

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Campus de Dourados
Programa de Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS DA FLORA SUL-MATO-GROSSENSE PARA
CONTROLE DE *Aedes aegypti* EM LABORATÓRIO**

GISELE BENITES FLOR

Orientador: Prof. Dra. Marize Terezinha Lopes Pereira Peres

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Monica Maria B. de M. V. Alves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, *Campus* de Dourados, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Entomologia.

**Dourados
Mato Grosso do Sul - Brasil
Abril/2004**

INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são insetos de atividade noturna ou crepuscular que normalmente são encontrados em matas (Santos-De Marco, 1997). Entretanto, com a diminuição das áreas nativas e conseqüentemente dos habitats naturais desses insetos, algumas espécies que resistem às condições adversas, conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios (Forattini *et al.*, 1976a e 1976b; Gomes & Galati, 1989; Santos-De Marco, 1997).

Esses insetos costumam abrigar-se em troncos de árvores (lisas e com súber marcados), tocas de animais, folhas caídas no solo, arbustos, copa de árvores, frestas em rochas (Aguiar *et al.*, 1985; Alexander *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 1993). Estes locais caracterizam-se por possuírem pequena variação na temperatura e umidade, o que favorece a presença desses insetos, já que os mesmos são muito sensíveis à dessecação. Em alguns casos, esses abrigos correspondem a locais onde as fêmeas encontram seus hospedeiros vertebrados e realizam seu repasto sangüíneo (Basimike *et al.*, 1991; Memmott, 1991). Embora alguns machos alimentados naturalmente com sangue já tenham sido relatados na literatura (Gontijo *et al.* 1987; Santos da Silva & Grünwald, 1999), somente as fêmeas são consideradas hematófagas, utilizando o sangue para a maturação de seus ovos (Forattini, 1973). As larvas de flebotomos são terrestres e seus criadouros encontram-se em locais que possuem matéria orgânica vegetal e animal em decomposição, elevado teor de umidade e ausência de iluminação direta (Forattini, 1973).

Com o passar dos anos, a fragmentação de ambientes silvestres e a posterior transformação em áreas agropastoris ou urbanas têm afetado a fauna de flebotomíneos e a epidemiologia das leishmanioses (Dourado *et al.*, 1989; Asimeng, 1991; Alexander *et al.*, 1992). A fragmentação florestal pode afetar direta ou indiretamente estes insetos, devido às alterações dos seus locais de abrigos e criadouros ou à dispersão de animais silvestres que servem de alimento para as fêmeas hematófagas.

No processo de domiciliação de espécies de flebotomíneos e transmissão das leishmanioses, espécies vetoras podem ser encontradas em áreas alteradas, como plantações, peri e intradomicílio. Um exemplo deste comportamento sinantrópico é o apresentado por *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Gomes *et al.*, 1980). Entretanto, esta espécie ainda pode ser encontrada nas margens das matas ciliares ao longo dos rios.

A ocorrência dos flebotomíneos também está relacionada com alguns fatores climáticos, como temperatura e umidade (Scorza *et al.*, 1968a e 1968b; Miscevic, 1981; Roberts, 1994). Em condições ambientais favoráveis, determinadas populações podem apresentar alterações em seu ritmo circadiano e tornarem-se ativas para a hematofagia em horários diferentes daqueles normalmente observados para a espécie, passando então a atacar os hospedeiros durante o dia, facilitando assim, a transmissão das leishmanioses.

Considerada como uma zoonose em algumas regiões do Brasil, a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma enfermidade cujo processo de transmissão envolve um reservatório (mamífero doméstico ou silvestre), um inseto hematófago ou vetor flebotomíneo e alguns hospedeiros vertebrados secundários. Segundo Young & Duncan (1994), os vetores no Novo Mundo são fêmeas de insetos da subfamília Phlebotominae e do gênero *Lutzomyia*. As espécies consideradas como possíveis transmissoras, mais freqüentemente encontradas na Região Centro-Oeste, pertencem ao subgênero *Lutzomyia s. str.* sendo elas *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Galati *et al.*, 1997, Santos *et al.*, 1997).

A biologia básica dos flebotomíneos tem sido estudada em todo mundo, contudo a maioria das informações é proveniente de observações realizadas em colônias de laboratório ou dos poucos dados obtidos em campo. A falta de trabalhos sistematizados e por longos períodos de tempo tornam indispensáveis as pesquisas sobre o ciclo de vida e comportamento dos flebotomíneos. De uma forma geral, as espécies que compõem um táxon seguem um padrão geral de morfologia e comportamento; nas subdivisões desse táxon encontram-se derivações nos aspectos biológicos das espécies. Cada espécie evolui de forma a interagir com seu hábitat; seu comportamento deve refletir um processo evolutivo no qual ocorreu uma interdependência do ambiente e das comunidades que ali habitam. Como cada espécie de flebotomíneo interage de maneira singular com seu hábitat, é importante conhecer seu comportamento natural para se compreender como suas populações são reguladas, e ainda, como a transmissão de leishmanioses pode estar ocorrendo numa determinada região (Santos-De Marco, 1997).

Talvez, quando se conhecer um pouco mais as relações bióticas e abióticas que regulam e controlam as populações de flebotomíneos, seja possível pensar em maneiras de prever e até evitar surtos da doença na população humana e animal em locais de riscos de transmissão.

Diferença entre habitats

A diversidade de uma comunidade está intimamente ligada à capacidade das espécies em otimizar a utilização dos habitats disponíveis. Dentro de uma comunidade, as espécies podem apresentar uma partição horizontal (em uma seqüência de habitat intercalado) ou vertical (estratos de uma floresta). Os habitats estruturalmente complexos (heterogêneos) oferecem maior variedade de microhabitats. Como existem muitas maneiras de explorar estes microhabitats, a diversidade de espécies deve ser maior nos habitats complexos (Pianka, 1982).

A presença de *Lu. longipalpis* em elevada densidade na margem de matas foi relatada por Aguiar *et al.* (1996) em Itaguaí, RJ, na Serra do Mar. Essa espécie tem sido ainda, associada às zonas áridas e semi-áridas de ambiente rural e urbano e, embora mais freqüente nos abrigos de animais domésticos, é também numerosa no interior das habitações (Deane & Deane, 1962; Lainson, 1985; Sherlock & Guitton, 1969). Pode ainda ser encontrada em abundância em ecótopos naturais, tais como: grutas, fendas nas rochas, troncos e ocos de árvores (Corredor *et al.*, 1989; Deane & Deane, 1957; Mangabeira, 1969; Martins *et al.*, 1956; Sherlock & Guitton, 1969).

Kamhawi *et al.* (1991), na Jordânia, Herrero *et al.* (1991 e 1993), na Costa Rica e Casanova (1997), no Estado de São Paulo, Brasil, encontraram resultados que corroboram a hipótese de que o peridomicílio fornece aos flebotomíneos um habitat propício para o estabelecimento de abrigos e criadouros.

Fatores abióticos e a regulação das populações de flebotomíneos

Wolda (1978) apresentou a hipótese de que em ambientes tropicais, onde há maior previsibilidade de chuvas e uma grande estabilidade climática, ocorreriam pequenas flutuações nas populações de insetos. Correlações entre as variações de fatores ambientais e a flutuação nas populações de insetos, evidenciando-se o início ou o fim da atividade sazonal de algumas destas, já foram observadas, contudo, sem que se estabelecesse o vínculo causal dessas associações (Wolda, 1989).

Muitos trabalhos sugerem que alguns fatores abióticos influenciam, mais ou menos, a ocorrência de determinadas espécies de flebotomíneos, seja por influência direta sobre os adultos ou pelas modificações nas condições dos criadouros. Contudo, a maioria destes

trabalhos não apresenta uma predição das condições ambientais que poderiam levar a surtos populacionais de flebotomíneos (Wolda, 1989 e Scorza *et al.*, 1968c).

Em relação aos flebotomíneos, alguns autores (Barretto, 1943 e Pifano *et al.* 1960) acreditam que para a região neotropical, o padrão geral predominante é o aumento da densidade populacional durante a estação seca e o decréscimo na estação chuvosa. Entretanto, Chaniotis *et al.* (1971) e Rutledge & Ellenwood (1975) sugerem que a sazonalidade dos flebotomíneos está relacionada com os padrões de distribuição das chuvas que agem modificando as condições dos criadouros no chão. De acordo com essa hipótese, as chuvas beneficiariam os flebotomíneos, quando ocorrem moderadamente ao longo da estação chuvosa, mas os prejudicariam quando inundam o chão, destruindo os seus criadouros e matando as larvas e pupas no solo.

Scorza *et al.* (1963) realizaram uma análise sobre as variações de tamanho dos espiráculos anteriores em duas espécies de flebotomíneos de uma mesma região e as correlações com as variações dos fatores meteorológicos. Nesta análise, observaram que a variação morfológica depende estritamente das variações de umidade relativa e propuseram a hipótese da existência de formas estacionais de flebotomíneos adaptados às condições de seca e umidade. Isto demonstra, até certo ponto, a existência de uma dinâmica adaptativa que aproveita a plasticidade morfológica para ajustar o organismo a variações ambientais que poderiam ser fatais. Neste mesmo trabalho, os autores assinalam que as espécies *Micropygomyia yencannensis* (Ortiz, 1965) *Pintomyia youngi* (Felicangeli & Murillo, 1985), *Brumptomyia devenanzii* (Ortiz & Scorza, 1963), *Pintomyia ottolinai* (Ortiz & Scorza, 1963) e *Lutzomyia scorzai* (Ortiz, 1965) possuem hábitos restritos por condições climáticas.

Chaniotis & Anderson (1968) determinaram, na Califórnia, que o limite máximo de temperatura para se observar a atividade de flebotomíneos no campo foi de 28 °C e o mínimo de 12 °C, sendo que a estação do ano em que se verificou o maior número de flebotomos ativos foi a seca e quente. Scorza *et al.* (1968a) acreditavam ser a umidade do ar o fator diretamente responsável pela presença de flebotomíneos nos diversos microhabitats estudados em Rancho Grande, Venezuela. Scorza (1972), na Venezuela, não encontrou correlação entre o número de flebotomíneos coletados por noite e os fatores ambientais, como luminosidade, temperatura, umidade e vento.

De Queiroz *et al.* (1991) detectaram no Ceará, a prevalência de *Ny. whitmani* quando a temperatura atingiu os 24°C e a umidade 84%, durante a estação seca. Mendoza *et al.*, (1991)

observaram correlações negativas entre *Lu. orestes* e a temperatura e a umidade do ar. Brinson *et al.* (1992) e Comer *et al.* (1994) assinalaram *Psathyromyia shannoni* como uma espécie anual, com preferências por temperaturas superiores a 10°C. Estes autores sugerem que esta espécie entra em quiescência no inverno, mantendo assim uma baixa população nesta época do ano. Roberts (1994), em trabalho realizado em Oman, concluiu através de uma análise de regressão múltipla que o principal fator que afeta a abundância de flebotomíneos naquele local é a intensidade luminosa. Além disso, o estudo indicou que a umidade e a velocidade do vento foram também importantes fatores que afetaram a abundância de espécies. Morrison *et al.* (1995) observaram que a abundância de *Lu. longipalpis* na Colômbia foi correlacionada negativamente com a temperatura e positivamente com a umidade relativa do ar.

Santos-De Marco (1997), em pesquisa realizada no Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, observou que na época chuvosa, foram coletadas mais espécies em armadilha de Shannon e em isca humana. A autora também relata que os diferentes padrões de comportamento observados entre as estações do ano, no interior da mata e em sua margem, revelam a dependência dos flebotomíneos quanto às condições mais estáveis de temperatura e umidade, ressaltando que houve um aumento do número de espécies coletadas no interior da mata, durante a época de seca, quando a manutenção de temperatura e umidade constantes era maior do que em sua margem. Durante a estação chuvosa, Santos-De Marco (1997) encontrou um número maior de espécies na margem da mata, quando este local apresentava menor umidade do que no interior da mata, sugerindo que esse comportamento dos flebotomíneos durante esta época do ano pode indicar que a umidade excessiva no ambiente representa um fator de risco físico para os flebotomíneos.

Aspectos taxonômicos e epidemiológicos de *Leishmania chagasi*

A Leishmaniose Visceral (LV) foi primeiramente relatada no Brasil por Migone (1913) e observada por Penna (1934), ao examinar fígado de pacientes suspeitos de infecção por febre amarela. Este último autor identificou também que o Ceará era um importante foco da doença. Dois anos depois, em Sergipe, Chagas (1936) fez a primeira descrição de LV em um paciente vivo. Posteriormente, Cunha & Chagas (1937) nomearam o agente etiológico desta enfermidade como sendo *Leishmania chagasi*. No ano seguinte, Cunha (1938) não conseguiu diferenciar esta espécie de *Le. infantum* Nicolle, 1908 a responsável pela LV na região do

Mediterrâneo. Além disso, outros autores, como Deane (1956), chegaram a considerar *Le. chagasi* como sendo *Le. donovani* (Laveran & Mesnil, 1903), responsável por LV em regiões da África e Ásia. Embora a denominação *Le. chagasi* tenha se consagrado durante os anos, recentemente, alguns autores têm contestado o real *status* taxonômico desta espécie. Com o advento de técnicas mais elaboradas, mais recentemente, Thomaz-Soccol *et al.*, (1993), Maurício *et al.*, (2000) consideraram *Le. chagasi* como sinônimo júnior de *Le. infantum*. Segundo estes últimos autores, *Le. chagasi* seria *Le. infantum* que foi introduzida durante a colonização das Américas pelos espanhóis e portugueses. A existência de *Le. chagasi* antes da colonização é refutada dentre outras razões pelo fato de que existe menor variabilidade entre *Le. chagasi* e *Le. infantum* do que entre diferentes isolados de *Le. donovani*. Deste modo, em 500 anos, não poderia ter ocorrido especiação em *Le. chagasi*.

Desde a identificação de *Le. chagasi* como agente etiológico da LV, em 1937, o encontro freqüente de *Lu. longipalpis* em áreas contíguas às residências levou à suspeita de que este seria o inseto vetor. Este fato foi confirmado por Deane & Deane (1954) em estudos realizados no Ceará. O flebotomíneo *Lu. longipalpis* foi originalmente descrito por Lutz & Neiva (1912) de exemplares capturados nos estados de Minas Gerais e São Paulo; todavia, Costa Lima (1932) denunciou o erro, por parte desses autores, na identificação dos espécimes paulistas, o quais pertenciam a *Pintomyia fischeri* (Pinto, 1926). A larga distribuição de *Lu. longipalpis* coincide com a área de LV que vai desde o México até a Argentina (Young & Duncan 1994), tendo habilidade de ocupar vários hábitats, incluindo aqueles resultantes de ação antrópica. Deste modo, existem inúmeras barreiras geográficas separando as populações de *Lu. longipalpis*, resultando em variabilidade intraespecífica. Segundo Lanzaro *et al.* (1993) a deriva genética e/ou seleção seriam responsáveis por variações na capacidade vetorial destas espécies constituindo o “complexo *longipalpis*” (revisado por Uribe, 1999). Em ambientes silvestres, cães selvagens (*Cerdocyon thous* e *Dusycion vetulus*) poderiam servir de reservatório para *Le. chagasi* (Deane & Deane, 1954). Cães e possivelmente gambás sinantrópicos (*Didelphis marsupialis*) (Sherlock *et al.*, 1984) também representariam os reservatórios domésticos.

Os diferentes padrões de comportamento das espécies de *Leishmania* dentro do tubo digestivo das espécies dos flebotomíneos permitiram a divisão deste gênero em dois subgêneros: *Leishmania* Ross, 1903 e *Viannia* Lainson & Shaw, 1987 (Lainson *et al.*, 1987). Em relação ao subgênero *Leishmania*, do qual faz parte *Le. chagasi*, o desenvolvimento

destes parasitos está restrito ao intestino médio, com subsequente migração para o intestino anterior. Este subgênero contém todas as espécies de *Leishmania* com desenvolvimento suprapilórico (Lainson *et al.*, 1987) presentes no Velho e no Novo Mundo. Os parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia*, do qual faz parte *Le. braziliensis*, estão restritos ao Novo Mundo e desenvolvem-se inicialmente na região mediana do intestino (Killick-Kendrick, 1979). Neste local, os parasitos encontram-se aderidos pelo flagelo através de hemidesmossomas. Posteriormente, os flagelados se desprendem e migram em direção ao intestino posterior e porções mais anteriores do tubo digestivo, onde são injetados no hospedeiro vertebrado em um próximo repasto sangüíneo. Portanto, este subgênero *Vianna* é considerado peripilórico (Lainson *et al.*, 1987).

O tubo digestivo dos flebotomíneos

O desenvolvimento das espécies de *Leishmania* no interior dos flebotomíneos é um processo muito complexo e vários trabalhos já foram descritos detalhando aspectos moleculares e estruturais envolvidos nesta interação. Os dados na literatura referentes a este assunto incluem, geralmente, espécies de *Leishmania* do Velho Mundo como *Le. major* Yakimoff & Schokor, 1914 e *Le. donovani*. Resumidamente, o ciclo ocorre quando os flebotomíneos, ao realizarem o repasto sangüíneo no hospedeiro vertebrado, ingerem as formas amastigotas do interior de macrófagos. No interior do tubo digestivo do vetor, ocorrem várias modificações fisiológicas tanto no protozoário, quanto no inseto. O processo culminará com a formação de formas promastigotas metacíclicas (infectantes), que serão injetadas novamente no hospedeiro vertebrado nos repastos sangüíneos subsequentes.

O tubo digestivo do mosquito inicia-se no aparelho bucal (probóscide), continuando-se pelo cibário, faringe até o intestino. Este último é formado por três regiões, anterior, média e posterior, que diferem quanto à origem embriológica e por esta razão, a região anterior e posterior são quitinizadas (origem ectodérmica) e região média não é quitinizada (origem endodérmica). Entre o cibário e a faringe está a válvula cibarial e, entre a faringe e o intestino anterior está a válvula do estomodeu. Entre esta última e os túbulos de Malpighi está o intestino médio que se divide em torácico e abdominal. O funcionamento simultâneo das válvulas cibarial e do estomodeu, juntamente com as bombas cibarial e faringiana, é importante no processo de sucção de sangue (Schlein *et. al.*, 1992). Nos insetos, a digestão

ocorre no intestino médio, sendo que as fezes e a urina passam para o intestino posterior, onde água e sais também são absorvidos (Richards & Davies, 1977; Chapman, 1985).

OBJETIVOS

Neste trabalho, buscou-se investigar a fauna de flebotomíneos, considerando sua diversidade e abundância em função de variáveis como temperatura, umidade relativa do ar, velocidade do vento e ambientes antrópicos, além de identificar a infecção natural do trato digestivo de fêmeas por formas flageladas promastigotas de protozoários do gênero *Leishmania* e a sua prevalência nas populações vetoras de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, capturadas nas áreas indígenas do município de Antônio João, Estado de Mato Grosso do Sul.

METODOLOGIA

Características gerais

O trabalho foi desenvolvido nas áreas indígenas, Aldeia Campestre, Aldeia Marangatú e Povoado Campestre localizadas no município de Antônio João (22°11'28"LS e 55°56'51" LW), altitude 750m, Estado de Mato Grosso do Sul. A área do município compreende 1.143,76 Km², incluindo o distrito de Campestre. Apresenta população de 7.408 habitantes e como principal atividade, a pecuária, com predomínio de bovinocultura (IBGE, 2000).

A cobertura vegetal primitiva em áreas das encostas e fundo de vales ainda recobre a maior parte da área. Nas ondulações mais suaves, ocorre predomínio de cerrado, que segundo Eiten (1983), pode ser identificado como Arvoredo Tropical Xeromorfo Latifoliado Semidecíduo.

O relevo é modelado em rochas sedimentares diversas, das formações Furnas, Ponta Grossa, Aquidauana e Botucatu, com ocorrências de granito a sudoeste. Apresenta dois patamares de topografia com elevadas ondulações separados por uma escarpa abrupta. O que se volta para a rede hidrográfica pertencente à bacia do Rio Paraguai tem como principal curso d'água o Rio Apa e o outro, voltado para a bacia hidrográfica do Rio Paraná, apresenta como o principal curso d'água, a nascente do Rio Dourados. No conjunto, esses patamares formam a Serra de Maracajú. Com as altitudes mais elevadas que oscilam a pouca mais de 750m, o município é considerado um principal divisor de águas das redes de bacias hidrográficas de Mato Grosso do Sul, representada pelo Rio Paraná e Rio Paraguai (IBGE, 2000).

Características locais

Povoado Campestre: situado nos paralelos 22° 12' 42 LS; 56° 02' 05" LW, em altitudes de 398 a 430 metros do nível do mar, distando 8 km da sede municipal, com acesso por estrada de terra, caracteriza-se por apresentar uma grande área de pastagem ao redor da pequena vila, com população constituída por cerca de 180 moradores, cuja maioria reside em casas de madeira, em pequenas propriedades. Desenvolve apenas economia de subsistência, com cultivo de arroz, milho, feijão, mandioca e árvores frutíferas (mangueiras); criação de aves e suínos.

Aldeia Campestre (22°13'12"LS; 56°03'36"LW), altitude de 430 a 450 metros do nível do mar, e distância de 800 m do Povoado Campestre, apresenta área de 8 hectares demarcada pelo Governo Federal. A população é composta por 130 habitantes e representada por índios da etnia Kaiwá. As casas são construídas de pau-a-pique e cobertas de sapé e/ou folhas de coqueiros. Economicamente, muitos dependem de cestas básicas doadas pelo governo, outros de aposentadoria, mas existem aqueles que desenvolvem cultura de subsistência, como o cultivo do arroz, milho, feijão e mandioca; criação de aves e suínos.

Aldeia Marangatú (22°13'17"LS; 56°03'13"LW), altitude de 340 a 360 metros a.n.m. situa-se a 2,8 km do Povoado Campestre. Possui área de 36 hectares que se encontra em litígio com fazendeiros. A população é constituída por cerca de 356 índios de etnia Kaiwá. A maioria é remanescente de extintas aldeias da região e de aldeias do país vizinho, Paraguai. As casas são de pau-a-pique, cobertas de sapé e/ou folhas de coqueiros. A situação econômica é precária, muitos dependem de cestas básicas doadas pelo governo, outros, da aposentadoria, mas existem aqueles que trabalham em usina, no corte da cana-de-açúcar e os que desenvolvem cultura de subsistência, como o cultivo do arroz, milho, feijão e mandioca; criação de aves e suínos. Observou-se ainda que os residentes utilizam fogueira dentro das casas para cozinhar os alimentos e se aquecerem.

Método de coleta

Os flebotômicos foram capturados mensalmente durante o período de maio a outubro de 2003, utilizando-se armadilhas automáticas luminosas tipo CDC (Sudia & Chamberlain, 1962), instaladas no peri e intradomicílio de uma habitação situada em cada uma das áreas indígenas e do Povoado Campestre. Foram realizadas 6 coletas em cada localidade,

utilizando-se 10 armadilhas, 5 para o peri e 5 para o intradomicílio, com intervalo entre as coletas de 30 dias, em média, totalizando 180 amostras.

No peridomicílio, foram amostrados pocilgas, galinheiros, currais e abrigos de cães e no intradomicílio, quartos e/ou dormitórios. As armadilhas ficaram expostas durante um período de 12 horas a partir de 30 minutos após o crepúsculo, por três noites consecutivas, segundo metodologia proposta por Vranjac (1999).

Os espécimes capturados foram levados para o laboratório da FUNASA em gaiolas de tecidos ou caixa de isopor, com temperatura abaixo de 20°C e umidade acima de 70%, sendo mantido no interior das gaiolas, um chumaço de algodão embebido em solução concentrada de açúcar ou mel.

No laboratório, os indivíduos capturados foram anestesiados com éter ou em geladeira como sugere Marcondes (2001). As fêmeas de flebotomíneos foram então dissecadas em lâmina com solução fisiológica, retirando-se a cabeça e a parte posterior do abdome. Este material foi examinado no microscópio para a identificação da espécie do flebotomíneo e pesquisa de formas flageladas promastigotas, observando-se a morfologia e localização das mesmas no trato digestivo. Quando da presença de formas flageladas, parte do trato digestivo foi inoculada em hamster e/ou meio de cultura, para isolamento e estudo dos parasitas e parte foi mantida em etanol 70°GL, para identificação por técnicas moleculares. As fêmeas foram identificadas, a fresco, pela observação das espermatecas e da cabeça. Quando necessário, as mesmas foram clarificadas e montadas entre lâmina e lamínula em líquido de Berlese, obtendo-se uma montagem mais duradoura. Para a identificação dos gêneros e espécies de flebotomíneos, utilizou-se a chave de identificação de Galati (2003b) e nomenclatura das espécies segue Galati (2003a) Uma amostra deste material será conservada como testemunha no Laboratório de Ecologia de Insetos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-*Campus* Dourados/MS e Laboratório Regional de Entomologia de Dourados, SES/MS.

A identificação dos parasitas por técnicas moleculares foi realizada no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo-USP, em São Paulo-SP.

Análise dos dados

A distribuição dos flebotomíneos foi analisada em função de algumas variáveis, como a presença e ausência de pocilgas e galinheiros, umidade relativa do ar, velocidade do vento em metros/segundo, temperatura média, altitude, número de pessoas e de cães por residência.

As informações de ocorrência das espécies e a correlação entre as variáveis ambientais foram obtidas através de Análise de Variância.

Para a análise das variáveis e índices de riqueza foi utilizado o programa Estimate S (Colwell, 1997), sendo os dados de abundância utilizados para cálculo dos índices de riqueza observada de Chao1 e posteriormente, para a construção das curvas área espécies por ambiente.

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{F_1^2}{2(F_2 + 1)} - \frac{F_1 F_2}{2(F_2 + 1)^2}$$

sendo que:

Sobs = Número total de espécies observadas em todas as amostras agrupadas;

Fi = Número de espécies com os indivíduos exatamente quando todas as amostras são agrupadas (F1 = frequência relativa e F2 = frequência acumulada).

Para a análise dos padrões de distribuição, gerou-se uma matriz de similaridade tipo Bray-Curtis que foi então utilizada para realizar a análise de Escalonamento Multidimensional (MDS) com duas e três dimensões.

O índice de infecção por flagelados foi calculado pelo número de fêmeas encontradas com infecção por flagelados, dividido pelo nº de fêmeas dissecadas. Para a análise da densidade dos flebotomíneos segundo os fatores, foram considerados as médias geométricas de Williams (Haddow, 1960) empregando-se o teste de Kruskal-Wallis (Siegel, 1975).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biodiversidade e riqueza

De um total de 180 amostras, foram obtidos 1.174 flebotomíneos pertencendo a cinco gêneros e sete espécies: *Lutzomyia (L.) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939), *Evandromyia (Barrettomyia) cortelezzii* (Brèthes, 1923) *Evandromyia (Aldamyia) lenti* (Mangabeira, 1938), *Psathyromyia (P.) shannoni* (Dyar, 1929), *Psathyromyia (Forattiniella) campograndensis* (Oliveira *et. al.*, 2001) e *Brumptomyia avellari* (Costa Lima, 1932). A espécie mais abundante foi *Lu. longipalpis* com cerca de 82,19% dos espécimes coletados, seguida de *N. whitmani* com 11,41% e a espécie menos abundante foi *P. campograndensis*, com 0,09% (Tabela 1).

As médias mensais para a razão machos/fêmeas nas espécies mais frequentes encontra-se próxima de 4/1 para *Lu. longipalpis* e de 2/1 para *N. whitmani*. A predominância

de fêmeas foi observada na razão de 2/1 em *E. cortelezzii*, já para as espécies *E. lenti* e *Brumptomyia avellari* observou-se um certo equilíbrio entre os sexos; Apenas uma fêmea de *P. campograndensis* foi capturada durante todo o estudo (Tabela 2).

A espécie *P. campograndensis* foi descrita em 2001, sendo que sua distribuição ainda não é suficientemente conhecida no Estado de Mato Grosso do Sul (Oliveira *et al.*, 2001).

Não foram observadas diferenças significativas, quanto aos índices de riqueza, para as três localidades e isto pode ser verificado pelos desvios-padrão encontrados em praticamente todas as coletas (Figura 1).

Tabela 1. Abundância de flebotomíneos e frequência relativa % obtidas das 6 coletas realizadas no Intra- e Peridomicílio, segundo as localidades pesquisadas no município de Antônio João, MS, durante maio a outubro de 2003.

Espécies	Aldeia			Povoado			Aldeia			Total	
	Campestre			Campestre			Marangatú			Fleb.	Fr%
	Intra	Peri	Fr%	Intra	Peri	Fr%	Intra	Peri	Fr%		
<i>Lu. longipalpis</i>	166	124	24,7	100	559	56,13	16	0	1,36	965	82,20
<i>N. whitmani</i>	0	3	0,26	7	107	9,72	2	15	1,45	134	11,41
<i>E. cortelezzii</i>	4	2	0,51	10	32	3,58	0	0	0,00	48	4,09
<i>E. lenti</i>	0	3	0,26	0	5	0,43	4	1	0,43	13	1,11
<i>B. avellari</i>	2	3	0,26	0	3	0,26	3	0	0,26	11	0,94
<i>P. shannoni</i>	0	0	0,00	0	2	0,17	0	0	0,00	2	0,17
<i>P. campograndensis</i>	0	1	0,09	0	0	0,00	0	0	0,00	1	0,09
Total	172	136	26,23	117	708	70,29	25	16	3,50	1174	100

Intra= intradomicílio, Peri= peridomicílio, Fr= frequência relativa , Fleb = flebotomíneos.

Tabela 2. Média mensal de flebotomíneos, segundo espécie e sexo, capturados com armadilhas automáticas luminosas, tipo CDC, no município de Antônio João–MS, durante maio a outubro de 2003.

Período	n	Arma dilhas Posit.	<i>Lutzomyia longipalpis</i>		<i>Nyssomyia whitmani</i>		<i>Evandromyia cortelezzii</i>		<i>Evandromyia lenti</i>		<i>Psathyromyia shannoni</i>		<i>Brumptomyia avellari</i>		<i>Psathyromyia campograndensis</i>	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Maio	30	3	0,13	-	0,03	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Junho	30	11	2,00	0,33	0,30	0,13	-	0,23	0,03	0,03	0,03	-	-	0,07	-	-
Julho	30	18	7,10	1,30	1,10	0,30	0,13	0,37	-	0,07	0,03	-	-	0,03	-	-
Agosto	30	10	9,97	2,60	0,97	0,87	0,23	0,40	0,03	-	-	-	0,03	-	-	-
Setembro	30	7	2,70	0,40	0,17	0,10	0,07	0,07	-	-	-	-	-	0,03	-	-
Outubro	30	18	4,83	0,80	0,23	0,27	0,03	0,03	0,13	0,13	-	-	0,03	0,17	-	0,03
Total	180	67	4,46	0,91	0,47	0,28	0,08	0,18	0,03	0,04	0,01	-	0,01	0,05	-	0,01

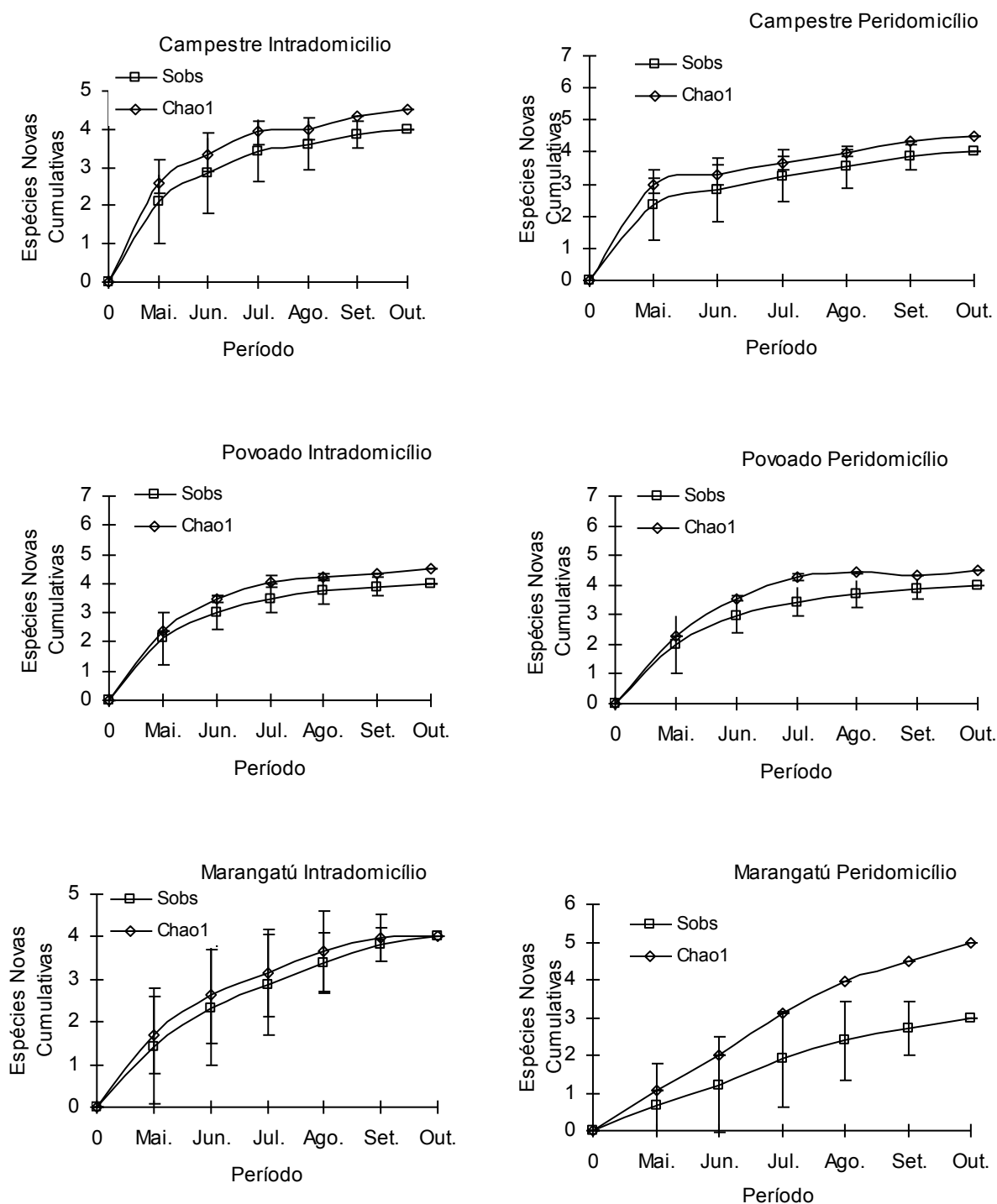


Figura 1. Riqueza observada de flebotomíneos (Sobs) nos diferentes ambientes e índice de primeira ordem (Chao 1) mais desvios-padrão para cada área estudada, durante os meses de maio a outubro de 2003, município de Antônio João-MS.

A análise da riqueza de flebotomíneos entre os ambientes revela que não houve diferença significativa entre as espécies esperadas e observadas. Somente na Aldeia Marangatú (peridomicílio) a curva encontra-se ainda ascendente, indicando que as coletas não foram suficientes para amostrar todas as espécies desta área. Provavelmente mais espécies raras poderiam ser encontradas com um esforço amostral um pouco maior (Figura 1).

A maior abundância da espécie de *Lu. longipalpis* nas capturas nos meses de julho e agosto (Figura 2) contribuíram para os índices de positividade das armadilhas. A frequência constante dessas espécies ao longo do período sugere a existência de criadouros nesse ecótopo. Kamhawi *et al.* (1991), na Jordânia, Herrero *et al.* (1991 e 1993), na Costa Rica e Casanova (1997), no Estado de São Paulo, Brasil, encontraram resultados que corroboram a hipótese de que o peridomicílio fornece aos flebotomíneos um hábitat propício para o estabelecimento de abrigos e criadouros.

Um outro aspecto, que parece configurar as localidades Povoado Campestre e Aldeia Campestre como criadouro de flebotomíneos (Tabela 1), pode ser observado por meio das médias entre os sexos e pela abundância das espécies durante o período de coletas. Assim, no início das coletas (maio/2003), foram verificados somente os machos das espécies *Lu. longipalpis* e *N. whitmani*; e as fêmeas somente apareceram nos meses subsequentes. Para *E. cortelezzii* ocorreu predominância de fêmeas em todas as coletas (Tabela 2).

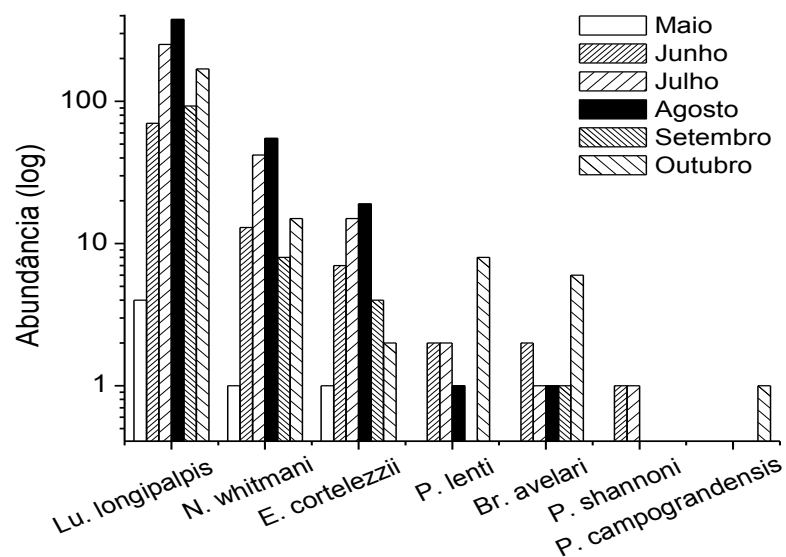


Figura 2. Abundância das espécies de flebotomíneos para os diferentes períodos de coletas em três localidades do município de Antônio João-MS, (maio-outubro/2003).

Diferença entre habitats

As armadilhas automáticas luminosas, tipo CDC, foram eficientes para captura dos flebotomíneos, sendo que os índices de positividade variaram entre os ambientes pesquisados. Os índices mais elevados (90%) ocorreram no Povoado Campestre e na Aldeia Campestre (70%), durante o mês de julho e na Aldeia Marangatú (70%), em outubro (Figura 3). As armadilhas luminosas têm sido empregadas para estudar aspectos de comportamento dos flebotomíneos e de outros dípteros em ambientes florestais ou no peri e intradomicílio de áreas rurais (Dourado *et al.*, (1989).

Em todas as localidades pesquisadas, *Lu. longipalpis* e *N. whitmani* foram as espécies mais abundantes. Foi observado por outros autores que *Lu. longipalpis* tem sido associada às zonas áridas e semi-áridas de ambiente rural e urbano e, embora seja mais freqüente nos abrigos de animais domésticos, é também numerosa no interior das habitações (Deane e Deane, 1962; Lainson, 1985; Sherlock e Guitton, 1969). A espécie *N. whitmani*, encontrada na Região de Antônio João é considerado o principal vetor da leishmaniose tegumentar no Brasil.

As espécies *E. cortelezzii*, *E. lenti*, *B. avellari*, *P. shannoni* e *P. campograndensis* foram encontrados de modo esporádico e com baixas densidades populacionais nos dois ambientes intra- e peridomicíliar das localidades pesquisadas (Tabela 1).

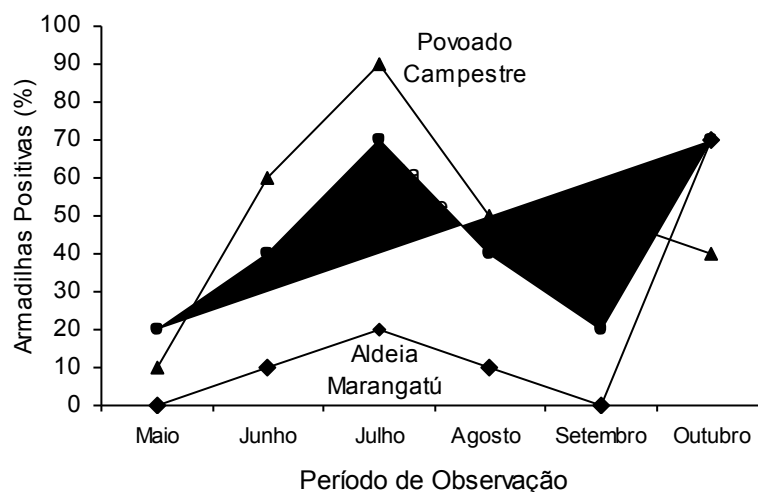


Figura 3. Porcentagem de armadilhas (CDC) positivas para flebotomíneos, durante o período (maio a outubro/2003) estudado nas três localidades município de Antonio João-MS.

O resultado da análise de variância para a interação entre meses de coletas e localidades pesquisadas não foi significativamente diferente ($F=2,0337$; $P=0,10$) para os intervalos entre períodos de coletas (Tabela 3).

Não houve diferença significativa entre os locais de coletas (intra e peridomicílio) e a média de flebotomíneos em cada repetição ($F=0,8054$; $P=0,10$); e entre o tempo (meses de coletas) com a média de flebotomíneos coletados no período ($F=1,1100$; $P=0,10$) (Tabela 4).

Tabela 3. Análise de Variância fatorial com 5 x 6 x 6, para as populações de flebotomíneos em três localidades do município de Antônio João-MS (período de maio a outubro de 2003).

FV	GL	SQ	QM	F	F Tab (10%)
Locais	5	10917,91	2183,582	0,8054	2,16
Res (A)	20	54221,4	2711,07		
Tempo	5	4472,111	894,4222	2,0337	1,95
Tempo x Local	25	12204,89	488,1956	1,1100	1,51
Tempo x Repet	20	7200,444	360,0222		
Res (B)	100	43980,16	439,8016		
Total	179	132996,9			

Tabela 4. Resultados do teste de Tukey comparando locais x médias de flebotomíneos em cada repetição e tempo (meses de coletas) x média de flebotomíneos em cada período de coletas (maio a outubro de 2003).

Locais	Média de flebotomíneos em cada repetição	Período	Média de flebotomíneos em cada período de coleta
Aldeia Campestre Intradomicílio	39,2 ^{ns}	Maio	1 ^{ns}
Povoado Campestre Intradomicílio	22,4 ^{ns}	Junho	15,83333 ^{ns}
Aldeia Marangatú Intradomicílio	5 ^{ns}	Julho	52,16667 ^{ns}
Aldeia Campestre Peridomicílio	24,8 ^{ns}	Agosto	75,5 ^{ns}
Povoado Campestre Peridomicílio	140 ^{ns}	Setembro	17,66667 ^{ns}
Aldeia Marangatú Peridomicílio	3,4 ^{ns}	Outubro	33,5 ^{ns}

Ns= não significativo

A análise multidimensional para as similaridades da abundância de flebotomíneos das seis áreas mostrou que existe uma agregação entre três ambientes (intra e peridomicílio da Aldeia Campestre e intradomicílio do Povoado Campestre), indicando portanto, um padrão semelhante de distribuição para elas. O mesmo não ocorreu para o peridomicílio do Povoado Campestre e nos dois ambientes da Aldeia Marangatú (Figura 4).

As diferenças observadas entre os ambientes pesquisados podem estar relacionadas com o período das coletas. Isto porque, na Aldeia Marangatú que apresentou a menor frequência de flebotomíneos, observou-se a prática comum na cultura indígena de fazer fogueira dentro das residências, em época de baixa temperatura. Portanto, a fumaça e a fuligem liberada dentro das residências, funcionando como repelentes a estes insetos, podendo ter interferido na abundância de flebotomíneos capturados.

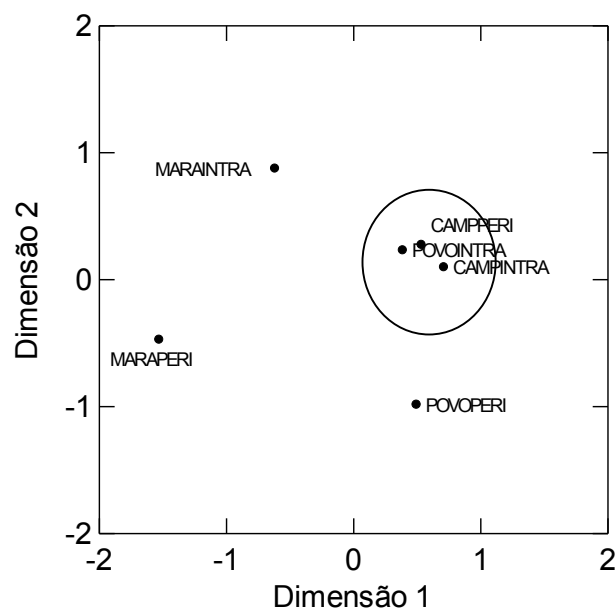


Figura 4. Escala multidimensional monotônica em duas dimensões para análise das similaridades (Bray-Curtis) da abundância de flebotomíneos em seis áreas diferentes. O stress final da configuração foi de 0,02181 com a proporção da variância de 0,99761.

Fatores bióticos e abióticos

Nenhuma das variáveis analisadas foi determinante para a abundância de flebotomíneos, quando verificado através de regressão polinomial. No caso da variável altitude, verificou-se que a maior parte das capturas ocorreu em locais entre 400 e 450m de altitude, entretanto o resultado da regressão ($r^2=0,0263$) não explica um padrão relacionando abundância em função da altitude (Figura 5).

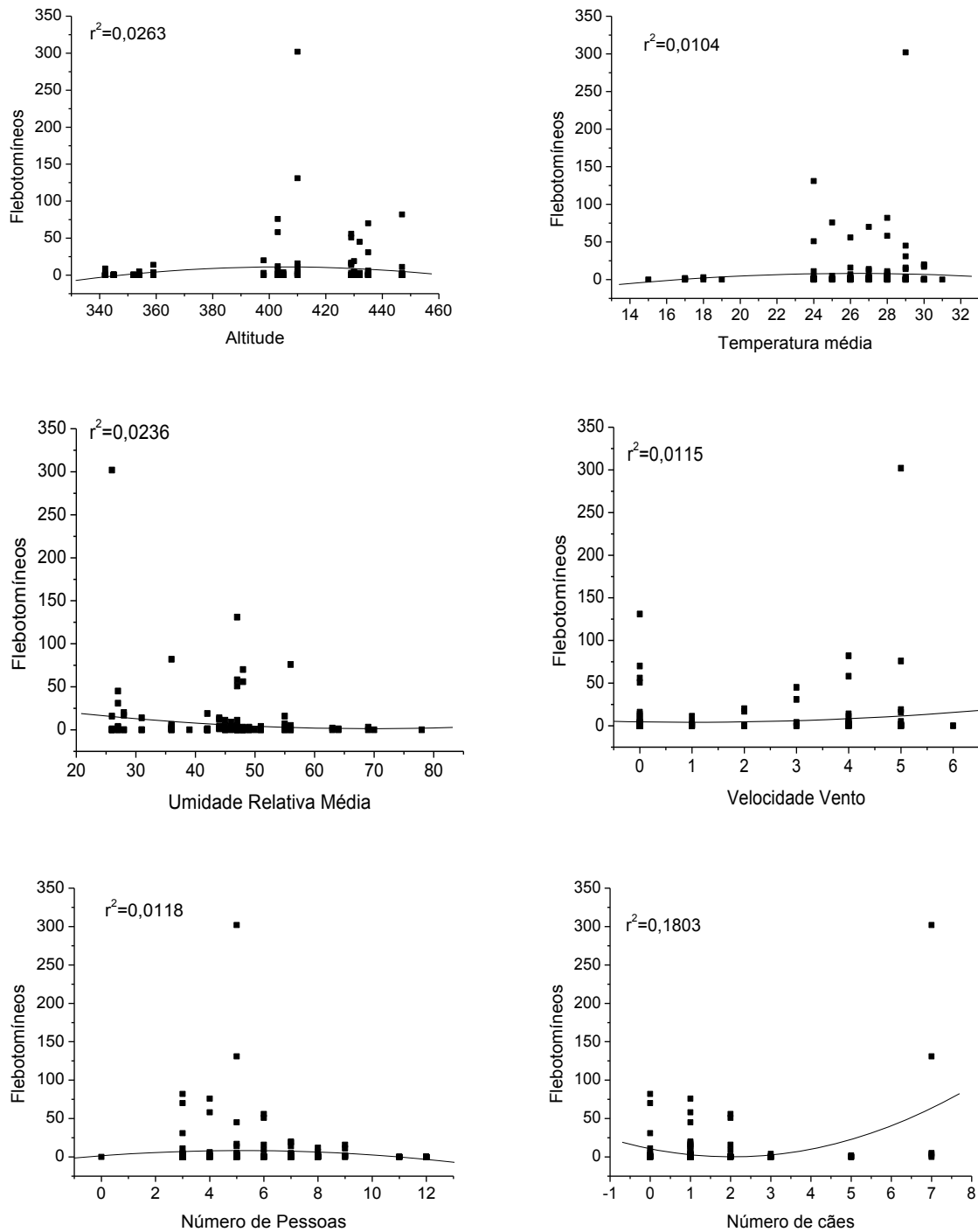


Figura 5. Análise de regressão polinomial para o número de flebotomíneos em relação às variáveis analisadas, no ambientes pesquisados (maio a outubro de 2003), município de Antônio João-MS.

Todas as variáveis analisadas apresentaram baixos resultados para a regressão, não indicando qualquer interferência destes na abundância dos flebotomíneos. A maior parte das capturas de flebotomíneos ocorreu em residências com nenhum ou até mais de dois cães,

entretanto o resultado desta variável ($r^2= 0,1803$), que foi o mais elevado, também não explica um padrão relacionando abundância de flebotomíneos com números de cães.

A presença de picos de abundância dos flebotomíneos pode estar sendo determinada, não por variáveis isoladas, mas pela associação de um conjunto de variáveis que poderia estar sendo importante para as populações avaliadas. Outros fatores exógenos, como as fontes alimentares das formas imaturas e aladas, assim como os inimigos naturais, podem também estar exercendo influências que determinariam a abundância e frequência de espécies. Segundo Galati *et al.* (1997), quando essas condições passam a atuar em sinergismo, pode-se resultar em uma explosão da população alada, tal como ocorreu no período de julho-agosto (Figura 2).

Muitos trabalhos sugerem que alguns fatores abióticos influenciam, mais ou menos, a ocorrência de determinadas espécies de flebotomíneos, seja por influência direta sobre os adultos ou pelas modificações nas condições dos criadouros (Scorza *et al.*, 1968c). A maioria destes trabalhos, entretanto, não apresenta uma predição das condições ambientais que poderiam levar a surtos populacionais de flebotomíneos (Wolda, 1989).

Embora a frequência mais elevada de flebotomíneos capturados tenha ocorrido entre 24°C e 29 °C, o resultado da regressão ($r^2= 0,0104$), também não explica esta tendência, porém, Chaniotis & Anderson (1968), determinaram, na Califórnia, que o limite máximo de temperatura para se observar a atividade de flebotomíneos no campo foi de 28 °C e o mínimo de 12 °C, sendo que a estação do ano em que se verificou o maior número de flebotomos ativos foi a seca e quente. Observou-se ainda uma leve tendência para diminuição da abundância em função da umidade relativa do ar, indicando uma tendência marginalmente significativa para maior abundância de flebotomíneos em tempo quente e seco.

Infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania chagasi*

Foram dissecadas 81 fêmeas de flebotomíneos, pertencendo a quatro gêneros e cinco espécies: 77 de *Lutzomyia (L.) longipalpis*, 1 de *Nyssomyia whitmani*, 1 de *Evandromyia (Barrettomyia) cortelezii*, 1 de *Evandromyia (Aldamyia) lenti* e 1 de *Brumptomyia avellari* (Tabela 5).

Tabela 5. Número de fêmeas de flebotomíneos dissecadas (N), segundo espécie, mês e local de captura: Aldeia Campestre (Al. Cam.), Aldeia Marangatú (Ald. Mar.) e Povoado Campestre (Pov. Cam.), no município de Antônio João, Estado de Mato Grosso do Sul.

Nº do Grupo	Período de Coleta	Espécie	Nº	Localidade			Local		Leishmania
				Ald. Camp.	Ald. Mar.	Pov. Camp.	Intra.	Peri.	
01	Junho	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	11	-	-	X		X	<i>Leishmania</i> sp
02	Junho	<i>Nyssomyia whitmani</i>	1	X			X		-
03	Junho	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	1	X			X		-
04	Junho	<i>Evandromyia cortelezii</i>	1			X	X		-
05	Julho	<i>Evandromyia lenti</i>	1	X				X	-
06	Julho	<i>Brumptomyia avellari</i>	1		X		X		-
07	Julho	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	3	X				X	<i>Leishmania</i> sp
08	Julho	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	12			X		X	<i>Leishmania</i> sp.
09*	Julho	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	1			X	X		<i>Le.(Le.) chagasi</i>
10	Agosto	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	3		X			X	<i>Le.(Le.) chagasi</i>
11**	Agosto	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	33			X		X	<i>Leishmania</i> sp.
12	Agosto	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	2			X		X	<i>Leishmania</i> sp.
13	Outubro	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	11			X		X	<i>Leishmania</i> sp.
Total		5 espécies	81	4	2	7	5	8	

* Grupo com formas promastigotas de *Leishmania* sp. detectadas na dissecação.

** O grupo 11 foi fracionado em partes iguais 11a e 11b, devido a maior abundância de flebotomíneos.

Os espécimes de *Lu. longipalpis*, coletados no Povoado Campestre intradomicílio, em julho/2003, apresentou infecção natural por flagelado, expressando um índice geral de infecção 1,23% e índice específico 1,29% para *Lu. Longipalpis* (Figura 6). O isolamento e identificação dos parasitas só foram possíveis com a técnica de PCR, que revelou para *Lu. longipalpis* taxa de infecção maior em relação à encontrada na dissecação (Figura 7).

Os índices encontrados para PCR DNA ribossômico de 7,79% e para PCR mini-exon que caracteriza a espécie de *Leishmania chagasi* foi 2,59% (Figura 6). O grupo (8) com *Lu. longipalpis*, foi positivo para *Leishmania* spp. não sendo possível determinar a espécie do protozoário devido à pequena quantidade de DNA encontrada no flebotomíneo. As análises para os grupos (2) *N. whitmani*, (3) *Lu. longipalpis*, (4) *E. cortelezii*, (5) *E. lenti* e (6) *B. avellari* foram todas negativas (Tabela 5).

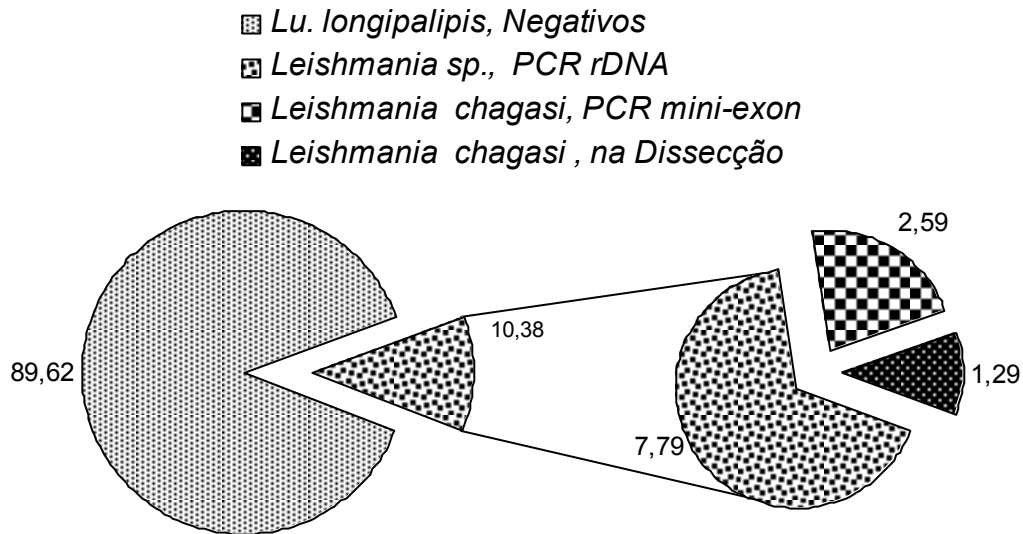


Figura 6. Porcentagem de *Lu. longipalpis* positivos com *Leishmania* sp. e *Leishmania chagasi* nos exames de PCR e formas promastigotas de *Leishmania chagasi* no exames de dissecção de populações provenientes de Povoado e Aldeias do município de Antônio João-MS (maio-outubro/2003).

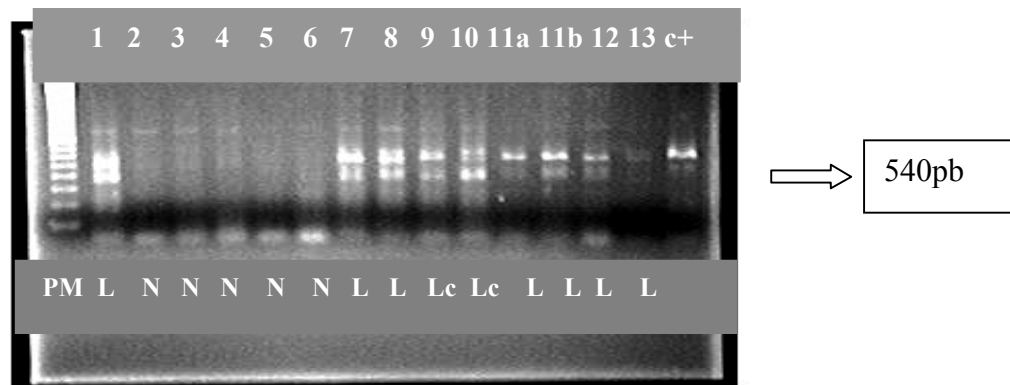


Figura 7. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do PCR da região de DNA ribossômico de populações de flebotomíneos amostrados no município de Antônio João-MS (maio-outubro/2003). PM= peso molecular em pares de bases, 1 a 13 = grupos de insetos, L= gênero *Leishmania*, Lc= *Leishmania chagasi*, N= PCR negativo. O grupo 11 foi fracionado em partes iguais 11a e 11b, devido maior número de flebotomíneos.

A taxa geral de infecção natural por *Le. chagasi* em *Lu. longipalpis* nas localidades do município de Antônio João (2,6%) obtida em PCR mostrou-se bem inferior à encontrada em um foco de LV, em Santarém Pará, onde 7,14 % de 91 fêmeas capturadas no interior e ao

redor da casa de pacientes estavam infectadas por esta leishmânia (Lainson *et al.* 1985). Por outro lado, foi bem mais elevada do que a observada em Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul, importante foco da doença, para *Lu. cruzi*, espécie afim de *L. longipalpis*, em que, de 3575 fêmeas dissecadas 14 (0,39%) apresentavam infecção por *Leishmania*, em uma delas o parasita foi identificado como *L. (L.) chagasi* (Santos *et al.*, 1998) e, neste mesmo Estado, na Serra da Bodoquena, em foco de leishmaniose visceral canina, com prevalência de 23,7% dos animais com anticorpos contra *Leishmania*, de 159 fêmeas dissecadas, nenhuma foi encontrada com infecção por flagelados (Galati *et al.*, 2003).

A estimativa do índice de infecção natural de uma espécie é um importante parâmetro a se considerar na medida da capacidade vetorial de uma espécie e tem sido feita com relativa frequência por meio da dissecação de fêmeas de flebotomíneos (Soares, 2002).

As técnicas de PCR têm sido extensivamente utilizadas para diagnóstico molecular em estudos epidemiológicos devido a sua alta sensibilidade para detectar doenças em seres humanos (Rodgers *et al.*, 1990). O emprego de técnicas moleculares tem possibilitado dados mais precisos, sobre este índice, uma vez que, teoricamente, pode-se detectar a presença de um único parasito de *Leishmania* por flebotomíneos, porém, este número não foi confirmado quando espécimes de campo foram utilizados na extração de DNA (De Bruijn & Barker, 1992 e Aransay *et al.*, 2000).

O conhecimento, ainda insuficiente sobre vários aspectos como a diversidade de agentes reservatórios, vetores e situações epidemiológicas, evidencia a complexidade do controle dessa doença. Tendo-se em vista que o Estado do Mato Grosso do Sul vem enfrentando aumentos sistemáticos no número de casos de LVA, deve-se considerar como prioridade, a aquisição de conhecimento das áreas de risco de transmissão desta doença, através de pesquisas entomológicas para definir as principais espécies vetoras, sua dispersão, graus de antropofilia e infecção natural. Além disso, estudos parasitológicos para definir a espécie do agente etiológico circulante nos focos de LVA e estudos ecológicos para determinação dos reservatórios (animais silvestres) envolvidos, são muito importantes.

CONCLUSÕES

A fauna flebotomínica amostrada em ambiente peri e intradomiciliar das três áreas estudadas esteve representada por sete espécies: *Lu. longipalpis*, *N. whitmani*, *E. cortellezzi*, *E. lenti*, *B. avellari*, *P. shannoni* e *P. campograndensis*, com a primeira delas predominando absolutamente (82,2%) sobre as demais.

No peridomicílio da Aldeia Mangaratú, observou-se que a frequência de flebotomíneos foi inferior em relação à das duas outras áreas, possivelmente explicada pela época em que as amostras foram obtidas, pois se observou a prática comum na cultura indígena de fazer fogueira dentro das residências em períodos frios, o que pode ter funcionado como ação repelente a estes insetos.

Não se observou diferença estatisticamente significativa quanto à abundância dos flebotomíneos em relação à altitude, temperatura, umidade relativa do ar, velocidade dos ventos nem à presença de pessoas e de cães.

A presença de *Lu. longipalpis* no intra e peridomicílio das localidades pesquisadas, associado ao encontro de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* em seu trato digestivo, confirma que esta espécie de flebotomíneo é um potencial vetor da LVA nas áreas da Aldeia Campestre, Aldeia Marangatú e Povoado Campestre e com índice de infecção natural por este parasita de 2,6%, representando portanto, um risco de transmissão relativamente elevado para os habitantes da área.

O método do PCR (amplificação do DNA do parasita) constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da *Leishmania* em vetores das leishmanioses, pois apresenta alta sensibilidade e possibilidade de identificação precisa do parasito nas formas amastigotas, paramastigotas e promastigotas, tornando assim, indispensável no estudo epidemiológico de área endêmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, G.M., Schuback, P.A., Vilela, M.L. & Azevedo, A.C.R., 1985. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. II Distribuição vertical (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. do Ins. Osw. Cruz*, **80**: 187-194.

Aguiar, G.M. de, Medeiros, W.M.de, & De Marco, T. S. 1996. Ecologia dos flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I - A fauna flebotomínica e prevalência pelo local e tipo de captura (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Cad. Saú. Pub.*, **12**: 2, p.195-206.

Alexander, B., Ferro, C., Young, D.G., Morales, A. & Tesh, R.B.1992. Ecology of phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) brasiliensis* in Northern Colombia. *Mem. do Ins. Osw. Cruz*, **87**: 387-395.

Aransay, A.M., Scoulica, E. & Tselentis, Y. 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microb.*, **66**: 1933-1938.

Asimeng, E.J.1991. Preliminary account of the Nigerian savanna phlebotominae (Diptera: Psychodidae), *J. of Med. Ent.*, **28**: 578-580.

Barretto, M.P.1943. **Observações sobre a biologia, em condições naturais, dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera: Psychodidae)**. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Tese Doutorado. 89 p.

Basimike, M., Mutinga, M.J. & Kumar, R.1991. Distribution of Sandflies (Journal of Medical Entomology), in Three Vegetation Habitats in the Marigat Area, Baringo District, Kenya. *Jou. of Med. Ent.*, **28**: 330-333.

Brinson, F.J., Hagar, R., Comer, J. A. & Strohlein, D. S. 1992. Seasonal Abundance of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae), on Ossabaw Island, Georgia. *Jou. of Med. Ent.*, **29**: 178-182.

Casanova, C., Costa, A.I.P. da, Rodas & Lilian A.C.. 1997. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saú. Púb.*, **31**: 6, p.632-633.

Chagas, E. 1936. Primeira verificação em indivíduo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Bras. Med.*, **50**: 221-222.

Chanotis, B.N. & Anderson, J.R. 1968. Age structure, population dynamics and vector potential of phlebotomine in Northern California. Part II. Field Population Dynamics and Natural Flagellate in Panus Females. *Jou. of Med. Ent.*, **5**: 273-292.

Chanotis, B.N., Neely, J.M., Correa, M.A., Tesh, R.B. & Johnson, K.M., 1971. Natural Population dynamics of phlebotomine sandflies in Panama. *Jou. of Med. Ent.*, **8**: 339-342.

- Chapman, R.F. 1985. Structure of the digestive system. In: **Comprehensive insect Physiology, Biochemistry and pharmacology**. Vol. 4 (ed. GA Kerkut & LI Gilbert) pp.165-205. Oxford: Pergamon Press.
- Comer, J.A., Kaavanaugh, D.M., Stallknecht, D.E. & Corn, J.L. 1994. Population Dynamics of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in Relation to the Epizootiology of Vesicular Stomatitis Virus on Ossabaw Island, Georgia. *Jou. of Med. Ent.*, **31**: 850-854.
- Corredor, A.; Gallego, J.; Tesh, R.B.; Morales, A.; Ferro, C.; Young, D.G.; Kreutzer, R.; Boshell, J.; Paláu, M.T.; Caceres, E.; Pelaez, D., 1989. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **40**:480-6,
- Colwell, R. K. 1997. Estimate S: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 5. User's Guide and application published at: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- Costa Lima A. 1932. Sobre os flebótomos americanos (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Osw. Cruz*, **26**:15-69.
- Cunha, A.M. 1938. A aglutinação e o diagnóstico diferencial das leishmanias. *Rev. Bras. de Med.*, **52**: 849-855.
- Cunha, A.M. & Chagas, E. 1937. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*. sp. Nota prévia. *Hospital*. **11**: 3-9.
- Deane, L.M. & Deane, M.P. 1954. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *Hospital*. (R. Janeiro) **47**: 113-129.
- Deane, L.M. 1956. **Leishmaniose visceral no Brasil**. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio Janeiro, 162p.
- Deane, L. M. & Deane, M. P., 1957. Observações sobre abrigos e criadouros de flebótomos no Nordeste do Estado do Ceará. *Rev. Bra. de Mal. e Doen. Trop.*, **9**: 225-246.
- Deane, L. M. & Deane, M. P., 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **4**: 198-212.
- De Bruijn, M.H.L. & Barker, D.C. 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta trop. (Basel)*, **52**: 45-58.
- De Queiroz, R.G., Vasconcelos, A. W., Vasconcelos, I.A.B., Sousa, R.N., Pessoa, F.A.C., Alencar, J.E. & David, J.R. 1991. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae), fauna survey in an american cutaneous leishmaniasis (ACL) focus in Baturité, Ceará state Northeast Brazil. *Parasitologia*, **33**: 159-167.

Dourado, M.I.C., Noronha, C.V., Alcantara, N., Ichihara, M.Y.T., & Loureiro, S. 1989. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do estado da Bahia (Brasil). *Rev. de Saú. Pub.*, São Paulo, **23**: 2-8.

Eiten, G. 1983. **Classificação da vegetação do Brasil**. Brasília, CNPq/Coordenação Editorial.

Forattini, O.P. 1973. **Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmaniose Bartonelose**. v.4; S. Paulo, Ed. Edgard Blücher, EDUSP, 658p.

Forattini, O.P., Rabello, E.X., Serra, O.P., Cotrim, M.D., Galati, E.A. B. & Barata, J.M.S. 1976a. Observações sobre a transmissão da leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. *Rev. de Saú. Pub.*, São Paulo, **10**: 31-43.

Forattini, O.P., Rabello, E.X., & Galati, E.A. B. 1976b. Novos encontros de flebotomíneos no estado de São Paulo, Brasil, com especial referência a *Lutzomyia longipalpis*. *Rev. de Saú. Pub.*, São Paulo, **10**: 125-128.

Galati, E.A.B. 2003 a Morfologia e Taxonomia. Classificação de Phlebotominae. **In**. Rangel E.F. & Lainson R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 23-51 pp.

Galati, E.A.B. 2003 b. Morfologia e Taxonomia. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. **In**. Rangel E.F. & Lainson R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 53-175.

Galati, E. A. B., Nunes, V. L. B., Cristaldo, G., Rocha, H. C. 2003. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. de Pat. Trop.* **32**, (2): 235 - 261.

Galati, E.A.B., Nunes, V.L.B., Rego Jr, F.A., Oshiro, E.T., & Chang, M.R. 1997. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Matogrosso do Sul, Brasil. *Rev. Saú. Pub.*, **31**. **4**: 378-90.

Gomes, A.C., & Galati, E.A. B.. 1989 Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7- Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do Sistema da Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. *Rev. de Saú. Pub.*, São Paulo, **23**: 136-142.

Gomes, A.C., Raballo, E.X., Santos, J.L.F., & Galati, E.A.B.. 1980. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 1-Estudo experimental da freqüência de flebotomíneos em ecótopos artificiais com referência especial a *Ps. Intermedius*. *Rev. de Saú. Pub.*, São Paulo, **14**: 540-556.

Gontijo, C.M.F., Coelho, M.V., Falcão, A.R. & Falcão, A.L. 1987. The finding of one male specimen of *Lutzomyia renei* (Martins, Falção&Silva, 1957) experimentally infected by *Leishmania*. *Mem. do Inst. Osw. Cruz*, **82**: 445.

- Haddow, A. J. 1960. Studies on the biting-habits and medical importance of East African mosquitoes in the genus *Aedes*. I. Subgenera *Aedimorphus*, *Banksinella* and *Nunnius*. *Bull. of Ent. Res.*, **50**: 759-779.
- Herrero, M.V., Urbina, A., Gutierrez, H., Jimenez, A., Perreira, R. & Rivera, C. 1991. Peridomiciliary latrines and Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae) in a focus of leishmaniasis in Costa Rica. *Rev. de Bio. Top.*, **39**: 155-157.
- Herrero, M.V., Jimenez, A., Rojas, J.C. & Dobles, A. 1993. Similarity indices among phlebotomy communities (Diptera: Psychodidae) in an area of endemic skin leishmaniasis in Costa Rica. *Rev. de Bio. Top.*, **41**: 761-767.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2000. <http://map.ibge.gov.br>
- Kamhawi, S., Abdel-Hafez, S.K., & Molyneux, D.H. 1991. Urbanization-how does it affect the behaviour of sand flies? *Parassitologia*, **33**: 299-306.
- Killick-Kendrik, R., 1979. **Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies**. In: Biology of the Kinetoplastida, Vol. 2. WHR Lumsden. DA Evans Eds., p 395-460, academic Press, London, New York & San Francisco.
- Lainson, R. 1985. Our present knowledge of ecology and control of leishmaniasis in Amazon region of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **18**: 47-56.
- Lainson R., Shaw, J.J., Ryan, R, Ribeiro S.M. & Silveira, F.T. 1985. Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**:223-226.
- Lainson, R., Ryan L. & Shaw, J.J. 1987. Infective stages of *Leishmania* in the sand fly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, **82**: 421-424.
- Lanzaro, G., Ostrovska, K., Herrero, M., Lawyer, P., Warburg, A. 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a specie complex: genetic divergence and interespecific hybrid sterility among three populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**: 839-847.
- Lutz, A., Neiva, A. 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* no Brasil. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, **4**: 84-95.
- Marcondes, C.B. 2001. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo, Ed. Atheneu, 432p.
- Mangabeira, O. 1969. Sobre a sistemática e Biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. *Rev. Bras. Mal. D. Trop.*, **21**:3-25.
- Martins, A.V., Brener, Z., Mourão, O.T., Lima, M.M., Souza, M.A., Silva, J.E. 1956. Calazar autóctone em Minas Gerais. *Rev. Brasil. Mal. D. Trop.*, **8**:555-63.

- Mauricio, I.L., Stothard, J.R. & Miles, M.A. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today*, **16**: 188-189.
- Memmott, J. 1991. Sandflies distribution and abundance in a tropical rain forest. *Med. and Vet. Ent.*, **5**: 403-411.
- Mendoza, J.L., Gili, T.A., Negrin, E.M. & Pelegrino, J.I. 1991. Actividade de picada diurna y densidade estacional de *Lutzomyia (C) oreste* (Diptera: Psychodidae). *Rev. Cub. de Méd. Trop.*, **43**: 92-95
- Migone, L.E. 1913. Un caso de Kala-azar a Assuncion (Paraguay). *Bull. Soc. Path. exot.*, **6**: 118-20.
- Miscevic, Z. 1981. Dependence of the flight of sandflies (Diptera: Psychodidae) in artificial light on the temperature and relative humidity. *Acta Vet. (Beograd)*, **31**: 32-39.
- Morrison, A.C., Ferro, C., Pardo, R., Torres, M., Devlin, B., Wilson, M.L. & Tesh, R.B. 1995. Seasonal Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Colombia. *Jou. of Med. Ent.*, **32**: 538-548.
- Nicole, C. 1908. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de *Leishman* observés en Tunisie. *Arch. Inst. Pas. Tunis*, **3**: 1-26.
- Oliveira, A.G.de., Andrade Filho, J., Falcão, A.L. & Brazil, R.P. 2001. A New sand fly, *Lutzomyia campograndensis* sp. n. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Osw. Cruz*, **96(3)**: 325-329.
- Penna, H.A. 1934. Leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Brás. de Méd.*, **48**: 949-950.
- Pianka, E.R. 1982. **Evolutionary Ecology**. New York, Harper & Row, 365p.
- Pifano, F., Ortiz, I. & Alvarez, A. 1960. La ecología, en condiciones naturales y de laboratorio, de algunas especies de flebotomos de la región de Guatopo, Estado Miranda. *Arc. Ven. de Pat.Trop. y Par Med.*, **3**: 63-71
- Pinto, C. 1926. *Phlebotomus neivai* e *Phlebotomus fischeri* n. sp. – Sobre o aparelho espicular dos flebotomos e seu valor específico. *Sci. Méd.*, Rio de Janeiro **4**: 370-375.
- Richards, O.W., Davies, R.G. 1977. **Imm' general textbook of entomology**, vol. I. London: Chapman and Hall Science Paperbacks. 140 p.
- Roberts, D.M. 1994. Arabian sandflies (Diptera: Psychodidae) prefer the hottest nights? *Med. and Vet. Ent.*, **8**: 194-198.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J. & Wirth, D.F., 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasit.*, **71**: 267-275.

Rutledge, L.C. & Ellenwood, D.A. 1975 Production of Phlebotomine Sandflies on the Open Forest Floor in Panama: The Species Complement. *Env. Ent.*, **4**: 71-77.

Santos da Silva, O. & Grünewald, J. 1999. Natural haematophagy oh male *Lutzomyia* sandflies (Diptera: Psychodidae). *Med. and Vet. Ent.*, **13**: 465-466.

Santos-De Marco, T. 1997. **Determinantes ecológicos da flutuação populacional de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área do Parque Nacional do Iguaçu, Estado do Paraná, Brasil.** Dissertação de Mestrado. Univ. Federal de Viçosa, Viçosa MG. 67p.

Santos, S.O., Arias, J., Ribeiro, A.A., Hoffmann, M.P., Freitas, R.A., Malacco, M.A.F. 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. and Vet. Entomol.*, **12**: 315-317.

Schlein, Y., Jacobson, R.L. & Messer, G. 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sand fly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **89**: 9944-9948.

Scorza, J.V. 1972. The phototactic rhythms of some sandflies from Venezuela (Diptera: Phlebotominae). *Rev. do Ins. de Méd. Trop.*, São Paulo, **14**: 147-153.

Scorza, J.V., Ortiz, I. & Mclure. M.T. 1963. Ecología de las formas estacionales de *Phlebotomus townsendi* Ortiz, 1950 y *Phlebotomus cayennensis* Floch y Abonnenc, 1941 (Diptera: Psychodidae) en el centro-norte de Venezuela. *Acta Bio. Ven.*, **3**: 437.

Scorza, J.V., Gomez, I., Mclure. M.T. & Ramirez, M. 1968a. Observaciones biologicas sobre algunos flebotomos de Rancho Grande (Venezuela). 2. Microhabitats *Phlebotomus* spp. (Diptera: Psychodidae). *Acta Bio. Ven.*, **6**: 1-27.

Scorza, J.V., Ortiz, I. & Gomez, I. 1968b. Observaciones biologicas sobre algunos flebotomos de “Rancho Grande” (Venezuela). 8. Sobre la fluctuación estacional de los microhabitats. *Acta. Bio. Ven.*, **6**: 97-104.

Scorza, J.V., Ortiz, I. & Gomez, I. 1968c. Observaciones biologicas sobre algunos flebotomos de “Rancho Grande” (Venezuela). 6. Sobre los factores micro climáticos que determinan la endemicidad de la flebotomofauna de “Rancho Grande”. *Acta Bio. Ven.*, **6**: 76-83.

Sherlock, I. & Guitton, N. 1969. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. III - Alguns dados sobre *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. *Rev. Brás. Mal. D. Trop.*, **21**:541-8,.

Sherlock, I., Miranda, J.C., Sadigursky, M. & Grimaldi, G.Jr. 1984. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem. do Inst. Osw. Cruz*, **79**: 511.

Siegel, S. 1975. **Estatística Não Paramétrica para Ciências do Comportamento**, São Paulo, McGraw Hill, 350 p.

- Soares, R.P.P. 2002. ***Leishmania (Leishmania) chagasi*: Caracterização bioquímica do lipofosfoglicano (LPG) e seu papel na adesão ao intestino médio de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis***. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 69p.
- Sudia, W.D. & Chamberlain, R.W. 1962. Battery-operated light trap, an improved model. *Mosquitos News*, **22**, 126-129.
- Thomas-Soccol, V., Lanotte, V., Rioux, J. A. Pratlong, F., Martini-Dumas, A., Serre, E. 1993. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Ann. Parasitol. Hum. Com.* **68**(2):104-106.
- Uribe, S. 1999. The status of *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implication for Leishmania transmission. *Mem. do Inst. Osw. Cruz*, **94** (6): 724-729.
- Vranjac, A. 1999. **Normas Técnicas de Controle da Leishmaniose Visceral Americana**. Superintendência de Controle de Endemias Instituto Adolfo Lutz e Divisão de Zoonoses da Secretaria de Estado da Saúde Coordenação dos Institutos de Pesquisa Centro de Vigilância Epidemiológica. São Paulo-SP.
- Wolda, H. 1978. Fluctuations in abundance of tropical insects. *The Amer. Nat.*, **112**: 1017-1045.
- Wolda, H. 1989. Seasonal cues in tropical organisms. Rainfall? Not necessarily! *Oecologia*, **80**: 437-442.
- Young, D.G. & Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. of the Amer. Ins. Ent.*, **54**: 1-881.

