famílias (Rhizophoraceae, Combretácea, Acanthaceae, Poaceae, e Nyphaeaceae, respectivamente pertencentes aos gêneros *Rhizophora*, *Laguncularia*, *Avicennia*, *Spartinna* e *Nymphaea* (Tabela 27).

Tabela 27 - Lista de Macrófitas aquáticas coletadas em Buriticupu e São José de Ribamar, Estado do Maranhão, Brasil.

LOCALIDADE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO
Buriticupu	Poales	Poaceae	<i>Oryza</i>
		Cyperaceae	<i>Cyperus</i>
	Zingiberales	Marantaceae	<i>Calathea</i>
	Caryophyllales	Polygonaceae	<i>Polygonum</i>
	Nymphaeales	Nyphaeaceae	<i>Nymphaea</i>
São José de Ribamar	Malpighiales	Rhizophoraceae	<i>Rhizophora</i>
	Myrtales	Combretaceae	<i>Laguncularia</i>
	Lamiales	Acanthaceae	<i>Avicennia</i>
	Poales	Poaceae	<i>Spartina</i>
	Nymphaeales	Nyphaeaceae	<i>Nymphaea</i>

5.5.1 Preferência alimentar sanguínea de *Anopheles* spp. em diferentes ambientes

5.5.2 Análise por meio do teste da Precipitina

Os dados relativos à reação simples por meio do teste de precipitina estão dispostos nas Tabelas 28 e 29. No município de Buriticupu foi coletado um total de 366 fêmeas ingurgitadas de *A. darlingi* sendo 64 no intradomicílio, 139 no peridomicílio e 146 no extradomicílio (Tabela 28). Em relação a *A. aquasalis* foram coletados 17 exemplares, sendo 4 no intradomicílio e 13 no peridomicílio. No intradomicílio 7,38% dos *A. darlingi* coletados estavam alimentados com sangue humanos, seguido por 4,92% com sangue de aves e 2,73 com sangue de boi. No peridomicílio foi registrado também o número mais elevado de *A. darlingi* alimentados com sangue humano (13,66%), seguido pelo sangue de cão (9,56%) e o terceiro maior valor para sangue de boi (6,28%). Os dados do extradomicílio diferem do padrão observado nos dois ambientes, sendo o valor mais elevado para sangue de ave (13,11%), seguido por sangue humano (11,75%) e o sangue de boi o terceiro mais frequente (6,28%). Considerando o total geral a alimentação de *A. darlingi* por sangue humano representou 32,79% das amostras, seguido de ave – 22,40%, e o boi o terceiro mais frequente, representando 15,30% do total. Considerando *A. aquasalis* o percentual de exemplares capturados foi muito baixo (4,64%), sendo que 12 exemplares (3,28%) estavam alimentados com sangue humano (Tabela 28).

A análise da reação dupla da precipitina para preferência alimentar de *A. darlingi* e *A. aquasalis* permitiu detectar que no intradomicílio, 21 exemplares (14,29%) de *A. darlingi* se alimentaram de sangue de roedor/humano e 17 (11,56%) de ave/humano. Apenas uma fêmea de *A. aquasalis* alimentou-se de ave/humano (0,68%). No peridomicílio, 19 exemplares de *A. darlingi* (12,93%) se alimentaram de sangue de ave/humano, enquanto que 14 (9,52%) se alimentaram de gato/ave e seis (4,08%) de ave/boi. No extradomicílio 20 indivíduos de *A. darlingi* (13,61%). Também se registrou 18 exemplares (12,24%) da combinação de gambá/ave; 16 (10,88%) ave/boi e 15 (10,20%) a combinação ave/cão. Considerando o total geral das reações duplas a alimentação de *A. darlingi* por ave/humano representou 24,49% dos mosquitos coletados, seguido pela combinação gambá/ave (21,77%) e 14,97% para a combinação ave/boi. Para *A. aquasalis* foi analisado apenas um exemplar não permitindo maiores considerações (Tabela 29).

Tabela 28 - Dados da reação simples da preciptina para análise da preferência alimentar de *A. darlingi* e *A. aquasalis* capturados nos ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e extradomiciliar no município de Buriticupu, Estado do Maranhão de 2007 a 2009.

PREFERÊNCIA ALIMENTAR	INTRADOMICÍLIO				PERIDOMICÍLIO				EXTRADOMICÍLIO				TOTAL			
	<i>A. darlingi</i>	% do total	<i>A. aquasalis</i>	% do total	<i>A. darlingi</i>	% do total	<i>A. aquasalis</i>	% do total	<i>A. darlingi</i>	% do total	<i>A. aquasalis</i>	% do total	<i>A. darlingi</i>	% do total	<i>A. aquasalis</i>	% do total
Humano	27	7,38	2	0,55	50	13,66	10	2,73	43	11,75	0	0,00	120	32,79	12	3,28
Boi	10	2,73	0	0,00	23	6,28	2	0,55	23	6,28	0	0,00	56	15,30	2	0,55
Ave	18	4,92	2	0,55	16	4,37	0	0,00	48	13,11	0	0,00	82	22,40	2	0,55
Roedor	6	1,64	0	0,00	13	3,55	0	0,00	11	3,01	0	0,00	30	8,20	0	0,00
Gambá	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	12	3,28	0	0,00	12	3,28	0	0,00
Cão	0	0,00	0	0,00	35	9,56	0	0,00	5	1,37	0	0,00	40	10,93	0	0,00
Gato	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,27	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,27
Ñ.reagiu	3	0,82	0	0,00	2	0,55	0	0,00	4	1,09	0	0,00	9	2,46	0	0,00
TOTAL	64	17,5	4	1,09	139	38,00	13	3,55	146	39,89	0	0,00	349	95,36	17	4,64

Tabela 29 - Dados da reação dupla da precipitina para análise da preferência alimentar de *A. darlingi* e *A. aquasalis* capturados nos ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e extradomiciliar no município de Buriticupu, Estado do Maranhão de 2007 a 2009.

PREFERÊNCIA ALIMENTAR	INTRADOMICÍLIO				PERIDOMICÍLIO				EXTRADOMICÍLIO				TOTAL			
	<i>A. darlingi</i>	% do total	<i>A. aquasalis</i>	% do total	<i>A. darlingi</i>	% do total	<i>A. aquasalis</i>	% do total	<i>A. darlingi</i>	% do total	<i>A. aquasalis</i>	% do total	<i>A. darlingi</i>	% do total	<i>A. aquasalis</i>	% do total
Ave/Humano	17	11,56	1,00	0,68	19	12,93	0	0,00	0	0,00	0	0,00	36	24,49	1	0,68
Roedor/Humano	21	14,29	0,00	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	21	14,29	0	0,00
Humano/Gambá	0	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0	0,00	20	13,61	0	0,00	20	13,61	0	0,00
Ave/Cão	0	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0	0,00	15	10,20	0	0,00	15	10,20	0	0,00
Gambá/Ave	0	0,00	0,00	0,00	14	9,52	0	0,00	18	12,24	0	0,00	32	21,77	0	0,00
Ave/Boi	0	0,00	0,00	0,00	6	4,08	0	0,00	16	10,88	0	0,00	22	14,97	0	0,00
TOTAL	38	25,85	1	0,68	39	26,531	0	0	69	46,94	0	0	146	99,32	1	0,68

Em São José de Ribamar os testes com a precipitina revelaram que 20 fêmeas (80,00%) de *A. aquasalis* se alimentaram com sangue humano, sendo duas (8,00%) no intradomicílio e 18 no peridomicílio. Os testes revelaram também que cinco (20%) fêmeas capturadas no peridomicílio, se alimentaram em aves. Considerando os resultados da reação dupla da precipitina três (20,00%) capturadas no peridomicílio os testes revelaram a combinação de alimentação gato/humano e 12 exemplares (80,00%) também no peridomicílio a combinação humana/ave (Tabela 30).

Tabela 30 - Preferência alimentar do *A. aquasalis* coletados de 2006 à 2007 nos ambientes intra e peridomicílio, na localidade de Guarapiranga município de São José de Ribamar, Estado do Maranhão.

PREFERÊNCIA ALIMENTAR	INTRADOMICÍLIO		PERIDOMICÍLIO		TOTAL	
	n	% do total	n	% do total	n	% do total
Humano	2	8,00	18	72,00	20	80,00
Ave	0	0,00	5	20,00	5	20,00
TOTAL REAÇÃO SIMPLES	2	8,00	23	92,00	25	100,00
Gato/humano	0	0,00	3	20,00	3	20,00
Humano/ave	0	0,00	12	80,00	12	80,00
TOTAL REAÇÃO DUPLA	0	0,00	15	100,00	15	100,00

5.5.3 Análise por meio da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Os mosquitos capturados no município de Buriticupu foram analisados para a preferência alimentar e os 45 exemplares coletados foram distribuídos em grupos de 5 para cada espécie e o seu respectivo ambiente, conforme consta da tabela 30. Os espécimes foram analisados para seis hospedeiros, em cada ambiente, totalizando 270 reações. No intradomicílio detectou-se reação positiva para *A. darlingi* alimentado com sangue humano e com sangue de boi. Dois exemplares de *A. albitarsis* alimentaram-se com sangue humano. Os testes para os cinco exemplares de *A. nuneztovari* foram todos negativos. No peridomicílio três exemplares de *A. darlingi* foram positivos para alimentação em humanos. Foram negativos os resultados obtidos com *A. albitarsis* e *A. nuneztovari*. A amostragem para os exemplares do extradomicílio resultou em dois espécimes de *A. darlingi* positivos para alimentação sanguínea no boi. Os testes para *A. albitarsis* foram positivos para

alimentação no boi em três exemplares e um exemplar no rato. Registraram-se dois exemplares positivos também para sangue de rato para *A. nuneztovari*. A Figura 14 mostra os resultados da PCR em que *A. darlingi* estava alimentado de sangue humano, cujos exemplares foram capturado no intradomicílio.

Tabela 31 - Análise por PCR da preferência alimentar sanguínea das espécies de *Anopheles* coletadas em 2011, nos ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e extradomiciliar no município de Buriticupu, Estado do Maranhão.

MOSQUITO	ANIMAIS												TOTAL
	Boi	% do total	Galinha	% do total	Cão	% do total	Cavalo	% do total	Rato	% do total	Humano	% do total	
INTRADOMICÍLIO													
<i>A. darlingi</i>	1	20,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	20,00	5
<i>A. albitarsis</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	40,00	5
<i>A. nuneztovari</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5
PERIDOMICÍLIO													
<i>A. darlingi</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	60,00	5
<i>A. albitarsis</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5
<i>A. nuneztovari</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5
EXTRADOMICÍLIO													
<i>A. darlingi</i>	2	40,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5
<i>A. albitarsis</i>	3	60,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	20,00	0	0,00	5
<i>A. nuneztovari</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	40,00	0	0,00	5



Figura 14 - *Nested*-PCR para fonte alimentar sanguínea para *Anopheles darlingi* alimentado em humano no intradomicílio em Buriticupu, Estado do Maranhão, Brasil, 2011.

5.6 Análise da infecção natural por *Plasmodium* spp.

A infecção natural foi avaliada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e um total de 1.246 mosquitos foi analisado para detectar o percentual da infecção por *Plasmodium* spp. e os resultados constam da Tabela 32. Destes, 804

exemplares de *A. darlingi* foram analisados em *pools* de 10 exemplares por espécie, em cada tubo *ependoff*, totalizando 178 *pools*. Após a reação da PCR, os resultados evidenciaram positividade para 5 *pools*. Foi calculada a Taxa Mínima de Infecção (TMI) admitindo-se que pelo menos um exemplar estava infectado em cada *pool* de 10. O cálculo para *A. darlingi* evidenciou que o TMI foi igual a 2,8% (5 / 178); em *A. albitarsis* o TMI foi de 2,2 (2 / 90); em *A. oswaldoi* de 6,8 de 44 *pools* (2 positivos) e para *A. nuneztovari* de 8,3 (1 / 12). A positividade de *A. darlingi* foi identificada entre os horários 18-19, 19-20, 21-22 e 5-6. A positividade para *A. albitarsis* e *A. oswaldoi* ocorreram entre 18-19 e 19-20h. Enquanto que *A. nuneztovari* somente foi encontrado positivo entre 22-23h. Os dados da tabela 32 mostram a positividade para *Plasmodium* spp. simultaneamente com o ambiente e o horário da atividade hematofágica. Observa-se que foram quatro registros tanto para o intra como para o peridomicílio. No extradomicílio foram verificados três registros. A estratificação da positividade por ambiente revelou que apenas *A. darlingi* foi encontrado positivo em todos os ambientes. *Anopheles albitarsis* foi encontrado positivo no peri e no extradomicílio (Tabela 33).

Tabela 32 - Espécies de anofelinos analisados por horário de atividade hematofágica e positividade para *Plasmodium* spp. detectados pela técnica da PCR no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 e 2011.

Espécies	Total de Mosquitos	Total de pools por espécie	Pools positivos	Hora						TMI %
				18-19	19-20	20-21	21-22	22-23	5-6	
<i>Anopheles darlingi</i>	804	178	5	2	1	0	1	0	1	2,8
<i>Anopheles albitarsis</i>	238	90	2	1	1	0	0	0	0	2,2
<i>Anopheles oswaldoi</i>	104	44	3	2	1	0	0	0	0	6,8
<i>Anopheles nuneztovari</i>	19	12	1	0	0	0	0	1	0	8,3
<i>Anopheles triannulatus</i>	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0,0
<i>Anopheles aquasalis</i>	77	12	0	0	0	0	0	0	0	0,0
<i>Anopheles strondei</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Total	1.246	339	11	5	3	0	1	1	1	

TMI: Taxa Mínima de Infecção

Considerando a positividade para *Plasmodium vivax*, as análises ocorreram por meio das espécies e suas respectivas amostras positivas. Os dados constam da Tabela 34 e os resultados do *Nested*-PCR indicam resultado positivo para *P. Vivax*,

avaliado de acordo com o controle positivo (Figura 15). Considerando o total de 908 mosquitos analisados, a infecção detectada foi assim distribuída por espécies: *A. darlingi* com 804 exemplares, 178 *pools*, resultou em um positivo e a TMI de 0,6%. Seguido de *A. albitarsis* com 238 exemplares, 90 *pools*, um positivo e valor de TMI de 1,1%. Por último *A. nuneztovari*, com 19 exemplares 12 *pools*, um positivo e 8,3% de TMI.

Tabela 33 - Espécies de anofelinos analisados por horário de atividade hematofágica, ambiente e positividade para *Plasmodium* spp. detectados pela técnica da PCR no município de Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 e 2011.

Hora	Intradomicílio							Peridomicílio							Extradomicílio						
	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G
18-19	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
19-20	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
20-21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
21-22	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
22-23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23-00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
00-01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
01-02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
02-03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
03-04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
04-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
05-06	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

A- *A. darlingi*; B - *A. oswaldoi*; C - *A. albitarsis*; D. *A. nuneztovari*; E - *A. triannulatus*; F - *A. aquasalis*; G - *A. strodei*.

Levando-se em consideração a positividade para *Plasmodium falciparum*, os dados constam da Tabela 35 e os resultados do *Nested-PCR* indicam resultado positivo para *P. falciparum* avaliado de acordo com o controle positivo (Figura 16). Os dados foram analisados de 1.146 mosquitos distribuídos para *A. darlingi* 804 exemplares, 178 *pools*, 4 positivo e 2,2% de TMI. Seguido de *A. oswaldoi* 104 exemplares, 44 *pools*, 1 positivo e 2,3% de TMI. *A. albitarsis* com 238 exemplares, 90 *pools*, 1 positivo e 1.1% de TMI.

Considerando a infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum* apenas *A. oswaldoi* foi encontrado infectado. Totalizando 104 mosquitos distribuídos em 44 *pools* analisados, apenas uma amostra foi positiva correspondendo a um de TMI de 2,3% (Tabela 36).

Tabela 34 - Total de mosquitos analisados por espécies de anofelinos e as respectivas amostras positivas para *Plasmodium vivax* pela técnica de PCR em Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 a 2011.

Espécies	Total de Mosquitos	Total de pools por espécies	Pools Positivos (<i>P. vivax</i>)	TMI %
<i>A. darlingi</i>	804	178	1	0,6
<i>A. albitarsis</i>	238	90	1	1,1
<i>A. nuneztovari</i>	19	12	1	8,3
Total	908	222	4	

TMI: Taxa Mínima de Infecção

Tabela 35 - Total de mosquitos analisados por espécies de anofelinos e as respectivas amostras positivos para *Plasmodium falciparum* pela técnica de PCR em Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 a 2011.

Espécies	Total de Mosquitos	Total de pools por espécies	Pools Positivos	TMI %
<i>A. darlingi</i>	804	178	4	2,2
<i>A. oswaldoi</i>	104	44	1	2,3
<i>A. albitarsis</i>	238	90	1	1,1
Total	1.146	312	7	

TMI: Taxa Mínima de Infecção

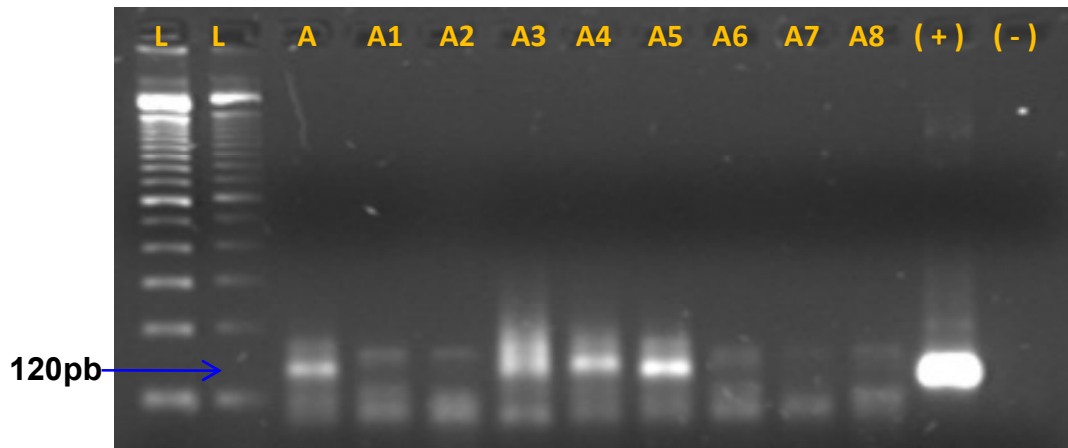


Figura 15 - Nested-PCR para *Plasmodium vivax* em Buriticupu, Estado do Maranhão, com amostras de *Anopheles* sp., 2010 a 2011.



Figura 16 - Nested-PCR para *P. falciparum* por meio da técnica de PCR em Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 a 2011.

Tabela 86 - Resultado de infecção mista por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* em *A. oswaldoi* analisados pela técnica de PCR em Buriticupu, Estado do Maranhão, 2010 a 2011.

Espécies	Total de Mosquitos	Total de pools por espécies	Pools Positivos	TMI %
<i>A. oswaldoi</i>	104	44	1	2,3
Total	104	44	1	

TMI: Taxa Mínima de Infecção

Considerando todos os dados obtidos sobre a infecção natural a seguinte distribuição foi encontrada levando-se em conta o horário, a espécie infectada e ambiente (intra, peri e extradomicílio). Entre 19-20 horas o *A. oswaldoi* foi registrado com infecção mista no intradomicílio. Outro exemplar da mesma espécie foi registrado no peridomicílio com *P. falciparum*.

Em *A. darlingi* dois exemplares foram registrados infectados com *P. vivax* no primeiro horário, no extradomicílio e com *P. falciparum* ambos no primeiro horário. Com o mesmo *Plasmodium*, *A. darlingi* foi registrado nos horários entre 20 e 21 horas no peridomicílio; nos horários entre 5 e 6 horas da manhã no intradomicílio; e um entre 19 e 20 horas, no mesmo ambiente.

Considerando *A. Albitarsis*, exemplares infectados por *P. vivax* foram registrados no peridomicílio e infectado por *P. falciparum* registrou-se um exemplar no extradomicílio entre 19 e 20 horas. *A. nuneztovari* foi detectado infectado com *P. vivax*, no extradomicílio.

VI. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os registros das espécies de *Anopheles* spp. encontradas neste trabalho foram reportadas, pela primeira vez no Estado do Maranhão, nos trabalhos de Deane *et al.* (1948). Os autores realizaram coletas da fauna anofélica em diferentes localidades, desde a região amazônica até a faixa litorânea do nordeste brasileiro, entre os anos de 1939 a 1944. Os dados obtidos possibilitaram registrar a predominância das espécies *A. aquasalis*, *A. darlingi* e *A. albitarsis*, principalmente na ilha de São Luiz, denotando um padrão de ocorrência semelhante ao constatado neste trabalho.

Considerando as coletas realizadas, foi possível registrar nove espécies, sendo 2.832 exemplares de *Anopheles* spp. capturados no município de Buriticupu e 75 espécimes no Município de São José de Ribamar. Enfatiza-se que apesar do número reduzido de exemplares capturados, a incidência da malária foi significativa nos Municípios estudados.

Os resultados possibilitaram verificar que a fauna de anofelinos, nos ambientes domiciliares e silvestres, é mais frequente no peridomicílio onde estão localizadas as pessoas ao entardecer, e também os animais domésticos. Neste contexto, torna-se possível o conhecimento da fauna de anofelinos e de outros Culicídeos, permitindo avaliar o nível do risco da transmissão da malária e de outras doenças veiculadas por estas espécies.

Os dados encontrados em Buriticupu mostram que foram mais expressivos do que aqueles obtidos no município de Paço do Lumiar (184 espécimes), na Ilha de São Luis (1.972 indivíduos), Raposa (1.407) e São José de Ribamar (219 exemplares de *Anopheles* spp.) (Rebêlo *et al.*, 2007). A explicação provável da presença dessas espécies é a situação ambiental que está localizada na zona semi-úmida de transição entre o clima quente e úmido com predominância de floresta ombrófila e o semiárido de vegetação mais seca, típico do Leste maranhense. Entretanto, em São José de Ribamar, o registro das espécies foi baixo, 75 no total, quando se compara os trabalhos de Rebêlo *et al.* (2007), realizados na mesma localidade.

As espécies mais abundantes em Buriticupu foram *A. darlingi* (63,88%) e *A. albitarsis* (23,06%), seguido por *A. oswaldoi* (5,69%) e *A. evansae* (3,24%), *A. nuneztovari* (2,54%), e *A. galvaoi* (0,64%). Já em São José de Ribamar houve

predominância de *A. aquasalis* (46,67%) e *A. albitarsis* (23,06%), seguido por *A. oswaldoi* (12%), *A. darlingi* (6,67%) e *A. nuneztovari* (4%). Conforme outras áreas do Estado e de outras regiões endêmicas de malária do Brasil, a maior frequência de espécies foi registrada no ambiente peridomicíliar, onde se concentram o ambiente de abrigos animais e da presença humana. Estes dados corroboram os obtidos no estado do Maranhão, principalmente em Buriticupu e na ilha de São Luís (Silva *et al.*, 1989; Xavier e Rebêlo, 1999).

Anopheles darlingi foi a espécie que apresentou o maior comportamento endófilo (65,27%), revelando a capacidade que este mosquito possui em realizar a hematofagia em humanos no interior das residências. Comportamento semelhante foi observado em trabalhos realizados em Rondônia (Deane, 1986; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 1989 e Tadei *et al.*, 1993).

Neste estudo foram encontradas nove espécies de *Anopheles*, resultados próximos aos que foram descritos em trabalhos anteriores, por Deane *et al.* (1948) que encontraram 14 espécies; Tadei *et al.* (1998) coletaram 11 espécies, Segura (1998) coletaram nove espécies. Figuram também nesta lista de autores as mesmas espécies encontradas neste trabalho.

Em termos de diversidade nos trabalhos realizados por Deane *et al.* (1948), Tadei *et al.* (1998), Segura (1998) e Conn *et al.* (2002) foram encontradas variações diferentes na riqueza e abundância de anofelinos coletados. Esta informação está diretamente relacionada com a sazonalidade da malária nas regiões da Amazônia, ou seja, registra-se maior densidade nos períodos de início e término da estação chuvosa. Além disso, nesses ambientes estudados por esses autores há maior riqueza de coleções hídricas, além de fatores que determinam a predominância das espécies vetores da malária (Tadei *et al.*, 2008). De acordo com relatos históricos, a presença da malária na Amazônia brasileira está relacionada com as alterações demográficas, ecológicas, socioeconômicas e culturais que ocorrem nas áreas, que determinam um contínuo planejamento de seu espaço geográfico e alterações no processo de transmissão das doenças (Albuquerque e Mutis, 1997).

Em Buriticupu *A. darlingi* foi a única espécie detectada com atividade de picar durante a noite inteira, mas com predominância entre 18 até 22 horas da noite e entre 4 e 6 horas no amanhecer, mostrando um comportamento bimodal. Este mesmo padrão foi relatado por Tadei *et al.* (1983), observado na Hidrelétrica Tucuruí, Estado do Pará e na área rural de Ariquemes (Tadei *et al.* 1998). Lourenço-

de-Oliveira *et al.* (1989) também enfatizaram que *A. darlingi* é uma espécie que apresenta hábitos hematofágicos ao decorrer das horas, sendo o maior pico no início da noite e ao amanhecer. Resultados semelhantes foram encontrados por Hudson, (1984); Elliott, (1972) na Colômbia e Gama *et al.* (2009) em Rondônia. O conhecimento deste comportamento das espécies são relevantes para implantação de medidas de controle, que possam minimizar ou evitar o contato homem-vetor, quando *A. darlingi* e *A. aquasalis* estiverem envolvidos na transmissão da malária no Estado.

A maioria dos espécimes (83,05%) foi colecionada na estação chuvosa da região (Dez/Maio), sendo que *A. darlingi* e *A. albitarsis* foram as únicas espécies que ocorreram em todos os meses do ano. A análise de correlação demonstrou significância para a variável precipitação e presença de *A. darlingi*, o que decorre da relação dessa espécie com umidade e criadouros disponíveis. Este padrão é bastante peculiar para localidades onde o regime de chuvas é menor do que o registrado em outras áreas da Amazônia Central, quando o pico das espécies ocorre no final da estação chuvosa (Tadei *et al.*, 1998). Situação semelhante foi observada por Galardo *et al.* (2009) no rio Matapí, Estado do Amapá. No município de Buriticupu, também é na estação chuvosa que se observa os valores de densidade de anofelinos mais elevados. Além disso, os resultados de densidade também possibilitaram verificar que *A. darlingi* é a espécie dominante no ambiente, sobre a maioria das demais coexistindo.

Em relação aos criadouros em Buriticupu, as formas imaturas de *A. darlingi* se mostraram mais frequentes, representando cerca de 60% entre os anofelinos capturados, resultado semelhante aos observados para as formas aladas. Os criadouros localizados nas áreas peridomiciliares, em geral, apresentam elevadas densidades de *A. darlingi*, fato também relatado para a região amazônica (Tadei, comunicação pessoal, 2012). Um registro relevante neste trabalho foram dois exemplares de *A. aquasalis*, encontrados nos criadouros deste município. Ressalta-se que Buriticupu dista em torno de 260 km da zona litorânea. Observação da presença desse vetor também foi feita por na Hidrelétrica Tucuruí no Estado do Pará, que situa-se aproximadamente à mesma distância de Buriticupu do litoral (Tadei, comunicação pessoal, 2012). Trata-se de um registro importante, pois Forattini (2002) destacou que a ocorrência desta espécie na região intercontinental era restrita entre 100 e 200 km do litoral atlântico Norte e Nordeste do Brasil.

Com relação dados físico-químicos obtidos nestes criadouros, a temperatura e pH estavam de acordo com os dados registrados na Hidrelétrica de Balbina, Estado do Amazonas (Tadei *et al.*, 1993). Quanto aos dados de condutividade elétrica e salinidade, estes foram considerados baixos, entretanto, dentro do que é esperado para criadouros tipicamente de água doce, característicos da região amazônica. Entretanto, valores de até 50 (S/m^{-1}) e elevados níveis de salinidade já foram reportados na literatura para *A. albimanus* e *A. pseudopunctipennis*, em Chiapas no México (Savage *et al.* 1990). O valor de TDS encontrado foi de 131 mg/L, sendo considerado um valor menor do que já foi registrado para criadouros positivos para *Anopheles* spp., 164 mg/L na Coréia do Sul (Claborn *et al.*, 2002). Quanto aos valores de nitrito, nitrato, amônia e fósforo, os registros dão conta de que *A. arabiensis* em plantações de arroz inundado suportam diferentes níveis,, 7. conforme as fases de desenvolvimento da cultura no Quênia (Mwangangi *et al.*, 2007), valores estes dentro dos níveis encontrados neste trabalho. Os níveis de nitrito e nitrato encontrados atendem os padrões de potabilidade conforme preconiza a Portaria do Ministério da Saúde n° 518/2004. Entretanto, os dados de amônia registrados ultrapassam os valores estabelecidos pela referida portaria quanto a potabilidade. Os dados relativos às macrófitas demonstram que Buriticupu apresentou gêneros já descritos em outros criadouros de anofelinos conforme (Savage *et al.*, 1990).

Em São José de Ribamar as espécies mais abundantes foram *A. aquasalis* (46,48%) e *A. darlingi* (30,99%), sendo a maioria dos exemplares registrados no ambiente peridomiciliar, com horários de pico não muito bem definidos, mostrando a abundância maior entre 22h da noite a 01h da madrugada. O registro de *A. darlingi* na ilha de São Luis havia sido feito por Deane *et al.* (1948) conforme afirmaram: “*Em uma experiência feita em 1941, larvas recentemente nascidas de ovos de A. darlingi capturados em São Luiz (Maranhão)*” [...]. Os dados desse trabalho corroboram esta afirmação, pois desde aquela publicação nenhum registro da espécie havia sido feito para a referida ilha. A predominância de *A. aquasalis* nos ambientes litorâneos foi reportada por Xavier e Rebêlo (1999), ambientes estes onde a espécie figura como o vetor principal da malária. Neste município, a frequência das espécies demonstrou um padrão com predominância de exofilia. Porém, o padrão encontrado e a baixa frequência das espécies contrastaram com os dados observados por Xavier e Rebêlo (1999), registrados no município vizinho de Raposa. A maioria das espécies

foi colecionada no mês de Junho, período em que pluviosidade e umidade do ar começam a diminuir na região. A análise de correlação foi significativa para a precipitação e *A. aquasalis* assim como para *A. albitarsis*, variável importante para manter elevada umidade do ar e disponibilidade de criadouros.

Considerando os criadouros pesquisados em São José do Ribamar, apenas um foi positivo para imaturos, sendo que a espécie mais frequente foi *A. aquasalis*, representando 61,29% do total coletado. Neste ambiente, os valores médios de temperatura estão de acordo com os já registrados para criadouros de anofelinos, com preferência por ambientes salinos (Savage *et al.*, 1990). Os dados de salinidade e pH corroboram os valores descritos para os ambientes tipo estuário, predominantes na região de Guarapiranga. A condutividade elétrica o TDS² também são valores esperados para ambientes nestas condições. Quanto aos níveis de nitrito, estes são valores abaixo do que a legislação preconiza. Já os valores de nitrato e amônia estão acima dos níveis estabelecidos pela legislação. Este fato, explica-se por se tratar de uma área de estuário, onde predomina a decomposição de material orgânico e com influência dos pulsos da maré. Berti *et al.* (2004) descreveram que os habitats dos imaturos de *A. aquasalis* se correlacionaram positivamente com a alcalinidade e salinidade da água, assim como, apresentou correlação positiva com os manguezais. Conforme observou Rodrigues (2006), os parâmetros físico-químicos em São José de Ribamar são bastante variáveis em função do ambiente de estuário que recebe diferentes influências dos ciclos da maré e dos rios da baía do Arraial.

Correlações significativas foram obtidas entre precipitação e a presença de *A. aquasalis* e a mesma variável com *A. albitarsis*. Este dado diferiu dos registros feitos por Xavier e Rebêlo (1999). Provavelmente, alguma mudança no regime pluviométrico possa explicar o fato de o número de espécimes encontrados neste trabalho, ter sido tão divergente daqueles observado por estes autores, em uma região próxima.

Quanto à coexistência das espécies foi observado que *A. darlingi* e *A. albitarsis* apresentam correlação positiva, assim como para *A. oswaldoi* e *A. nuneztovari*. Porém, a baixa frequência desses indivíduos não permite tecer comentários maiores que possam explicar a bioecologia dessas espécies, na localidade estudada.

A. aquasalis neste tipo de ambiente tem melhor desempenho do que as outras espécies em função da sua adaptabilidade maior às águas salobras. A espécie explora criadouros desde os pequenos ou médios, assim como as áreas frequentemente inundadas pelas marés e valas formadas pelas chuvas em solo salino (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

As macrófitas encontradas nos criadouros de São José de Ribamar são tipicamente peculiares ao ambiente de estuário, no qual *A. aquasalis* também coexiste. Entretanto, não foi encontrado na literatura relação desta espécie com estes gêneros de vegetais. Estes dados indicam que provavelmente não haverá muita dependência desta espécie por este tipo de vegetação. Levando-se em conta a descrição de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994), as características dos seus criadouros são muito variáveis, podendo ser desde aqueles no solo, transitórios ou semipermanentes, diretamente ensolarados, ou ainda com pouco sombreamento.

Na pesquisa sobre o conhecimento da preferência alimentar sanguínea, por meio da reação da precipitina dos mosquitos *A. darlingi* e *A. aquasalis* capturados neste trabalho, registrou-se a presença de exemplares alimentados com sangue de uma variedade de vertebrados domésticos e silvestres.

Em Buriticupu, *A. darlingi* foi encontrado alimentado com sangue de todos os animais exceto o gato, tanto em reação simples quanto dupla, tendo como preferência o sangue humano, com incidência maior no peridomicílio. Apesar de apresentar uma antropofilia acentuada, os dados de reação da Precipitina, na modalidade simples destacam o caráter eclético dos hospedeiros disponíveis e aproveitados pelo *A. darlingi*, nos diferentes ambientes. O mesmo comprova-se na reação dupla em que os dados mostram a antropofilia acentuada tanto no intra como no peridomicílio e, no extradomicílio, registra-se alimentação tanto em humanos quanto no gambá e as combinações entre outros animais. Apesar do número de *A. aquasalis* coletados alimentados ter sido baixo, os valores obtidos demonstram que esta espécie também apresentou antropofilia acentuada. A alimentação em outros animais foi restrita a boi, ave e gato. Nos experimentos conduzidos em gaiolas e domicílios por Deane *et al.* (1948), ambas as espécies demonstraram antropofilia, assim como outros hospedeiros utilizados para alimentação foram registrados como porco, carneiro, galinha e cavalo, além dos aqui mencionados.

Nas amostragens em São José de Ribamar ficou evidente a preferência de *A. aquasalis* para se alimentar em humanos (80%). Nesta localidade os outros animais

hospedeiros foram ave e gato. Este dado diverge do que foi encontrado por Flores-Mendoza *et al.* (1996), no Rio de Janeiro, que destacaram que esta espécie apresenta comportamento zoófilo. Entretanto, Deane (1986) ressalta que a capacidade vetorial desta espécie tem relação com a densidade da população, cujos efeitos são mais acentuados na costa Norte e Nordeste do país.

Essa diversidade de hospedeiros, por si só, mostra o caráter eclético dos mosquitos das duas áreas estudadas. Já o encontro de exemplares com reações duplas envolvendo hospedeiros tão distintos, por exemplo, ave e humano, roedor e humano, humano e gambá, ave e cão, gambá e ave mostram também o oportunismo desses mosquitos. Muitos indivíduos foram atraídos por humanos, ave e boi.

Ainda na preferência alimentar, houve exemplares que não reagiram com os anti-soros empregados. É provável que tais mosquitos tenham sugado sangue de outros animais, cujos anti-soros não foram testados.

Ressalta-se que na análise da preferência alimentar sanguínea por PCR, foram encontrados vetores com sangue de três espécies de hospedeiros - boi, humano e rato. Esses dados vão de encontro com os dados dos trabalhos realizados por Christen *et al.* (2010) sobre os mosquitos da espécie *Anopheles arabiensis*. Essa espécie é reconhecidamente o principal vetor responsável pela transmissão do *Plasmodium falciparum* em Macha, Zâmbia. Trata-se de um mosquito importante na transmissão da malária, principalmente na estação chuvosa. As fêmeas dos *Anopheles* coletados foram analisadas para conhecimento de sua alimentação. No estudo da preferência alimentar foi detectada a presença de sangue de cabra, cão, humano e vaca. Esses registros estão de acordo com os resultados obtidos para boi e humano, encontrados nesse trabalho.

Nos testes para o repasto sanguíneo das fêmeas de *Anopheles* coletadas nas habitações humanas, que totalizaram 45 espécimes distribuídos nos três ambientes (intra, peri e extra), mostrou que um exemplar de *A. darlingi* estava alimentado com sangue de boi e galinha e dois exemplares de *A. albitarsis* em humano. Também foram encontrados por Christen e Douglas (2008), mosquitos alimentados em mais hospedeiros, a exemplo de sangue humano, vaca, cão, cabra e porco.

Na identificação da preferência alimentar de sangue a maioria tinha sido ingurgitada com sangue humano e de boi. Acredita-se que essa combinação é comum, pois havia muitos currais próximos das habitações humanas onde foram

realizadas as capturas. Estes registros também foram encontrados por Kabirul *et al.* (2012), estudando também fontes alimentares em bovinos.

Os *Anopheles* spp. coletados nos ambientes foram de três espécies *A. darlingi*, *A. albitarsis* e *A. nuneztovari*, os quais estavam alimentadas de sangue dos animais boi, humano e rato. Esses dados corroboram com Chang *et al.* (2008), que coletaram *A. minimus* em Taiwan onde encontraram cerca de 60% dos mosquitos alimentados com sangue bovino.

No estudo da infecção por *Plasmodium* spp., por meio da análise molecular, foram encontradas quatro espécies infectadas - *A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. oswaldoi* e *A. nuneztovari*. Destas espécies, apenas *A. oswaldoi* foi positiva para as duas espécies de *Plasmodium*, ou seja, estava infectada de forma mista. Este fato é importante quando usado pela vigilância epidemiológica, pois existiam apenas duas potenciais espécies incriminadas na transmissão da malária na região - *A. darlingi* e *A. aquasalis*, mas a partir deste trabalho, vale citar o possível envolvimento *A. oswaldoi*, nas duas áreas pesquisadas.

Os dados encontrados estão de acordo com informações descritas por Rachou (1958), em estudos de dissecação de espécimes de *Anopheles* infectadas com formas de esporozoitos nas glândulas salivares de *A. darlingi* e *A. albitarsis*, entre outras espécies, e por isso considerou, na época, tais espécies como possíveis transmissores de malária no Brasil.

Quando o teste de CS-Elisa é comparado com a PCR, é notável a sensibilidade da PCR. Na reação CS-Elisa, quando o nível de infecção for baixo, requer material fresco e não pode identificar espécies diferentes de *Plasmodium*. Esse teste é considerado um teste rápido de diagnóstico que detecta antígeno CS com os anticorpos monoclonais, que permite a identificação de *P. falciparum* e as variantes de *P. vivax* VK 210 e VK247, segundo Ryan *et al.* (2001).

Bangs *et al.* (2002) ressaltaram que o método de Elisa é um teste simples, rápido e específico, mas também é um teste de diagnóstico que muitas vezes pode falhar na detecção com baixo índice de infecções (Arez *et al.*, 2000). CS-ELISA, que é amplamente utilizado, tem limitações semelhantes (Robert *et al.*, 1988; Fontenille *et al.*, 2001; Hasan *et al.*, 2009).

Atualmente, com base na técnica da PCR, os ensaios podem diferenciar as espécies de *Plasmodium* por meio de duas rodadas de amplificação, como indicam os autores Snounou *et al.*(1993), Singh *et al.*(1999) e Rubio *et al.*(2002). Essa

técnica é bem mais sensível do que outros métodos usados por Wilson *et al.*(1998), Machado e Póvoa *et al.*(2000) e Moreno *et al.*(2004).

Rebêlo *et al.* (2007) realizaram levantamento de dados pela Fundação Nacional de Saúde de 1993 a 2002, quanto à distribuição de espécies de *Anopheles* em 29 municípios do Estado do Maranhão, e verificaram que representa 43,6% da fauna brasileira (55 espécies). Foram identificadas as seguintes espécies *A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. evansae* e *A. galvaoi*. Esses dados estão de acordo com trabalho realizado em Buriticupu e Guarapiranga, local em que as mesmas espécies estiveram presentes, de forma abundante, comprovada estaticamente, com a análise de estimativas de correlação parcial entre os fatores de clima e a ocorrência das espécies adultas, nas localidades de Guarapiranga e Buritizinho. Vale ressaltar que após várias décadas é feito novamente o registro de *A. darlingi* na Ilha de São Luís. Esses dados são importantes, pois são indicadores da necessidade urgente de um plano de monitoramento para a Ilha, no sentido de conter a expansão do foco diagnosticado. A pressão das populações humanas e sua expansão em áreas litorâneas, provavelmente, atraiu este vetor novamente para a localidade.

Outro aspecto importante foi o registro de *A. aquasalis* no Município de Buriticupu. Esta espécie é o principal vetor da malária na região litorânea e a sua expansão para o interior se constitui em um evento muito complexo, considerando que esta espécie é um potente vetor da malária na região litorânea, aumentando o risco de novos casos de malária nestas localidades infestadas.

VII. CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- Em Buriticupu foram encontradas as espécies *A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. oswaldoi*, *A. nuneztovari*, *A. aquasalis*, *A. galvaoi*, *A. evansae*, *A. strodei* e *A. triannulatus*. Já em São José de Ribamar foram encontradas *A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. oswaldoi*, *A. nuneztovari* e *A. aquasalis*.
- *A. darlingi* foi a espécie mais frequente em Buriticupu, ocorrendo em todos os meses do ano, em todos os horários de atividade hematofágica e em todos os ambientes estudados, sendo a maior quantidade de exemplares capturados no peridomicílio. Em São José de Ribamar a maior frequência registrada foi de *A. aquasalis*, sendo a maior parte dos exemplares coletados no peridomicílio. Nesta localidade a ocorrência anual das espécies não se deu em todos os meses estudados.
- O horário de maior atividade de *A. darlingi* foi ao intervalo entre 19-20h em Buriticupu, sendo os dois primeiros horários os de maiores frequências. O horário de maior atividade de *A. aquasalis* foi entre 00-01h em São José de Ribamar.
- Em Buriticupu os parâmetros limnológicos dos criadouros foram semelhantes aos encontrados em criadouros de outras regiões amazônicas. Em São José de Ribamar estão de acordo com os parâmetros esperados para ambientes de estuários, característicos dos criadouros de *A. aquasalis*.
- Pelo período de amostragem e quantitativo de macrófitas encontradas não foi possível se estabelecer associações entre estes vegetais e a presença de *Anopheles* spp., em ambos os ambientes estudados.
- Em Buriticupu *A. darlingi* foi encontrado com preferência alimentar principal em humanos. Em São José do Ribamar a maior parte dos exemplares de *A. aquasalis* preferiram também se alimentar em humanos.
- Foram encontrados infectados com *Plasmodium* sp. em Buriticupu as espécies *A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. oswaldoi* e *A. nuneztovari*. Apenas as espécies *A. darlingi*, *A. albitarsis* e *A. oswaldoi* foram encontrados infectados naturalmente por *P. vivax* e por *P. falciparum*. *A. nuneztovari* foi encontrado somente

infectado por *P. vivax*. Somente *A. oswaldoi* foi encontrado com infecção mista (*P. vivax* + *P. falciparum*).

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, B.C; Mutis, M.C.S. 1997. A malária no Amazonas. In: Rojas LBI; Toledo, LM (Coord.). *Espaço e Doença: um olhar sobre o Amazonas*. Rio de Janeiro: Fiocruz,: II.2.1; II.2.7; II.2.8.

Arez, A. P.; Snounou,G.; Pinto,J.; Sousa,C. A.; Modiano, D.; Ribeiro, H; Franco, A. S. ; Alves, J.; Rosario, V. E. 1999. A clonal *Plasmodium falciparum* population in an isolated outbreak of malaria in the Republic of Cabo Verde. *Parasitology* 118:347–355.

Bangs, M.J.; Rusmiarto, S.; Gionar, Y.R.; Chan, A.S.; Dave, K.; Ryan, J.R. 2002. Evaluation of a dipstick malaria sporozoite panel assay for detection of naturally infected mosquitoes. *J. Med Entomol* , 39:324-330

Bashar, k.; Tuno, N.; Ahmed. T.U; Howlader, A.J. 2012. Blood-feeding patterns of *Anopheles* mosquitos in a malaria-endemic area of Bangladesh. *Parasites & Vectors*. P 1-10, v.5:39.

Becker, N. 1989. Life strategies of mosquitoes as an adaptation to their habitats. *Bull. Soc. Vector Ecol.*,14:6-25.

Berti, J.; Gutiérrez, A.; Zimmerman, R. H. 2004. Relaciones entre tipos de hábitat, algunas variables químicas y la presencia de larvas de *Anopheles aquasalis* Curry y *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald en un área costera del estado Sucre, Venezuela. *Entomotropica*. 19: 79-84.

Brasil. Ministério da Saúde, 2008. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária. <http://portal.saude.gov.br/404.html>.

Brasil. Ministério da Saúde, 2012. Casos de malária no País. Portal do Brasil. <http://portal.saude.gov.br/>.

Brasil. Ministério da Saúde, 2008. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Situação epidemiológica da malária no Brasil, Brasília*. Acesso: <http://portal.saude.gov.br/>. Em 28/11/2011.

Brown, E., Villegas, C.; Araujo, R. 2001. Abundancia y diversidad de la fauna anofelina en areas vulnerables a la transmission malarica del estado Trujillo, Venezuela. *Boletin de la Direccí'on de Malariolog'ia y Saneamiento Ambiental*, 151, 1–10.

Bull, C.G; King, W.V. 1923. The blood feeding habits of malaria-carrying mosquitoes. *American Journal of Hygiene* 3: 491-496.

Chang, Mei-Chun; Teng, Hwa-Jen, Chen, Chen-Fu; Chen, Yung-Chen; Jeng, Chian-Ren. 2008. The resting sites and blood-meal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. *Malaria Journal* 2008, 7:105.

Claborn, D. M.; Hshieh, P. B; Roberts, R. D; Brian, T. A; Zeichner, C.; Andre, N.R.G. 2002. Environmental factors associated with larval habitats of malaria vectors in northern Kyunggi province. Republic of Korea. *Journal of the American Mosquito Control Association*, (3):17.

Conn, J. E., Wilkerson, R. C., Segura, M. N., Souza, R. T., Schlichting, C. D., Wirtz, R. A., Pova, M. M. 2002. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66: 18-22.

Consoli, R.; Lourenço- de Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*, Rio de Janeiro. Fiocruz. 228 p.

Cook, D. K. C.; Gut, B.J.; Rix, E. M. ; Schmeller, J. ; Seitz, M. 1974. *Water Plants of the World: A Manual for the Identification of the Genera of Freshwater Macrophytes*. Dr. W. Junk b. v., Publishers, The Hague, pages 561p.

Correa, R.R.; Aguiar, A. A. 1952. O teste de precipitina na identificação da fonte alimentar do *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Arq. Hig. Saúde Pub.*, 17:3-7.

Coura, J. R.; Suárez-Mutis, M.; Ladeira-Andrade, S. 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 3, p. 229-237.

CREDIP - Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias. Universidade Federal do Maranhão. 2005. *Informações de prontuários do Posto de Buriticupu e CREDIP do Departamento de Patologia UFMA.*

CREDIP - Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias. Universidade Federal do Maranhão. 2006. *Informações de prontuários do Posto de Buriticupu e CREDIP do Departamento de Patologia UFMA.*

CREDIP - Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias. Universidade Federal do Maranhão. 2012. *Informações de prontuários do Posto de Buriticupu e CREDIP do Departamento de Patologia UFMA.*

Christopher, D.K. Cook, Bernado J. Gut, E. Maryn Rix, Jakob Schmeller e Marta Seitz, 1974. *Water Plants of the World: A Manual for the Identification of the Genera of Freshwater Macrophytes*. Dr. W. Junk b. v., Publishers, The Hague, pages 560.

Christen M. Fornadel ,Laura C. Norris , Gregory E. Glass , Douglas E. Norris. 2010. Analysis of *Anopheles arabiensis* Blood Feeding Behavior in Southern Zambia during the Two Years after Introduction of Insecticide-Treated Bed Nets. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(4), pp. 848–853

Christen M. Fornadel and Douglas E. Norris. 2008. Increased Endophily by the Malaria Vector *Anopheles arabiensis* in Southern Zambia and Identification of Digested Blood Meals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(6), pp. 876–880

Cruz, C. D. Programa Genes: biometria. Viçosa, MG: UFV, 2006. 648p.

Curado, I.; Duarte, A. M. R. C.; Lal, A. A.; Oliveira, S. G.; Kloetzel, J. K. 1997. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae/P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 2, p. 235-243.

Deane, L. M, 1986. Malaria vectors in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 81 (suppl.II): 5-14.

Deane, L. M.; Causey, O. R.; Deane, M. P. 1948. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das Regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, v. 1, n. 4, p. 827-963.

Elliott, R. 1972. The influence of vector behavior on malaria transmission. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 21:755-63.

Fernandez, R., Carbajal, F., Quintana, J., Chauca, H. & Watts, D.M. 1996. Presencia del *A. (N) darlingi* (Diptera: Culicidae), em alrededores de la ciudad de Iquitos, Loreto-Peru. *Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales*, 5, 10–12.

Flores-Mendoza, C.; Cunha, R. A.; Rocha, D. S.; Lourenço-de-Oliveira. R. 1996. Identification of food sources of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) by precipitin test in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 30, n. 2, p. 123-134.

Fontenille, D.; Meunier, J. Y.; Nkondjio, C. A. ; Tchuinkam, T. 2001. Use of circumsporozoite protein enzyme-linked immunosorbent assay compared with microscopic examination of salivary glands for calculation of malaria infectivity rates in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Cameroon. *J. Med. Entomol.* 38:451–454.

Forattini, O.P. 1962. *Entomologia Médica*. São Paulo, Editora da Faculdade de Higiene e Saúde Pública, vol. 1, 662p.

Forattini O. P., Kakitani I., Marques, G.R.A.M.; Brito, M. 1998. Formas maduras de anofelíneos em recipientes artificiais. *Rev. Saúde Pública*. vol. 32 , n. 2. São Paulo Apr.

Forattini, O.P.; Kakitani, I.; Santos, R.L.C.; Ueno, H.M.; Kobayashi, K.M. 1999. Role of *Anopheles (Kerteszia) bellator* as malaria vector in South-astern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94: 715-723.

Forattini, O. P. 2002. *Culicidologia Médica*, vol. 2. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 864 p.

Fornadel, C. M.; Norris, D. E. 2008. Increased Endophily by the Malaria Vector *Anopheles arabiensis* in Southern Zambia and Identification of Digested Blood Meals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(6), pp. 876–880.

Fornadel, C. M.; Norris, L. C.; Glass, G. E .; Norris, D. E. 2010. Analysis of *Anopheles arabiensis* Blood Feeding Behavior in Southern Zambia during the Two Years after Introduction of Insecticide-Treated Bed Nets. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(4), pp. 848–853.

Galardo A. K. R.; Zimmerman, R. H.; Lounibos I. P.; Young, I.j.; Galardo, C. D.; Arruda, M.E.; D'almeida, A. A. R. C.; 2009. Abundância sazonal de mosquitos anofelinos e sua associação com índice pluviométrico e da malária ao longo do Rio Matapi, Amapá, Brasil. *Medical and Veterinary Entomology* 23, 335–349.

Galvão, A. L. A.; Damasceno, R. G.; Marques, A. P. 1942. Algumas observações sobre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica de Belém, Pará. *Arch. Hig. R.J.* v.12, p.51-111.

Gama, R.A.; Santos, R.L.C.; Santos, F.; Silva, I.M.; Resende, M.C. & Eiras, E.A. 2009. Periodicidade de captura de *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) em Porto Velho, RO. *Neotropical Entomology* 38 (5): 677- 682.

Golterman, H.L.; Clymo, R.S.; Ohnstad, R. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of freshwater*. 2. ed. Oxford: I.B.P. Handbook, nº 8, Blackwell Scientific Publications.

Gomes, A.C; Paula, M.B.; Duarte, A.M.R.C.; Lima, M.A.; Malafronte, R.S., Mucci, L.F.; Gotlieb, S.L.D.; Natal D.; 2008. Epidemiological and ecological aspects related to malaria in the área of influence of the lake at Porto Primavera Dam, in Western São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop. São Paulo*; 50: 287- 295.

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*, v. 8, n. 182.

Hudson, J.E., 1984. *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in the Suriname Rain Forest. *Bull. Entomol. Res.* 74, 129—142.

Lorosa, E. S.; Andrade, R. E.; Rebelo, J.M.M. ; Vinhais, M.C. 1998. Estudo das fontes alimentares através da reação de precipitina e grau de infectibilidade em *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) coletado na Ilha de São Luis-Maranhão. *Entomol. Vect.* 5(6): 241-250

Lourenço-de-Oliveira, R.; Guimarães, A.E.G.; Arlé, M.; Silva, T.F.; Castro, M.G.; Motta, M.A.; Deane, L. M. 1989. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84(4): 501- 514.

Luz, E.; Consolim, J.; Barbosa, O.C.; Torres, P.B. 1987. Larvas de *Anopheles* (Subgênero *Kerteszia*) Theobald 1905 encontradas em criadouros artificiais, no Estado do Paraná, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 21:466-8.

Lynch Arribalzaga F. 1878. Descripción de tres nuevos Culicidae de Buenos Aires. *Nat Argent* 1: 149-152.

Machado, R. L. D.; Póvoa, M. M. 2000. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P.vivax*-like) in three endemic areas of Amazonian Brazil and their correlation with chloroquine-treatment. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 94, n. 4, p. 377-381.

Mackereth, F.J.H.; Heron, J; Talling, J.F. Water analysis: some revised methods for limnologists. [S.L]: *Freshwater Biological Association*, 1978.

Manguin, S., Roberts, D. R., Peyton, E. L., Fernandez-Salas, I., Barreto, M., LOayza, R. F., Spinola, R. E., Granaou, R. M. & Rodrigues, M. H., 1995, Biochemical systematics and population genetic structure of *Anopheles pseudopunctipennis*, vector of malaria in Central and South America. Am. J. Trop.Med. Hyg., 53(4): 362-377.

Mendoza, C.F., Cunha, R.A., Rocha, D.S. e Oliveira, R.L. 1996. Determinação das fontes alimentares de *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, pelo teste de precipitina. *Rev. De Saúde Pública*. p.2-11, v 30.

Miller, L. H.; Mason, S. J.; Clyde, D. F.; Mcginnis, M. 1976. H. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: Duffy blood group genotype, FyFy. The New England Journal of Medicine, v. 295, n. 6, p. 302-304.

Ministério da Saúde. SIVEP/Malária, 2005 – Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica para Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil. Disponível em: http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp.2005 - Acessado em [04/01/2011](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp.2005).

Ministério da Saúde. SIVEP/Malária, 2011 – Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica para Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil. Disponível em: http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp.2011 - Acessado em 12/01/2012.

Ministério da Saúde. SIVEP/Malária, 2011 – Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica para Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da

Saúde. Brasil. Disponível em: http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp.2011 - Acessado em [22/04/2012](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp.2011).

Moreno, M.; Cano, J.; Nzambo, S.; Bobuakasi, L.; Buatiche, J. N.; Ondo, M.; Micha, F.; Benito, A. 2004. Malaria Panel Assay versus PCR: detection of naturally infected *Anopheles melas* in a coastal village of Equatorial Guinea. *Malaria Journal*, v. 3, n. 6.

Mukhopadhyay, A.J., ghosh, K., Braig, H.R. 2000. Identification of cutaneous leishmaniasis vectors, *Phlebotomus papatasi* e *P. duboscqi* using random amplified polymorphic DNA. *Acta Tropica*, 76:277-283.

Mwangangi, J. M.; Muturi, E. J.; Shililu, J. I.; Muriu, S.; Jacob, B.; Kabiru, E. W.; Mbogo, C. M.; Githure, J. I.; Novak, R. J. 2007. Environmental covariates of *Anopheles arabiensis* in a rice agroecosystem in mwea, central Kenya. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(4):371–377.

Nanzel E., Valand, 1964. *American Journal of the Medical Sciences*: April 1964 - Volume 247 - Issue 4 - ppg 407-411.

Narang, S. K., Seawright, J. A. & Suarez, M. F., 1991, Genetic structure of natural populations of *Anopheles albimanus* in Colombia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 7(3): 437-445

Narang, S. K., Toniolo, S. K., Seawright, J. A. & Kaiser, P. E., 1989. Genetic differentiation among sibling species A, B and C of the *Anopheles quadrimaculatus* complex (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 82(4): 508-515.

Neves, D. P. 2005. Livro de Parasitologia Humana 11ª edição. Editora: Atheneu.

Oliveira-Pereira, Y.N.; Rebelo, J.M.M. 2000. Espécies de *Anopheles* no município de Pinheiros (Maranhão), área endêmica de malária. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33: 443-450.

Organización Pan-Americana De La Salud - OPAS, 2005. Status of malaria in the Americas, A Series of Data Tables. *Pan American Health Organization*.

Patz, J. A.; Olsen, S. H. 2006. Malaria risk and temperature: Influences from global climate change and local land use practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 15, p. 5635–5636.

Pott Vali Joana e Arnildo Pott, 2000. *Plantas aquáticas do Pantanal. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal (Corumbá, MS) – Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia*, p. 404.

Póvoa, M. M.; Machado, R. L.; Segura, M. N.; Vianna, G. M.; Vasconcelos, A. S.; Conn, J. E. 2003. Infectivity of malaria vector mosquitoes: correlation of positivity between ELISA and PCR-ELISA tests. *Transactions of the Royal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, n. 1, p. 106-107,

R Development Core Team 2012. Disponível em: <http://cran.r-project.org/doc/manuals/R-exts.html#Tidying-R-code>. Acessado em: 11/12/2012.

Rebêlo, J. M.; Moraes, J. L.; Alves, G. A.; Leonardo, F. S.; Rocha, R. V.; Mendes, W. A.; Costa, E.; Câmara, L. E.; Silva, M. J.; Pereira, Y. N.; Mendonça, J. A. 2007. Distribution of species from genus *Anopheles* (Diptera, Culicidae) in the State of Maranhão, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 23, n. 12, p. 2959-2971.

Rebêlo, J.M.M.; Silva, A.R.; Ferreira, L.A, Vieira, J.A. 1997. *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) e a malária em Buriticupu-Santa Luzia, Pré-Amazônia Maranhense. *Rev Soc Bras Med Trop*;30:107-11.

Rey, L. 2001. *Parasitologia*. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, R. J., Brasil.

Robert, V.; Dieng, H.; Lochouarn, L.; Traoré, S.F.; Trape, J.F.; Simondon, F.; Fontenille, D. 1998. La transmission du paludisme dans la zone de Niakhar, Sénégal. *Trop Med Int Health* 3: 667-677.

Rodrigues, E. I. 2006. Estrutura da comunidade fitoplanctônica como alternativa para avaliação da sustentabilidade biológica de áreas com potencialidade aquícola estabelecida pelo zoneamento costeiro do estado do Maranhão. 2006. 145p. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade de Ecossistemas) - Universidade Federal do Maranhão, São Luis.

Romaña, C. 1939. Utilization de la methode des precipitives pour identification du sang engéré par certain Reduvides. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 32:625-628.

Rosa-Freitas, M.G. 1989. *Anopheles (Nyssorhynchus) deaneorum*: a new species in the albitarsis complex (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 535-543.

Rozendaal, J.A. 1990. Observations on the distribution of anophelines in Suriname with particular reference to the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 221-34.

Rubio J.M.; Post, R.J.; van Leeuwen, W.M.; Henry, M.C.; Lindergard, G.; Hommel, M. 2002. Alternative polymerase chain reaction method to identify Plasmodium species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96(Suppl 1):S199-204.

Rubio-Palis, Y. 1995. Observaciones sobre el patrón de actividad hematofágica del vector de malaria *Anopheles darlingi* en poblaciones del sur de Venezuela. *Boletín de la Direccion de Malariologia y Saneamiento Ambiental*, 35, 66–70.

Ryan, J. R.; Dave, K.; Emmerich, E.; Garcia, L.; Yi, L.; Coleman, R. E.; Sattabongkot, J.; Dunton, R. F.; Chan, A. S. T.; Wirtz, R. A. 2001. Dipsticks for rapid detection of Plasmodium in vectoring Anopheles mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*. 15, 225±230.

Savage, H. M. E.; Rejmankova; Arredondo J. I. 1990. Limnological and botanical characterization of larval habitats for two primary malarial vectors, *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopuncipennis* in coastal areas of Chiapas State, Mexico. *Journal Of The American Mosquito Control, Association* v. 6 , n 4.

Scorza, J.V., Rodriguez, E. & Moreno, G. 1981. Ecología populacional de *Anopheles nuñeztovari* Galbadon, 1940 en el occidente de Venezuela. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, 21, 1–27.

Segura, M. N. O. 1998. *Estudo do An (Nys) albitarsis Arribalzága, 1878 (Diptera: Culicidae) como vetores de malária numa mesma área de transmissão e caracterização de espécies do complexo albitarsis*. 152 p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pará, Museu Emílio Goeldi, Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária, Belém. 43.

Silva A.R. 1979. *Malária: Fotografia de uma crise no setor saúde*. Coleção Ciências da Saúde, Série Saúde Pública. (Tese dissertação). Ed. EDUFMA. P. 1-254.

Silva, A. R; Fernandes J. M. C; Rodrigues, T. A; Santos, H. J.; Cavalheiro, N. N. M; Guimarães, M. C.; Gonçalves, E. G. R. 2009. Controle da malária no Estado do Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42(3):318-324.

Silva, A.R. 1980. *Perspectiva de uma nova estratégia de controle da malária baseada na sua inserção no Sistema Único de Saúde (SUS)*. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; Manual, p.1-12

Singh, B., Bobogare, A., Cox, J., Snounou, G., Abdullah, M.S., Rahman, H.A., 1999. A genus-and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 687–692.

Sinnis, P.; Coppi, A. 2007. A long and winding road: The *Plasmodium* sporozoite's journey in the mammalian host. *Parasitology International*, v. 56, n. 3, p. 171- 178.

Siqueira, A. F. 1960. Estudos sobre a reação de precipitina aplicada a identificação de sangue ingerido por triatomíneos. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2:41-63.

Snounou, G.; Viriykosol, S.; Zhu, P.X.; Jarra W.; Pinheiro, L.; Rosário, V.E.; Thaithong and Brown, K.N. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* . 61. 315-320.

Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics. New York: McGraw-Hill Book. 633p.

Tadei, W.P.; Mascarenhas, B.M.; Podestá, M.G. 1983. Biologia de anofelinos amazônicos. VIII. Conhecimentos sobre a distribuição de espécies de Anopheles na região de Tucuruí-Marabá (Pará). *Acta Amazônica*;13:103-40.

Tadei, W.P.; Santos, J.M.M.; Costa, W.L.S.; Scarpassa, V.M. 1988. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de Anopheles, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 30(3): 221-251.

Tadei, W.P.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B. 1993; Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A.,. *Incidência , distribuição e aspectos ecológicos de espécies de Anopheles (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia Brasileira. In: Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia.* (Eds). Vol. 2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. p. 167- 196.

Tadei, W.P.; Dutary-Thatcher, B.; Santos, M. M. J.; 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): 325-335.

Tadei, W.P.; Dutary-Thatcher, B. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 42, 2: 87-94.

Tadei, W. P. 2001. Controle da malária e dinâmica dos vetores na Amazônia. *Anais/Resumo da 7ª Reunião Especial da SBPC[CD ROOM]. Manaus: Sociedade Brasileira para o progresso da ciência. 1-6.*

Tadei, W. P.; Rodrigues, I. B.; Terrazas, W.; Lima, C. P.; Santos, J. M. M.; Rafael, M. S.; Baggio, J. B.; Lago Neto, J. C.; Gonsalves, M. J. F. e Figueiredo, E. O. 2003. *Malária: Ecology, Transmission and Control*. In: Proceedings 3º Curso: Implementação do controle biológico de mosquitos usando bioinseticida bacteriano. p 50-60.

Tadei, W. P.; Rodrigues, I. B.; Santos, J. M. M.; Rafael, M. S.; Passos, R.A.; Costa, F. M.; Pinto, C.P.; Oliveira, E. M. 2008. O papel da entomologia no controle da malária. *X Reunião de Malária. Rev. Bras. Med. Trop.* 40. sup. II: 22-26.

Teixeira, J.G.; Tundisi, J.G.; Kutner, M.B. 1965. Plankton studies in mangrove environments. II. The standing stock and some ecological factors. *Biol. Instituto Oceanográfico*, v.24, p. 23-41.

Tundisi, J.G. 1969. *Produção primária "Standing stock" e fracionamento do fitoplâncton na região lagunar de cananéia. São Paulo: USP. 131p. Tese Doutorado.*

WHO . World Health Organization World health statistics 2012. Geneva, World Health Organization. Available at: <http://apps.who.int/rhl/en>.

WHO. World Health Organization . 2000. *WHO expert committee on malaria: twentieth report*. Geneva: World Health Organization.

WHO. World Health Organization. 1999. Rolling back malaria. *The world health report: making a difference*. Geneva: World Health Organization.

WHO. World Health Organization. *World malaria report 2008*. Geneve (Switzerland): 1-190.

Wilkerson, R.C.; Parson, T.J.; Klein, T.A.;Gaffgan, T.V.; Bergo, E.; Consolim, J. 1995. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina end Brazil. *Journal of Medicine and Entomology*, 32, 5: 697-704.

Wilson, M. D.; Ofosu-okyere, a.; okoli, a. U.; Mccall, p. J.; Snounou, g. 1998. Direct comparison of microscopy and polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium* sporozoites in salivary glands of mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n.5, p. 482-483.

Xavier, M.M.S.P e Rebêlo, J.M.M 1999. Espécies de *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) em área endêmica de malária, Maranhão, Brasil. Species of *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) in a malaria-endemic area, Maranhão, Brazil. *Rev. Saúde Publica*. vol.33 n. 6. São Paulo.

IX. ANEXOS

10. ANEXOS

10.1 Vegetais identificados na localidade de Buritizinho, Município de Buriticupu



Poaceae ; Gênero Oryza



Marantaceae; Gênero Calathea margenm



Família *Nymphaeaceae* Gênero *Nymphaea*



Família *Cyperaceae* Gênero *Cyperus*



Família *Poaceae* ; Gênero *Oryza*

10.2 Vegetais identificados na localidade Guarapiranga, município de São José de Ribamar



Rhizophora mangle (mangue vermelho)



Laguncularia racemosa



Avicennia germinans



Avicennia schaueriana



Spartina



Família *Nymphaeaceae* Gênero *Nymphaea* nos criadouros

10.3 Manejo ambiental de criadouro em Gurapiranga



Em Guarapiranga o criadouro antes da abertura apresentava esse aspecto.



Medida de controle promovendo a abertura de uma vau para juntar os dois criadouros (permanente e temporário).



Com realização desse projeto também foi construído um Posto de Saúde em Guarapiranga