UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

EMILI BORTOLON DOS SANTOS

DETERMINAÇÃO DE FONTE ALIMENTAR DE AEDÍNEOS E ANOFELÍNEOS
(DIPTERA: CULICIDAE) NA FLORESTA ESTADUAL DO PALMITO, PARANAGUÁ,
PR

Professor Orientador: Dr. Mario Antônio Navarro da Silva

Professor Co-orientador: Dr. Gerson Azulim Müller

CURITIBA

2013

1 INTRODUÇÃO

Os culicídeos são insetos pertencentes à ordem Diptera e família Culicidae, conhecidos como mosquitos ou pernilongos. Até o momento foram descritas aproximadamente 3.610 espécies, sendo que a região Neotropical detém 31% destas (HARBACH, 2007; RUEDA, 2008; RAFAEL, 2012). No Brasil já foram registradas cerca de 470 espécies e os biomas mais estudados são a Amazônia e a Mata Atlântica (GUEDES, 2012).

Estes insetos sempre foram considerados impertinentes devido ao incômodo causado pelas suas picadas, porém, somente a partir do século XIX tiveram início os estudos da possível relação destes animais com a transmissão de doenças. Em 1879 ocorreu a primeira confirmação do potencial vetor dos mosquitos, sendo que um espécime foi considerado vetor do helminto causador da filariose bancroftiana (FORATTINI, 2002).

Sabe-se que existem diversos agentes etiológicos que são transmitidos por mosquitos através de sua saliva, sendo que as doenças causadas são em sua maioria arboviroses e parasitoses, e, dentre estas, as mais comuns são a dengue, a malária, a febre amarela, encefalites e filariose (JONES et al., 2004; PUSHPANATHAN; JEBANESAN; GOVINDARAJAN, 2006; FANG, 2010).

A maior parte dessas doenças é transmitida por culicídeos das tribos Anophelini (e.g. Malária) e Aedini (e.g. dengue, febre amarela). Essas tribos estão incluídas nas subfamílias Anophelinae e Culicinae, respectivamente. Dentre os vários gêneros de culicídeos dessas tribos, pode-se citar *Anopheles*, *Aedes*, *Haemagogus*, *Psorophora*, entre outros (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Esses culicídeos têm como principais hospedeiros vertebrados como bovinos, equinos, aves, roedores, gambás, humanos, entre outras fontes (FORATTINI et al., 1987; FLORES-MENDONZA et al., 1996; SILVA et al., 2012).

Como o objetivo de controlar as doenças causadas por estes insetos e descobrir mais sobre sua biologia, muitos estudos vêm sendo realizados afim de se obter conhecimento sobre os padrões de alimentação dos culicídeos por meio da identificação dos possíveis hospedeiros. A grande maioria desses trabalhos é realizada através de métodos imunológicos (TEMPELIS, 1975), principalmente com teste de precipitina, que é baseado em imunorreações de precipitação dos antígenos (DEANE; VERNIN; DAMASCENO, 1949). Entretanto, os

métodos imunológicos possuem algumas restrições, como o fato de ter que haver a produção de antisoro de alta qualidade contra todas as espécies incluídas no ensaio, bem como o risco de uma possível reatividade cruzada das proteínas do soro de espécies mais relacionadas (RURANGIRWA et al., 1986).

Devido a essa problemática, outro método para verificação da origem do sangue contido no sistema digestivo dos culicídeos está sendo feito, ele é baseado na utilização de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) para identificação precisa do sangue do hospedeiro. Para esse método, o DNA Mitocondrial vem sendo amplamente utilizado, em especial o pertencente à região do gene que codifica a enzima Citocromo Oxidase I (COI), que é uma proteína que realiza transferência de elétrons durante o processo de fosforilação oxidativa, que é a principal ferramenta para o método de DNA Barcoding (NGO; KRAMER, 2003; ALBERTS et al., 2010).

Portanto, para se obter conhecimentos a respeito do controle de determinados agravos a saúde, é necessária a realização de estudos direcionados à biologia dos culicídeos, como seus hábitos de atividade, possíveis locais de oviposição, e também, estudos relacionados aos seus prováveis hospedeiros. Esses dados fornecem importante subsídio no momento da tomada de decisões a respeito de como melhor controlar as espécies vetoras.

2 JUSTIFICATIVA

Os culicídeos possuem uma secreção salivar muito complexa, composta por anestésicos e anticoagulantes, o que facilita seu repasto sanguíneo, e, durante esse processo, vírus, protozoários e metazoários podem ser transmitidos diretamente do fluido salivar aos capilares do animal hospedeiro (REITER, 2001). Sendo assim, estes insetos podem ser transmissores de diversas doenças para os animais, inclusive o ser humano.

Com base nessa importância epidemiológica que os culicídeos têm, é de extrema relevância se ter conhecimento a respeito de seu ciclo de vida, podendo ser levado em consideração aspectos relacionados à sua preferência por determinados hospedeiros, o que pode ser um indicador de como um ciclo de uma determinada doença está ocorrendo. Assim, conhecer o hábito alimentar de mosquitos torna-se importante, pois a partir disso podem ser desenvolvidas medidas mitigatórias que auxiliarão no controle de algumas doenças.

Para identificação da fonte alimentar dos culicídeos, os testes mais utilizados são baseados em análises imunológicas (TEMPELIS, 1975). No Brasil, os únicos estudos relacionados a esta área foram realizados com o teste de precipitina (DEANE; VERNIN; DAMASCENO, 1949; DEANE, 1951; FORATTINI et al., 1987; FLORES-MENDONZA et al., 1996; GOMES et al., 2001; GOMES et al., 2003; ALENCAR et al., 2005; ZIMMERMAN et al., 2006; ALENCAR et al., 2008; LOROSA et al., 2010; ALENCAR et al., 2012).

Entretanto, o método que utiliza PCR vem se tornando uma ótima alternativa para a rápida e eficiente identificação dos hospedeiros de mosquitos (NGO; KRAMER, 2003). Mais recentemente, o DNA Barcoding está sendo utilizado em estudos relacionados; ele tem por objetivo estabelecer um fragmento de 648 pares de base do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) como um método universal para identificação taxonômica das espécies existentes (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

Alcaide e colaboradores (2009) propuseram um método universal relacionado ao DNA Barcoding para identificação de hospedeiros de vários artrópodes através de seu sangue ingurgitado, com a criação de dois *primers* universais, um para identificação de eucariotos em geral (3' - 5') e outro para identificação de várias classes de vertebrados (5' - 3'). Com essa técnica desenvolvida, eles conseguiram identificar mais de 40 hospedeiros, entre mamíferos, aves e répteis.

Estudos como estes são extremamente relevantes, uma vez que, além de poder se obter o conhecimento a respeito dos hábitos hematofágicos dos culicídeos, pode-se ainda analisar a comunidade de mosquitos presentes em locais que ainda não foram realizados estudos com os mesmos. Outrossim, pode haver uma relação entre os dados bióticos e os dados abióticos, estes últimos poderiam talvez explicar o porquê de uma determinada preferência por hospedeiros por parte dos culicídeos.

A temperatura, por exemplo, é um fator que pode influenciar na abundância dos mosquitos, assim como na disseminação viral e dinâmica em geral das populações de culicídeos (MADDER; SURGEONER; HELSON, 1983; RUIZ et al., 2010). Assim, como há influência dos fatores abióticos na atividade dos culicídeos, poderá haver, em determinadas épocas do ano, atividades diferenciadas de alguns hospedeiros, o que fará com que esses insetos realizem o repasto sanguíneo possivelmente em uma maior variedade de animais.

Já foram feitos alguns estudos com Culicidae na Floresta Estadual do Palmito, entretanto, um estudo relacionado à verificação de fonte alimentar não foi ainda realizado. Um estudo assim torna-se de grande relevância, principalmente devido ao fato de haver a necessidade de se ter conhecimento sobre possíveis espécies que podem estar atuando como vetoras (culicídeos) e reservatórios (vertebrados) de doenças.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a fonte alimentar dos culicídeos das tribos Anophelini e Aedini na Floresta Estadual do Palmito, Paranaguá, Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar quais animais estão atuando como hospedeiros dos culicídeos das tribos Anophelini e Aedini;
- Verificar a influência dos fatores abióticos no comportamento hematofágico dos culicídeos;
- Analisar a possível relação dos culicídeos na veiculação de agentes etiológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

Área provável de estudo: Floresta Estadual do Palmito, localizada no município de Paranaguá, PR.

4.2 PERÍODO DE COLETA

As coletas de mosquitos serão mensais, iniciando em maio de 2014 , estendendo-se até abril de 2015.

4.2 MÉTODOS DE COLETA, ARMAZENAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CULICÍDEOS

Os culicídeos serão coletados com auxílio de aspirador de Nasci, que visa aspirar os insetos que estão repousando em meio à vegetação arbustiva. As coletas com aspirador de Nasci serão realizadas em três pontos específicos da área, a serem determinados com auxílio de GPS, no período matutino das 10h às 11h30min e no período vespertino das 13h às 14h30min e das 16h às 17h30mnin.

Após coletados, os culicídeos serão acondicionados em uma caixa de isopor com gelo para as análises moleculares posteriores, assim, serão então encaminhados para o laboratório de Entomologia Médica e Veterinária do departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Em seguida, os exemplares coletados serão identificados a nível específico em mesa refrigerada, com o auxílio de microscópio estereoscópico e chaves de identificação contidas em Consoli e Oliveira (1994), Forattini (2002) e Lane (1953a, b). Depois de identificados, os exemplares serão preservados a -80°C até a extração de DNA ser realizada.

4.3 MÉTODOS PARA ANÁLISE MOLECULAR

4.3.1 Extração de DNA

O protocolo para extração de DNA será o mesmo utilizado por Alcaide et al. (2009). Os culicídeos já identificados serão colocados em placas de Petri sobre a mesa refrigerada,

onde será retirado seu abdômen com auxílio de uma lâmina fina, e, em seguida este será macerado em um *ependorf* estéril, juntamente com uma solução de lise, constituída por 25mM NaOH e 0,2 mM de EDTA. Após, essa solução será incubada a 95°C por 30 minutos. Após incubação, a solução será armazenada em gelo por cinco minutos e depois será adicionado 50 µl de uma solução neutralizadora, composta por 40 mM de Tris-HCl. A solução formada juntamente com o abdômen macerado de cada mosquito será processada em placas contendo 96 poços (Corning® Thermowell PRC).

Será utilizado um *pool* de mosquitos para cada análise, ou seja, os culicídeos classificados como membros da mesma espécie terão seus abdomens retirados e serão processados juntamente na mesma solução.

4.3.2 Primers

Os primers (iniciadores) a serem utilizados foram desenvolvidos por Alcaide et al. (2009). Após analisarem a sequência do gene mitocondrial codificador da enzima Citocromo C Oxidase I (COI) de vertebrados das classes Mammalia, Reptilia, Amphibia e Aves, bem como a sequência do mesmo gene de mais de seis mil artrópodes, desenharam um primer universal sentido 5'- 3' (M13BC-FW 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT-HAA YCA YAA RGA YAT YGG NAC-3'), bem como um primer reverso, sentido 3'- 5' que permite identificação específica de vertebrados (BCV-RV1 5'-GCY CAN AYY ATN CYY RTR (T)(A) -3').

4.3.3 Amplificação do DNA e Sequenciamento

Para o processo de amplificação do DNA serão utilizados os seguintes ciclos e temperaturas no termociclador de acordo com Alcaide et al. (2009): ciclo inicial de desnaturação a 94°C por quatro minutos, 35 ciclos de 40 segundos a 45°C, um minuto a 72°C e 40 segundos a 94°C, seguida por uma extensão final de 7 minutos a 72°C. O protocolo para quantificação exata de cada substância necessária para a amplificação ainda será formulado.

O sequenciamento será realizado na Universidade de São Paulo, no departamento de Genoma Humano.

4.4 OBTENÇÃO DE DADOS ABIÓTICOS

Serão coletados os dados abióticos para verificar se pode haver alguma relação entre os mesmos e a procura de determinados hospedeiros por parte dos culicídeos. Os dados de todas as coletas serão obtidos diretamente do *website* do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). Serão verificadas as temperaturas mínimas e máximas, umidade, pluviosidade, velocidade do vento (m/s), radiação (kJ/M^2) e pressão atmosférica, todos analisados no dia da coleta, assim como 21 dias e sete dias anteriores às coletas de mosquitos. Os dados serão obtidos da estação da Ilha do Mel (PR), que é a mais próxima da área a ser pesquisada.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para o presente trabalho será feita Análise de Correspondência Canônica (CCA, do inglês, *Canonical Correspondence Analysis*) é um tratamento matemático de ordenação, que permite com que as comunidades de determinadas espécies sejam posicionadas em um gráfico, no qual as mais similares entre si, no que diz respeito à composição de espécies e abundância, aparecem em locais próximos. E pelo contrário, quando as populações diferem com relação a esses caracteres, elas localizam-se em locais distintos no gráfico (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007).

A Análise de Correspondência Canônica também propicia com que sejam analisados os fatores abióticos relacionados à abundância e riqueza de determinadas espécies (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007). Ou seja, de acordo com um determinado padrão de pluviosidade acumulada, umidade e temperatura, por exemplo, essa técnica de ordenamento gerará uma tabela e um gráfico com eixos que expressam a relevância desses fatores na abundância e aparecimento de algumas espécies nas campanhas.

O teste de Monte Carlo, que utiliza um teste randômico, será realizado para verificar a significância dos resultados dados pelos eixos da CCA. Estas análises serão feitas com auxílio do software PC-Ord 5.10.

5 ORÇAMENTO

Produto	Valor
<u>Material de Consumo</u>	
Gasolina	455,00
Insumos e Biologia Molecular	10.000,00
<u>Serviços de Terceiros</u>	
Sequenciamento	5.000,00
TOTAL	15.455,00

6 CRONOGRAMA

Atividade	2014												2015												2016	
	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02		
Créditos em disciplinas	X	X	X	X	X	X	X	X	X																	
Coleta-piloto			X																							
Coletas de culicídeos			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X													
Identificação dos exemplares			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
Análise do sangue				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
Análise dos resultados					X	X	X	X	X	X	X	X														
Redação do artigo												X	X	X	X	X	X									
Submissão do artigo																				X						
Pré-apresentação																					X					
Defesa da dissertação																									X	

Emili Bortolon dos Santos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed. 5. ed. 1396 p. 2010.
- ALCAIDE, M. et al. Disentangling vector-borne transmission networks: An universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. 1-6, 2009.
- ALENCAR, J. et al. Feeding patterns of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae) in different regions of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 6, p. 981-985, 2005.
- ALENCAR, J. et al. Feeding patterns of *Haemagogus capricornii* and *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae) in two Brazilian states (Rio de Janeiro and Goiás). **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 5, p. 873-876, 2008.
- ALENCAR, J. et al. Feeding patterns of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Eastern, Santa Catarina, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 2, p. 952-954, 2012.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. Porto Alegre: Artmed. 4. ed., 752 p. 2007.
- BORGO, M. et al. Espécies arbóreas de um trecho de Floresta Atlântica no município de Antonina, Paraná, Brasil. **Floresta**, v. 41, n. 4, p. 819-932, 2011.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 225 p. 1994.
- DEANE, L. M. Observações sobre alguns hábitos dos adultos de *Culex fatigans*, o principal transmissor da Filariose em Belém, Pará. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 4, n.2, p. 423-461, 1951.
- DEANE, L. M.; VERNIN, C. S.; DAMASCENO, R. G. Avaliação das preferências alimentares das fêmeas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis* em Belém, Pará, por meio de Provas de precipitina. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 2, n. 3, p. 793-808, 1949.
- FANG, J. A world without mosquitoes. **Nature**, v. 466, p. 432-434, 2010.
- FERRETI, R.; BRITEZ, R. M. A restauração da Floresta Atlântica no litoral do estado do Paraná: os trabalhos da SPVS. In: GALVÃO, A. P. M.; PORFÍRIO-DA-SILVA, V. (Eds). **Restauração Florestal: fundamentos e estudos de caso**. Colombo: Embrapa Florestas, pp. 87-102, 2005.
- FLORES-MENDONZA, C. et al. Determinação das fontes alimentares de *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) no estado do Rio de Janeiro, Brazil, pelo teste de precipitina. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n. 2, p. 129-134, 1996.
- FORATTINI, O. P. et al. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 171-187, 1987.

FORATTINI, O. P.; GOMES, A. C.; KAKITANI, I. Observações sobre mosquitos Culicidae adultos em cultivo irrigado de arroz no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 307-312, 1989.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Culicidologia Médica: Identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo: EDUSP, v. 2, 2002, 860 p.

GOMES, L. A. M. et al. Comparison between precipitin and ELISA Tests in the blood meal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and human hosts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 693-695, 2001.

GOMES, A. C. et al. Host-feeding patterns of potential human disease vectors in the Paraíba Valley Region, State of São Paulo, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v. 28, n. 1, p. 74-78, 2003.

GUEDES, M. L. P. Culicidae (Diptera) no Brasil: Relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 283-296, 2012.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 1668, p. 591-638, 2007.

JONES, J.W. et al. Seasonal distribution, biology and human attraction patterns of Culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a forest near Puerto Almendras, Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 349-360, 2004.

LANE, John. **Neotropical Culicidae**. v. I. São Paulo: EdUSP, 1953a.

LANE, John. **Neotropical Culicidae**. v. II. São Paulo: EdUSP, 1953b.

LIEBSCH, D.; GOLDENBERG, R.; MARQUES, M. C. M. Florística e estrutura de comunidades vegetais em uma cronosequência de Floresta Atlântica no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 4, p. 983-992, 2007.

LOROSA, E. S. et al. Blood Meal Identification of Selected Mosquitoes in Rio De Janeiro, Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 26, n. 1, p. 18-23, 2010.

MADDER, D. J.; SURGEONER, G. A.; HELSON, B. V. Number of generations, egg production and developmental time of *Culex pipiens* and *Culex restuans* (Diptera: Culicidae) in southern Ontario. **Journal of Medical Entomology**, v. 20, n. 3, p. 275-287, 1983.

MATTOZO, V. C.; FARIA, L. R. R.; MELO, G. A. R. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) in the coastal forests of southern Brazil: Diversity, efficiency of sampling methods and comparison with other Atlantic Forest surveys. **Papéis avulsos de Zoologia**, v. 51, n. 33, p. 505-515, 2011.

NGO, K. A.; KRAMER, L. D. Identification of mosquito bloodmeals using Polymerase Chain Reaction (PCR) with order-specific primers. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 215-222, 2003.

PUSHPANATHAN, T.; JEBANESAN, A.; GOVINDARAJAN, M. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citrates* Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). **Tropical Biomedicine**, v. 23, n. 2, p. 208-212, 2006.

RAFAEL, J. A. et al. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, 2012. 810 pp.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

REITER, P. Climate Change and Mosquito-Borne Disease. **Environmental Health Perspectives Supplements**, v. 109, 2001.

RUEDA, L. M. Global diversity of mosquitoes in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 477-487, 2008.

RUIZ, M. O. et al. Local impact of temperature and precipitation on West Nile virus infection in *Culex* species mosquitoes in northeast Illinois, USA. **Parasite Vectors**, v. 3, n. 1, 16 p., 2010.

RURANGIRWA, F. R. et al. Production and evaluation of specific antisera against sera of various vertebrate species for identification of bloodmeals of *Glossina morsitans centralis*. **Acta Tropica**, v. 43, n. 4, p. 379-389, 1986.

SOUZA, M. A. M. Composição e estrutura da ictiofauna no ecótono água doce/estuário no rio Faisqueira, Reserva Natural do Rio Cachoeira, Antonina, Paraná. Tese de doutorado. Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, 2007.

TEMPELIS, C. H. Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meal by serology. **Journal of Medical Entomology**, v. 11, n. 6, p. 635-653, 1975.

SILVA, J. S. et al. Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in six Brazilian environmental preservation areas. **Journal of Vector Ecology**, v. 37, n. 2, p. 342-350, 2012.

SPVS – Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental. Plano de Manejo da Reserva Natural do Rio Cachoeira. Encarte III. 227 p. 2005.

SPVS – Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental. Plano de Manejo da Reserva Particular do Patrimônio Natural Morro da Mina e Santa Maria. 2012. Disponível em:<

http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/RPPN/Planos_de_Manejo/RPPN_Morro_da_Mina_e_Santa_Maria/PLANO_MANEJO_RESERVA_NATURAL_MORRO_DA_MINA_E_SANTA_MARIASPVS_iap1.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2013.

ZIMMERMAN, R. H. et al. Bloodmeal Hosts of *Anopheles* Species (Diptera: Culicidae) in a Malaria-Endemic Area of the Brazilian Amazon. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 947-956, 2006.