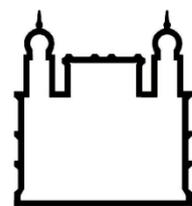




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DIVA DA SILVA TAVARES

**ATRAÇÃO DE VETORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
POR COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRESENTES NA PELE HUMANA**

SALVADOR – BA

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ATRAÇÃO DE VETORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
POR COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRESENTES NA PELE HUMANA**

DIVA DA SILVA TAVARES

Orientadora: Dra. Aldina Maria Prado Barral

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, para obtenção do grau de Doutor.

**SALVADOR – BA
2016**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

T231a Tavares, Diva da Silva
Atração de vetores de leishmaniose tegumentar americana por compostos orgânicos voláteis presentes na pele humana. / Diva da Silva Tavares. - 2016.
109 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Aldina Maria Prado Barral, Laboratório de Imunoparasitologia.

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2016.

1. Compostos orgânicos voláteis. 2. Flebótomos. 3. *Lutzomyia*.
4. *Nyssomyia*. 5. Microextração em fase sólida. 6. Cromatografia gasosa. I. Título.

CDU 595.77

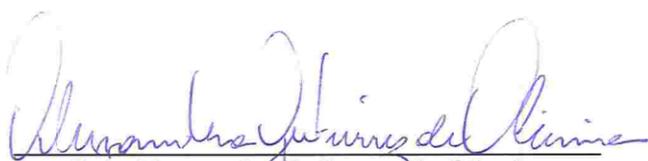
" ATRAÇÃO DE VETORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA POR COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRESENTES NA PELE HUMANA "

DIVA DA SILVA TAVARES

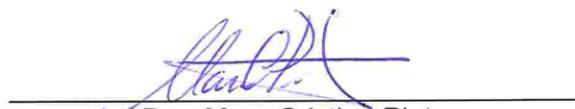
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 09 de dezembro de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA



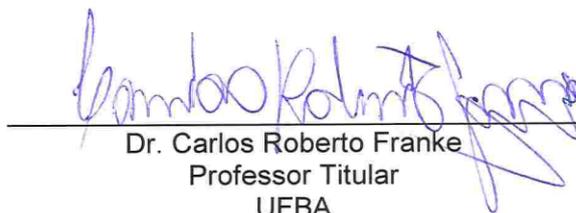
Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira
Professora Associada
UFMS



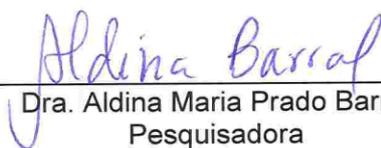
Dra. Mara Cristina Pinto
Professora Assistente
UNESP



Dra. Iara Sordi Joachim Bravo
Professora Associada
UFBA



Dr. Carlos Roberto Franke
Professor Titular
UFBA



Dra. Aldina Maria Prado Barral
Pesquisadora
IGM/Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, alcançado com a aprovação de projeto submetido ao Edital 014/2013 de Apoio Projetos de Pesquisas em Doenças Negligenciadas.

Dedico aos meus pais, com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos ao longo do curso de doutorado.

A FAPESB, pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia - PGPAT - FIOCRUZ-UFBA e toda a equipe que o compõe.

A minha orientadora, Dra. Aldina Barral, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim. Obrigada por ter me aberto tantas portas, por apoiar minhas escolhas e por contribuir com a minha formação científica.

A minha co-orientadora, Vanessa Salgado, pela parceria firmada desde os primeiros passos na realização do projeto de doutorado, pelos ensinamentos científicos e pela amizade e o apoio constante!

Ao pesquisador Artur Lopo, pelas colaborações nas etapas de padronização dos métodos de coleta e extração de odores da pele e na ida a área endêmica.

Ao Dr. Régis Gomes, pelas sugestões na elaboração do projeto.

Ao Dr. Manoel Barral-Neto, pelas sugestões ao longo da execução do projeto.

Ao Dr. José Carlos Miranda, pelos ensinamentos, pela fundamental colaboração nas capturas de flebótomos em campo e pela identificação daqueles utilizados nos testes de atração. Obrigada também à Edna pela colaboração com a etapa de identificação.

À Andrezza Miranda, por todo o suporte administrativo e por sempre esclarecer minhas dúvidas sobre prazos, verbas e outros trâmites burocráticos.

A Juliana Oliveira, por todo suporte que me deu na preparação da documentação para o exame de qualificação e para a defesa da tese.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto Gonçalo Moniz, em especial à Ana Maria Fiscina, pelas correções e pelo suporte dado na formatação da versão final desta Tese.

Ao Dr. Edgar Marcelino Carvalho, pelo grande apoio na logística do trabalho de campo realizado em Corte de Pedra.

Ao Lago e toda à equipe do Posto de Saúde de Corte de Pedra, pela organização da logística do trabalho em campo, a qual foi fundamental para o sucesso das coletas.

Aos voluntários que participaram dessa pesquisa.

A Dra. Tânia Barros, pelos ensinamentos sobre microbiologia, por ter aberto as portas do seu laboratório de trabalho para que eu pudesse fazer parte dos meus experimentos, por ter

me apresentado a sua equipe, repleta de gente boa e alto astral e pelas sugestões apresentadas no meu exame de qualificação.

Ao colega Paulo Mesquita, pela parceria e ensinamentos nas análises de padronização dos métodos de extração de odores da pele humana e na identificação dos compostos orgânicos voláteis das amostras coletadas na área endêmica, bem como nas análises exploratórias dos dados. Obrigada pelo apoio que me deu durante todo esse trajeto!

À Estefane Cruz, pelos ensinamentos sobre as técnicas de MEFS-HS/CG-EM.

Ao colega Jairo Magalhães-Júnior, pelas sugestões para os testes em túnel de vento.

A pesquisadora Camila Indiani e ao colega Augusto Carvalho, pelo banco de dados a partir do qual foram selecionados os participantes dessa pesquisa.

A Juqueline Cristal, pela grande ajuda e ensinamentos na realização dos testes ELISA.

Ao Kiyoshi Fukutani, pela colaboração com os testes estatísticos.

Ao Franklin Souza, pelos ensinamentos sobre a colônia de flebotomos.

As minhas conterrâneas Priscila Guerra e Sayonara Melo, pela amizade, pelas conversas, risadas e por fazerem, de alguma forma, sentir-me mais pertinho de casa.

Aos meus pais, que tanto amo, Edmar e Regina, pela educação que me deram, pelo carinho, amor, incentivo, por me apoiarem sempre e pela confiança depositada em mim desde os meus primeiros passos em minha formação acadêmica. A minha mãe, por nunca me deixar desistir e sempre me ajudar a me erguer, com fé em Deus, determinação e otimismo!

A Débora Castelo Branco, pelo carinho, amizade, companheirismo, incentivo e apoio constante, pelas conversas, risadas, sorrisos, por me ajudar a simplificar as ideias sempre que tentei complicar, pelas sugestões dadas ao trabalho, por acreditar em mim e, enfim, por estar sempre ao meu lado!

Ao meu irmão, Davi, à minha cunhada, Pessíula, e aos meus sobrinhos queridos e muito amados, Arthur e Allan, pelo apoio e por comemorarem comigo cada conquista.

A minha prima/tia Sandra Tavares, que em Salvador foi meu “pedacinho” de casa e minha família. Obrigada pela amizade, pelos cuidados e por sempre abrir as portas de sua casa para mim, por me ensinar a dar os primeiros passos em Salvador, pela companhia e apoio desde o início e por me apresentar a pessoas tão queridas e amigas suas que passaram a ser queridas para mim também.

Aos meus queridos amigos “Cordis”, pela amizade de tantos anos.

Aos meus amores de quatro patas, pelo carinho, companheirismo e pelas alegrias do dia a dia: Bono (*in memoriam*) Yuk e Hanna (meus queridos e adoráveis companheiros em Salvador) e as princesas Joy e Little (que fazem de casa um lugar ainda mais especial).

“Tudo no mundo começou com um sim. Uma molécula disse sim a outra molécula e nasceu a vida...”

Clarice Lispector.

TAVARES, Diva da Silva. Atração de vetores de leishmaniose tegumentar americana por compostos orgânicos voláteis presentes na pele humana. 109 folhas. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

RESUMO

INTRODUÇÃO. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é a forma de leishmaniose com maior incidência em humanos, e no Brasil a maioria dos casos está concentrada nas regiões Norte e Nordeste. O protozoário *Leishmania braziliensis* é considerado o principal agente etiológico com ocorrência no país e tem como principais vetores os flebotomíneos *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*. Sabe-se que, de modo geral, o olfato é o principal sentido de orientação dos insetos e, assim, foi assumido neste trabalho que esses vetores são atraídos por compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nos odores da pele humana. **OBJETIVO.** O objetivo geral do projeto foi identificar os COVs presentes na pele humana e avaliar os seus efeitos na atração de vetores de LTA, com a finalidade de desenvolver e aprimorar alternativas para o controle dos mesmos, de modo que estas possam ser baseadas em COVs que mimetizem os odores da pele humana e, portanto, sejam efetivas na captura de flebotomíneos antropofílicos. **MATERIAL E MÉTODOS.** Para isso, foi identificado o perfil de odores da pele de moradores da localidade de Corte de Pedra, região endêmica para LTA na Bahia, a partir de análises de pelos das pernas desses indivíduos, realizadas com o sistema de Microextração em Fase Sólida, no modo *Headspace*, seguida de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. Foram realizadas análises sorológicas para avaliar a resposta imune humoral, através de testes ELISA, desses indivíduos em relação à saliva de *L.(N) intermedia* e *L. (N.) whitmani*, ambas com ocorrência na região, a fim de verificar a se algumas pessoas podem ser consideradas mais atrativas do que outras. **RESULTADOS.** Foram identificados 42 COVs nos odores dos pelos dessas pessoas, dos quais 52,34% são relatados na literatura como produzidos por bactérias comuns à microbiota da pele humana. A análise de componentes principais (PCA) não evidenciou distinção entre os indivíduos com base em seus perfis sorológicos e os COVs presentes nos odores de suas peles. Análises de correlação evidenciaram que os compostos dodecanol, tetradecanol, tetradecano e isopropil palmitato têm maior correlação positiva com indivíduos de sorologia positiva, ou seja, apresentam-se de forma mais intensa nesses indivíduos do que naqueles de sorologia negativa para as salivas testadas. Doze COVs foram avaliados quanto os efeitos na atração de fêmeas de *Lutzomyia* sp., capturadas na área de estudo, em túnel de vento. Dentre os compostos testados, eicosano e fenilacetaldéido atraíram significativamente mais flebotomos do que o controle negativo (hexano). Os compostos 6-metil-5-hepten-2-ona e nonadecano ativaram, porém não atraíram significativamente mais flebotomos do que o controle negativo, o que não permite concluir se são atrativos ou repelentes para esses insetos. **CONCLUSÕES.** Os resultados obtidos aqui corroboraram com a ideia de que esses vetores são atraídos por COVs presentes nos odores da pele humana e indicam os compostos eicosano e fenilacetaldéido como potenciais candidatos a serem testados em campo, para intensificar a eficiência de armadilhas de captura, tanto para utilização de flebotomos em estudos em laboratório como para o monitoramento desses vetores em áreas endêmicas para LTA.

Palavras-chave: Compostos orgânicos voláteis; Flebotomos; *Lutzomyia*; *Nyssomyia*; Microextração em fase sólida; Cromatografia gasosa.

TAVARES, Diva da Silva Attraction of tegumentary leishmaniasis vectors by volatile organic compounds from human skin. 109 pages. Thesis (PhD in Pathology) – Federal University of Bahia. Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, 2016.

ABSTRACT

INTRODUCTION. American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is the most frequent form of leishmaniasis among humans. In Brazil most of the cases occurs in the North and in the Northeast of the country. *Leishmania braziliensis* is the main etiologic agent and its most common vectors are the phlebotomine sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* and *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*. It is known that the olfact is the best developed sense of orientation among insects and thus it was assumed that these vectors are attracted by volatile organic compounds (VOCs) from human skin odors. **AIM.** The aim of this project was to identify the VOCs from human skin and evaluate their effect on the attraction of ATL vectors, aiming to develop and enhance alternatives of its control, in a way that it can be based on VOCs that mimic human skin odors, which can be effective for anthropophilic phlebotomine capture. **METHODS.** To achieve such objective, odor profile of residing people from Corte de Pedra locality, an endemic area for ATL of Bahia State, was determined by Solid Phase Microextraction, on *headspace* mode, associated to Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Serological analysis were performed through ELISA assays to evaluate the humoral immune response to saliva antigens of *L. (N.) intermedia* and *L. (N.) whitmani*, both present in the study area, aiming to verify if some people may be more attractive than others. **RESULTS.** Forty two compounds were identified in the skin odor profile of the volunteers and 52,34% of them are reported on literature as produced by bacteria from human skin microbiota. Analysis of Principal Components (PCA) didn't distinguished individuals based on their odor profile composition and their serological classification. However, correlation analysis evidenced four compounds that are more related to positive to individuals with positive response to ELISA tests than to negative ones: tetradecanol, dodecanol, tetradecane and isopropyl palmitate. Twelve VOCs were tested in wind tunnel assays. Eicosane and phenylacetaldehyde attracted significantly more females of phlebotomine sand flies than the negative control (hexane). The compounds 6-methyl-5-hepten-2-one and nonadecane activated, but did not attracted, more females of phlebotomine sand flies than the negative control, but it is not possible to conclude if this ketone is a potential attractant or a repellent to these insects. **CONCLUSIONS.** The results obtained corroborates with the idea that these vectors are attracted to volatiles compounds presents in the human skin odours and are potential candidates to be tested in the field as a tool to enhance the efficiency of capture of usual traps, even for laboratory studies finality as for phlebotomine sand flies monitoring in endemic areas for LTA.

Key-words: Volatile organic compounds; *Lutzomyia*; *Nyssomyia*); Solid phase microextraction; Gas chromatography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fêmea de flebotomíneo (Diptera: Psychodidae). Fonte: KILLICK-KENDRICK, 1999. 19
- Figura 2 - Ciclo geral de vida e de transmissão de parasitas *Leishmania*. (A) Ciclo de transmissão antroponótico, no qual a fêmea de flebotomíneo pica o hospedeiro humano e transmite formas promastigotas metacíclicas dos parasitas (1), as quais infectam, principalmente, macrófagos (2), onde se transformam na forma amastigota e infectam outros macrófagos (4), os quais poderão ser ingeridos no repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos e, assim, recomeçar o ciclo de transmissão. (B) Ciclo de transmissão zoonótico, similar ao ciclo antroponótico. Fonte: KUMAR e ENGWERDA (2014), com adaptações. 23
- Figura 3 – Posto de Saúde de Corte de Pedra. À esquerda, placa de sinalização localizada à margem da BR-101, com indicação da entrada para o Posto de Saúde de Corte de Pedra (à direita da foto). 38
- Figura 4 – Mapa do estado do Brasil com detalhe para o estado da Bahia (A) e mapa da Bahia com detalhe para o município de Presidente Tancredo Neves (B). Mapa com a distribuição dos locais visitados (códigos de cada família – F – visitada com o respectivo número de indivíduos participantes entre parênteses) durante as coletas em Corte de Pedra – BA (C). Imagem: Google Earth. 40
- Figura 5 - (A) Microextração em fase sólida - MEFS. Injetor manual (a) com a fibra para extração exposta no *headspace* (b) no interior do *vial*, através da perfuração do septo de silicone da tampa de alumínio pelo suporte da fibra (c). Bloco de alumínio, sobre placa aquecedora, adaptado para o encaixe do *vial* de 20 ml (d). (B) Sistema do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-MS), conectados a um computador com o software. 43
- Figura 6 - Captura da tela de busca, com as diversas opções de critérios para a pesquisa, da base de dados de compostos orgânicos voláteis microbianos – mVOC. 51
- Figura 7 - Gaiola de insetário, confeccionada com arame e tecido *voil*, utilizada para o acondicionamento dos flebótomos até o momento da realização dos testes (Foto: Nolga Eliã). 52
- Figura 8 - (A) Tubos de vidro com tampa, contendo álcool 70% e algodão para preservação dos flebótomos utilizados nos experimentos em túnel de vento; (B) Detalhe da base do tubo contendo três fêmeas de *Lutzomyia* sp. 53
- Figura 9- Túnel de vento utilizado nos teste de atração em laboratório. (a) Plataforma com câmera de liberação encaixada; (b) plataforma com suporte para o papel filtro; (c) termo higrometro com sensor exposto no interior do túnel. Fonte: a autora. 55

Figura 10 - Condição de iluminação durante os testes no túnel de vento. Apenas a luz vermelha do túnel ligada. A seta preta indica a direção do fluxo de ar. Fonte: a autora.	56
Figura 11 - Imagens características da área de estudo. (A) Estrada de terra, característica frequente dos caminhos percorridos durante as coletas em campo; (B) Uma das residências visitadas, localizada na zona rural da área de estudo. Fonte: Diva Tavares.....	58
Figura 12 - Cromatograma com indicação dos picos, em seus respectivos tempos de retenção, correspondentes aos cinco compostos definidos como marcadores de qualidade: 6-metil-5-hepten-2-ona, nonanal, decanal e geranylacetona.	59
Figura 13 - Área total média (A) e número de picos totais (B) obtidos nos testes de realizados com cada fibra.....	60
Figura 14 - Variação da intensidade dos picos obtidos nas análises de CG-MS em relação a diferentes temperaturas a partir de amostras de voláteis extraídos de pelos humanos com a técnica de MEFS-HS.	61
Figura 15 - Variação da intensidade dos picos obtidos nas análises de CG-MS em relação a diferentes tempos de extração a partir de amostras de voláteis extraídos de pelos humanos com a técnica de MEFS-HS.	62
Figura 16 - Intensidade total relativa dos compostos orgânicos voláteis - COVs detectados entre indivíduos com sorologia negativa (soronegativos) e indivíduos com sorologia positiva (soropositivos) para saliva de <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> e <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i>	63
Figura 17 - Percentual médio do número de compostos pertencentes a cada uma das funções orgânicas encontradas entre os COVs dos indivíduos avaliados.....	65
Figura 18 - Percentual médio da intensidade total das funções orgânicas encontradas entre os COVs dos indivíduos avaliados.....	65
Figura 19 - Percentual da intensidade total de compostos orgânicos voláteis pertencentes às suas respectivas funções químicas.....	66
Figura 20 - Análises de componentes principais (PCA) com base no total de indivíduos e nos COVs identificados. Em vermelho estão representados os indivíduos positivos para saliva de <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> e <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i> e em verde os indivíduos negativos.	67
Figura 21 - Percentuais relativos dos compostos orgânicos voláteis - COVs identificados nos odores da pele dos participantes do estudo com as análises de SPME-HS/CG-EM realizadas com amostras de pelos. N = indivíduo com sorologia negativa para saliva de <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> e <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i> ,	

P = indivíduos com sorologia positiva para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*.....68

Figura 22 - Correlação entre os compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nos odores da pele dos indivíduos com sorologia negativa para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*. Representação gráfica por corrplot das correlações de Spearman observadas entre os COVs identificados nos indivíduos negativos para o teste sorológico anti-saliva de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*. O aumento da intensidade da cor azul indica aumento da correlação positiva, enquanto o aumento da intensidade da cor vermelha indica o aumento da correlação negativa. Os quadrados delimitados indicam grupos formados por COVs correlacionados.....69

Figura 23 – Correlação entre os compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nos odores da pele dos indivíduos com sorologia positiva para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*. Representação gráfica por corrplot das correlações de Spearman observadas entre os COVs identificados nos indivíduos positivos para o teste sorológico anti-saliva de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*. O aumento da intensidade da cor azul indica aumento da correlação positiva, enquanto o aumento da intensidade da cor vermelha indica o aumento da correlação negativa. Os quadrados delimitados indicam grupos formados por COVs correlacionados.....70

Figura 24 – Frequência relativa (%) da resposta de ativação das fêmeas de *Lutzomyia* sp. diante dos compostos orgânicos voláteis testados nos teste de atração em túnel de vento. * p< 0.05; ** p<0.01; † P = 0.0523.75

Figura 25 – Frequência relativa (%) da resposta de atração das fêmeas de *Lutzomyia* sp. diante dos compostos orgânicos voláteis testados nos teste de atração em túnel de vento. * p< 0.05.75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais tipos de fibras comercialmente disponíveis e suas respectivas características.....	32
Tabela 2 - Lista de padrões analíticos injetados diretamente no sistema CG-EM para identificação dos analitos encontrados nas amostras testadas	48
Tabela 3 – Lista dos compostos orgânicos voláteis (COVs) que foram testados no túnel de vento. *Foram incluídos nas concentrações de 10 e de 100%. Em itálico, os COVs utilizados como controle.....	56
Tabela 4 - Compostos orgânicos voláteis identificados, em ordem crescente de tempo de retenção (TR), e seus respectivos índices de Kovats (IK). CPAS = confirmação com padrão analítico sintético.	64
Tabela 5 – Grupos obtidos dos compostos orgânicos voláteis correlacionados a partir das análises de corplot.	71
Tabela 6 - Lista dos 42 COVs identificados nos odores da pele dos voluntários e os gêneros/espécies bacterianas descritas na literatura como existentes na pele humana e produtoras dos respectivos compostos. NR = bactérias não relatadas como presentes na pele humana	73

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nos odores da pele humana. COVs presentes na pele humana relatados na literatura obtidos com diferentes métodos de coleta e de extração.....81
- Quadro 1 (continuação) - Compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nos odores da pele humana. COVs presentes na pele humana relatados na literatura obtidos com diferentes métodos de coleta e de extração.....82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	LEISHMANIOSES – VISÃO GERAL.....	18
1.2	BIOLOGIA GERAL DE FLEBOTOMÍNEOS.....	19
1.3	INTERAÇÕES ENTRE VETOR E HOSPEDEIRO NO CICLO DA LTA	21
1.4	ECOLOGIA QUÍMICA DE INSETOS VETORES E A BUSCA POR HOSPEDEIROS HUMANOS – O QUE SE SABE SOBRE FLEBOTOMÍNEOS?.....	23
1.5	MÉTODOS DE CONTROLE DE FLEBOTOMÍNEOS.....	27
1.6	MEFS-HS/CG-MS COMO ESTRATÉGIA PARA O ESTUDO DE ODORES	30
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	34
2.1	JUSTIFICATIVA.....	34
2.2	HIPÓTESE.....	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	ÁREA DE ESTUDO, POPULAÇÃO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS.....	38
4.1.1	Área de estudo	38
4.1.2	População de estudo	39
4.1.3	Aspectos éticos	41
4.2	CLASSIFICAÇÃO DOS PARTICIPANTES QUANTO À RESPOSTA IMUNE HUMORAL PARA SALIVA DE <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> E <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i>	41
4.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE COLETA, EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) PRESENTES EM ODORES DA PELE HUMANA.....	41
4.3.1	Teste piloto	42
4.3.2	Padronização do método de MEFS-HS/CG-EM com pelos humanos	44
4.3.2.1	Fibra de extração	44
4.3.2.2	Temperatura de extração	45
4.3.2.3	Tempo de extração	45
4.3.2.4	Massa de pelos por amostra	45
4.4	COLETA E ANÁLISE DOS COVs QUE COMPÕE OS ODORES DA PELE DE MORADORES DE CORTE DE PEDRA – BAHIA	46
4.4.1	Coleta e extração de COVs	46
4.4.2	Identificação dos COVs obtidos	47
4.4.2.1	Consulta a biblioteca NIST 08	47
4.4.2.2	Cálculo dos Índices de Kovats (KI).....	47
4.4.2.3	Injeção de padrões analíticos no sistema CG-EM.....	48

4.5	AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O PERFIL DE COVs DOS VOLUNTÁRIOS E A CLASSIFICAÇÃO DOS MESMOS QUANTO À SOROLOGIA PARA SALIVA DE <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> E <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i>	49
4.6	LEVANTAMENTO DA LITERATURA SOBRE OS COVs IDENTIFICADOS E AS BACTÉRIAS EXISTENTES NA MICROBIOTA NORMAL DA PELE QUE SÃO CAPAZES DE PRODUZÍ-LOS	50
4.7	AVALIAÇÃO, EM LABORATÓRIO, DA ATRAÇÃO DE <i>Lutzomyia</i> sp. PROVENIENTES DO CAMPO POR COVs PRESENTES NOS ODORES DA PELE DE MORADORES DA ÁREA DE ESTUDO	51
4.6.1	Obtensão e identificação dos flebótomos utilizados nos testes de atração	51
4.6.2	Túnel de vento – protocolo de experimentação	54
4.7.2	COVs utilizados nos testes de atração	56
4.6.4	Análises estatísticas	57
4.8	ANÁLISES DOS DADOS	57
5	RESULTADOS	58
5.1	ÁREA DE ESTUDO – ACESSO ÀS RESIDÊNCIAS DOS VOLUNTÁRIOS	58
5.2	CLASSIFICAÇÃO DOS PARTICIPANTES QUANTO À RESPOSTA IMUNE HUMORAL PARA SALIVA DE <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> E <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i>	58
5.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE COLETA, EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) PRESENTES EM ODORES DA PELE HUMANA	59
5.3.1	Teste Piloto	59
5.3.2	Padronização do método de MEFS-HS/CG-EM com pelos humanos	60
5.3.2.1	Escolha da fibra de extração	60
5.3.2.2	Escolha da temperatura de extração	60
5.3.3.3	Escolha do tempo de extração	61
5.3.3.4	Escolha da quantidade (mg) de pelos por amostras	62
5.3.3	Coleta e análise dos COVs que compõe os odores da pele de moradores de Corte de Pedra – Bahia	62
5.4	EXISTÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O PERFIL DE COVs DOS VOLUNTÁRIOS E A CLASSIFICAÇÃO DOS MESMOS QUANTO À SOROLOGIA PARA SALIVA DE <i>Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia</i> E <i>Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani</i>	66
5.5	BACTÉRIAS COMUNS À PELE HUMANA QUE PRODUZEM OS COVs IDENTIFICADOS NOS ODORES DA PELE DOS VOLUNTÁRIOS	72
5.6	AVALIAÇÃO, EM LABORATÓRIO, DA ATRAÇÃO DE <i>Lutzomyia</i> sp. POR COVs PRESENTES NOS ODORES DA PELE DE MORADORES DA ÁREA DE ESTUDO	74
5.6.1	Teste de atração em túnel de vento	74
5.6.2	Identificação dos flebótomos utilizados nos testes de atração em túnel de vento	76
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES – VISÃO GERAL

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2004), as leishmanioses consistem em um conjunto de doenças que são causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e estão entre as principais patologias cujos agentes etiológicos são transmitidos por vetores. As leishmanioses são consideradas um problema de saúde pública (OMS, 2004; BRASIL, 2006), de ampla distribuição mundial, com grande incidência em 98 países distribuídos entre os continentes Americanos, Europeu, Africano e Asiático, nos quais se estima que 350 milhões de pessoas possam estar expostas ao risco de infecção (OMS, 2010).

Essas doenças podem ser classificadas em duas formas principais: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar americana (LTA). A LV, também conhecida como calazar, é caracterizada, principalmente, por hepato-esplenomegalia, anemia e perda considerável de peso, sendo, portanto, potencialmente fatal (BRASIL, 2013). As formas tegumentares (LTA) podem ainda ser classificadas como leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (OMS, 2016). No Brasil foi registrada, entre os anos de 2005 e 2014, uma média anual de 3.540 casos de LV, sendo 49,8% desses na região nordeste. Para o mesmo período foi registrada média anual de 21.775 casos de LTA e predominância de registros totais na região norte (41,82% do total de casos), seguida pela região nordeste, totalizando juntas mais de 70% dos casos da doença no Brasil (BRASIL, 2016).

O agente etiológico de LTA com ocorrência no Brasil e que tem maior prevalência no homem é o *Leishmania braziliensis*, o qual tem ocorrência registrada desde a Amazônia até o sul do país e cuja ocorrência está, geralmente, associada à presença de animais domésticos (GONTIJO e CARVALHO, 2003; COSTA, 2005). Os principais vetores de *L. braziliensis* são, entre outros, os flebotomíneos *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (GONTIJO e CARVALHO, 2003; BRASIL, 2013), dos quais *L. (N.) whitmani* é considerado o de maior importância epidemiológica, em razão de sua reconhecida capacidade de adaptação a mudanças ambientais, de sua ampla distribuição no território brasileiro e de sua presença ter sido notificada na maioria das áreas endêmicas de LTA no país (COSTA *et al.*, 2007). Entretanto, *L. (N.) intermedia* parece adentrar mais em domicílios do que *L. (N.) whitmani* (GOMES,

SANTOS e GALATI, 1986; AZEVEDO *et al.*, 1996; CAMPBELL-LENDRUM, PINTO e DAVIES, 1999), o que aumenta as chances de contato entre esses insetos e as pessoas e, por consequência, aumenta os riscos de transmissão do parasita.

As leishmanioses estão entre as principais doenças transmitidas por vetores e foram incluídas, com todas as suas formas, no programa de controle prioritário da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010). Assim, o presente estudo foi voltado para vetores de agentes causadores de LTA, com foco nos flebótomos *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*, que são considerados os mais importantes na transmissão de LTA no país.

1.2 BIOLOGIA GERAL DE FLEBOTOMÍNEOS

De acordo com Killick-Kendrick (1999), os flebótomos (FIGURA 1) são insetos pequenos, geralmente de tamanho inferior a 3 mm, com coloração que pode variar desde quase branco até quase preto e apresentam três características básicas que permitem reconhecê-los com facilidade: (1) quando em repouso, mantêm as asas em um ângulo superior à altura do abdome; (2) possuem corpo piloso e (3) antes de pousar no hospedeiro para realizar o repasto sanguíneo, fazem um movimento saltitante em “zig zag”. Além disso, esses insetos, ao contrário dos mosquitos, atacam em silêncio.

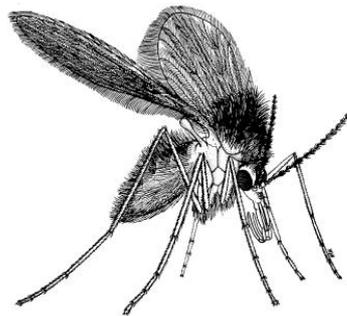


Figura 1 - Fêmea de flebotomíneo (Diptera: Psychodidae). Fonte: KILLICK-KENDRICK, 1999.

De modo geral, flebotomíneos apresentam hábitos crepusculares e noturnos, de modo que durante o dia se mantêm em repouso em abrigos relativamente frescos e úmidos, tais como casas, celeiros, estábulos, cavernas, fissuras em paredes, em rochas ou no solo, em vegetação densa, buracos em árvores, bem como em troncos de árvores, tocas de roedores e de outros mamíferos, ninhos de passarinhos, galinheiros, fissuras em caixas d'água, dentre outros (KILLICK-KENDRICK, 1999; SANGIORGI, *et al.*, 2012). Tanto machos quanto as

fêmeas de flebotomíneos se alimentam da seiva de plantas e da secreção de afídeos (KILLICK-KENDRICK e KILLICK-KENDRICK, 1987; CAMERON, 1995; KILLICK-KENDRICK, 1999), porém, as fêmeas se alimentam também de sangue de humanos e de outros mamíferos para obter as proteínas necessárias para promover o desenvolvimento dos ovos durante o seu período de reprodução (SHARM e SINGH, 2008; OMS, 2012). Após esse desenvolvimento, ocorre então a postura dos ovos, geralmente, em substrato úmido, e a maturação dos mesmos, seguida da eclosão das larvas, que se alimentam de matéria orgânica para suprir seu metabolismo e se transformar em pupas, que se fixam no solo e não se alimentam até iniciar a metamorfose que dará origem ao inseto adulto (FIOCRUZ, 2012).

Dentre os principais grupos de mamíferos utilizados como fonte alimentar sanguínea e para as quais existem registros de infecção por *Leishmania* no hemisfério ocidental, destacam-se os seguintes: marsupiais (ex.: gambá, também conhecido como sariguê), xenarthra (ex.: tamanduá), primatas (ex.: macacos, humanos), carnívoros (ex.: cães), perissodáctilos (ex.: cavalo, burro) e rodentia (ex.: roedores) (ASHFORD, 1996). No Brasil, parasitas *L. braziliensis* já foram encontrados em roedores silvestres (*Bolomys lasiurus* e *Nectomys squamipes*) e urbanos (*Rattus rattus*) em Pernambuco, em felídeos (*Felis catus*), no Rio de Janeiro, em canídeos (*Canis familiaris*) no Ceará, Bahia e Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, e equídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*), no Ceará, Bahia e Rio de Janeiro (BRASIL, 2013).

A manutenção do ciclo de transmissão das leishmanioses depende da interação entre vetores e hospedeiros, a qual também é primordial para a manutenção do ciclo de vida do próprio vetor, já que o desenvolvimento dos ovos depende das proteínas obtidas a partir da alimentação sanguínea. Dessa forma, o ciclo de vida de protozoários *Leishmania* é claramente beneficiado pelas relações ecológicas inerentes entre seus vetores e hospedeiros e, por tal razão, é importante compreender os aspectos envolvidos nessas interações para então formular estratégias de intervenção que possibilitem o controle desses vetores e, por consequência, o controle da transmissão dessas doenças.

Como ponto de partida é importante considerar que os insetos têm o olfato como o sentido melhor desenvolvido, e através da comunicação química são capazes de reconhecer seus parentes e predadores, recrutam indivíduos do mesmo grupo, além de alertá-los quanto à presença de predadores e situações de perigo, reconhecem parceiros (as) sexuais e detectam fontes alimentares, de modo que a química dos odores, os quais são tipicamente constituídos por compostos orgânicos voláteis (COVs) (VANCE, 2008), é fundamental para o senso de orientação desses animais (REINHARD, 2004). Alguns estudos já demonstraram a

importância de COVs na orientação de flebótomos na busca de substratos para oviposição, na procura de parceiros sexuais e na busca de fonte alimentar (DOUGHERTY, WARD e HAMILTON, 1992; DOUGHERTY, GUERIN e WARD, 1993; HAMILTON, DAWSON e PICKETT, 1996; DOUGHERTY e HAMILTON, 1997; BRAZIL e HAMILTON, 2002; HAMILTON, 2008; BRAY, WARD e HAMILTON, 2010).

O sucesso da eclosão dos ovos, bem como do desenvolvimento larval do qual depende a formação do flebótomo adulto, não se dá ao acaso. As glândulas acessórias de fêmeas de *L. longipalpis*, por exemplo, parecem exercer importante função nesse processo de orientação na busca do substrato adequado, de modo que COVs, como o ácido dodecanóico, foram extraídos e detectados tanto nessas glândulas quanto em ovos desses dípteros, e considerados atrativos, bem como marcadores para orientação de outras fêmeas (DOUGHERTY, WARD e HAMILTON, 1992; DOUGHERTY e HAMILTON, 1997). Verificou-se também que extratos de feno, de ração e de fezes de coelho são atrativos para fêmeas grávidas de *L. longipalpis* e podem atuar como estimulantes para oviposição, assim como os compostos voláteis hexanal e 2-metil-2-butanol, detectados em fezes de coelhos e de galinhas (DOUGHERTY, WARD e HAMILTON, 1993; DOUGHERTY, GUERIN e WARD, 1993).

Outros trabalhos demonstraram que o sucesso na obtenção de fonte alimentar sanguínea, fundamental para a maturação dos ovos das fêmeas de flebotomíneos, assim como de outros insetos hematófagos, também não se deve ao acaso, mas sim a determinadas pistas químicas emitidas pelo hospedeiro, as quais atuam como cairômonios (HAMILTON e RAMSOONDAR, 1994; BERNIER *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2001; SMALLEGANGE *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2008; BRAY, WARD e HAMILTON, 2010), como será discutido adiante, na seção 1.4.

1.3 INTERAÇÕES ENTRE VETOR E HOSPEDEIRO NO CICLO DA LTA

O ciclo de desenvolvimento dos parasitas do gênero *Leishmania* tem início quando fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) alimentam-se de sangue humano ou de outros mamíferos para obter as proteínas necessárias para o desenvolvimento dos ovos durante seu período de reprodução (SHARMA e SINGH, 2008; OMS, 2012). Nesse processo, esses insetos podem ingerir macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania*, as quais são arredondas e desprovidas de motilidade, com tamanho relativamente pequeno (3-5µm) e representam a forma não infectante desses protozoários (DOSTÁLAVA e

VOLF, 2012). Ao adentrar o intestino do flebótomo, esses parasitas, de modo geral, migram para porção posterior e se deparam com condições bem diferentes das quais estavam submetidos, como, por exemplo, redução da temperatura e aumento do pH, o que irá desencadear uma série de alterações morfológicas correspondentes a diferentes estágios de desenvolvimento desses parasitos ao longo da migração dos mesmos desde a porção posterior do intestino médio até a sua porção mais anterior (KAMHAWI, 2006; DOSTÁLAVA e VOLF, 2012).

De acordo com Kamhawi (2006), os principais estágios de desenvolvimento de *Leishmania* são: (1) as formas amastigotas se transformam, inicialmente, em formas promastigotas procíclicas, que são pequenas, dotadas de um curto flagelo, com pouca motilidade e iniciam a multiplicação celular dentro do flebótomo. Essas formas estão presentes no repasto sanguíneo recém-ingerido e estão separadas do intestino médio por uma matriz peritrófica do tipo I; (2) formas procíclicas se desenvolvem em formas maiores, delgadas, denominadas de promastigotas nectomonas, capazes de atravessar a matriz peritrófica e aderir ao revestimento epitelial do intestino do flebótomo; (3) promastigotas nectomonas se desenvolvem para as formas promastigotas leptomonas, as quais irão sofrer o segundo ciclo de replicação no intestino do flebótomo; (4) por fim, após migrar da porção mais posterior da porção abdominal do intestino até a válvula estomodeal, duas formas parasitárias podem ser observadas nessa porção mais anterior do tubo digestivo do flebótomo: promastigotas haptomonas e promastigotas metacíclicas. As promastigotas haptomonas têm formato de folha, flagelo curto, sem motilidade e atuam como conectores na válvula estomodeal; (5) as promastigotas metacíclicas correspondem às formas infectivas livre nadantes, de corpo celular pequeno, flagelo alongado de grande motilidade e altamente adaptadas para serem transferidas, por meio da picada da fêmea de flebotomíneo, aos mamíferos hospedeiros.

Como mencionado acima, fêmeas de flebotomíneos são capazes de transmitir, por meio da picada, formas promastigotas metacíclicas dos protozoários *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado, as quais serão fagocitadas por células de defesa do hospedeiro, principalmente macrófagos, e no interior dos fagolisossomos irão se transformar em formas amastigotas. Estas formas, por sua vez, irão se multiplicar e infectar novos macrófagos, localmente ou se disseminando para tecidos mais distantes (REITHINGER *et al.*, 2007). Fêmeas de flebotomíneos não infectadas podem se infectar ao realizar repasto sanguíneo em um vertebrado infectado e, assim, manter o ciclo de transmissão da doença (FIGURA 2). Portanto, quando infectadas com protozoários *Leishmania*, fêmeas de flebótomos atuam como

vetores de agentes de leishmanioses e promovem a transmissão dessas doenças entre diferentes vertebrados que coabitam uma determinada região (OMS, 2004; BRASIL, 2013).

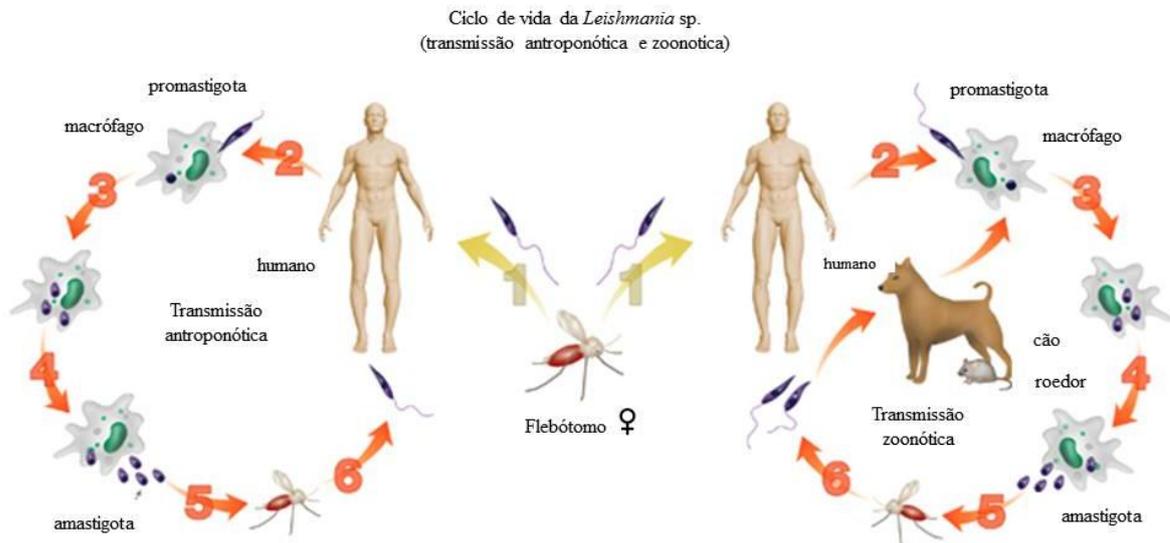


Figura 2 - Ciclo geral de vida e de transmissão de parasitas *Leishmania*. (A) Ciclo de transmissão antroponótico, no qual a fêmea de flebotomíneo pica o hospedeiro humano e transmite formas promastigotas metacíclicas dos parasitas (1), as quais infectam, principalmente, macrófagos (2), onde se transformam na forma amastigota e infectam outros macrófagos (4), os quais poderão ser ingeridos no repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos e, assim, recomear o ciclo de transmissão. (B) Ciclo de transmissão zoonótico, similar ao ciclo antroponótico. Fonte: KUMAR e ENGWERDA (2014), com adaptações.

Dessa forma, a interface entre vetor e hospedeiro no ciclo da LTA, está relacionada com o fato de essa doença ser causada por um parasita intracelular obrigatório de ciclo digenético, o qual requer que parte do seu desenvolvimento ocorra no intestino do inseto vetor e outra parte no interior de células fagocitárias do sistema de defesa dos hospedeiros, que podem ser, dentre outros vertebrados, humanos e animais domésticos (ex.: cão) ou silvestres (ex.: roedor). Essas relações levam a crer que, além da presença do vetor, a presença de outros hospedeiros pode aumentar as chances de humanos serem infectados.

1.4 ECOLOGIA QUÍMICA DE INSETOS VETORES E A BUSCA POR HOSPEDEIROS HUMANOS – O QUE SE SABE SOBRE FLEBOTOMÍNEOS?

O gás carbônico, presente no ar exalado de vertebrados, é considerado uma pista química comum, de amplo espectro na atração de insetos hematófagos, que pode ser percebida a distâncias relativamente longas e indicar a presença de uma possível fonte alimentar sanguínea (GILLIES, 1980; NICOLAS e SILLAN, 1989; GUERENSTEIN e

HILDEBRAND, 2008). No entanto, outras pistas químicas, sobretudo a distâncias relativamente curtas, estão envolvidas no refinamento da escolha do vertebrado e atuam de modo específico nas diferentes espécies de insetos hematófagos (DE JONG e KNOLS, 1995).

Diversos trabalhos investigaram o que atrai alguns importantes vetores de doenças, como *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* (e.g. GEIER *et al.*, 2002; BERNIER *et al.*, 2002; LOGAN *et al.*, 2008; VERHULST *et al.*, 2010a; SMALLEGANGE, VERHULST e TAKKEN, 2011; BERNIER *et al.*, 2015). Tais investigações evidenciaram que os odores emanados pela pele humana, produzidos principalmente por bactérias existentes na microbiota da pele, podem orientar e atrair, ou mesmo repelir, esses insetos e, assim, aumentar ou reduzir as possibilidades de infecção através da picada dos mesmos (GEIER *et al.*, 2002; VERHULST *et al.*, 2010a; SMALLEGANGE, VERHULST e TAKKEN, 2011; ZHANG *et al.*, 2015). *A. gambiae*, importante vetor do protozoário *Plasmodium* spp., e *A. aegypti*, vetor do vírus da dengue, da febre amarela e, atualmente, bastante conhecido por estar também envolvido na transmissão de Zika vírus (MUSSO, NILLES e CAO-LORMEAU, 2014; AYRES, 2016), por exemplo, são considerados insetos antropofílicos e demonstram ser fortemente atraídos pelo odor da combinação de compostos voláteis, produzidos por bactérias da microbiota da pele (SMALLEGANGE *et al.*, 2005; SMALLEGANGE *et al.*, 2009; SMALLEGANGE, VERHULST e TAKKEN, 2011).

Smallegange e colaboradores (2005), por exemplo, avaliaram o comportamento de *A. gambiae* quando expostos a uma mistura de doze ácidos carboxílicos e verificaram que estes insetos foram repelidos pela mistura. Porém, o efeito repulsivo foi anulado quando adicionada amônia, que demonstrou ser atrativa em diversas concentrações testadas (13.6, 136, 1.364 e 13.637 p.p.m) e mesmo quando ofertada isoladamente. Contudo, a amônia não foi atrativa quando ofertada a concentrações mais elevadas (136.371 p.p.m), de modo que os insetos demonstraram preferência pelo “ar limpo” (sem qualquer composto volátil introduzido artificialmente no sistema). A quebra da ureia gera amônia como subproduto e é realizada, com a ação da enzima uréase, por diversos microrganismos, tais quais *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. (BENNERMAN e KLOOSE, 1991; BRADBURY, REID e CHAMPION, 2014; MORA e ARIOLI, 2014), os quais podem ser encontrados na microbiota da pele humana, através da qual é liberada amônia junto com o suor (ANTON e AGAPIOU, 2014).

O ácido láctico, que também é um subproduto do metabolismo bacteriano (KAHALID, 2011) e é também encontrado no suor humano, ao contrário da amônia, não demonstrou quaisquer efeitos significativos sobre *A. gambiae* (BRAKS, MEIJERINK e TAKKEN, 2001). Embora não tenham sido demonstrados efeitos significativos do ácido

lático sobre *A. gambiae*, esse composto demonstrou ser bastante atrativo para *A. aegypti*, tanto quando ofertado de maneira isolada quanto combinado com amônia (GEIER *et al.*, 2002). Braks, Meijerink e Takken (2001) realizaram experimentos em laboratório para comparar a atração de *A. gambiae* por suor humano “fresco” (armazenado a -20°C logo após a coleta) e por suor humano incubado (a 37° por dois dias) e verificaram ser o segundo mais atrativo do que o primeiro em razão, de acordo com os autores, do maior crescimento bacteriano e, conseqüentemente, da maior produção de compostos orgânicos voláteis (e.g. ácidos graxos) no suor incubado.

Geier e colaboradores (2002), no entanto, verificaram que exemplares de *A. aegypti* foram atraídos em laboratório pelo ácido láctico, isoladamente ou em associação com amônia ou com determinadas concentrações de ácidos graxos de cadeias saturadas (C1 – C3, C5 – C8, C13 – C18), produzidos por bactérias da pele, sendo essas associações mais atraentes do que o ácido láctico apenas. Tais associações resultaram em efeitos diferentes conforme a variação da concentração dos ácidos graxos. Aquelas contendo, por exemplo, compostos de maior cadeia carbônica, com 13 a 18 átomos de carbono, apresentaram efeito dose-dependente na atração de *A. aegypti*, enquanto ácidos graxos contendo de um a três átomos de carbono foram mais atrativos em concentrações mais baixas, com efeito, inversamente proporcional à dose.

Smallegange e colaboradores (2013) também verificaram que fêmeas de *A. gambiae*, tanto não infectadas quanto infectadas com *Plasmodium falciparum* (um dos principais agentes etiológicos de malária em humanos), são atraídas por odores da pele humana, porém, fêmeas infectadas parecem ser mais fortemente atraídas. Contudo, esses autores não identificaram o perfil de compostos presentes nesses odores. Mais recentemente, Van Loo e colaboradores (2015), avaliaram diferentes combinações de cinco compostos derivados de odores humanos, dois dos quais são relatados como emitidos por bactérias presentes na pele (butan-1-amina e 3-metil-1-butanol), e verificaram que algumas combinações podem ser atrativas para *Anopheles colluzii* e, assim, serem utilizadas como alternativas para o controle e o monitoramento da malária.

Com base nesses achados é possível perceber que diferentes insetos vetores podem apresentar diferentes comportamentos quando expostos a determinados compostos voláteis, de modo que um composto volátil, ou uma combinação de compostos, que é atrativo para uma espécie pode não ser para outra. Grande parte desses estudos de ecologia química abordaram, principalmente, as interações entre humanos e os vetores de agentes etiológicos da malária e do vírus da dengue/febre amarela/zika/chikungunya. Pouco se sabe, entretanto, sobre o comportamento de insetos vetores de leishmanioses diante desses odores e sobre as

interações destes com os seus hospedeiros, a respeito das quais as publicações científicas nos últimos trinta anos são escassas.

Hamilton e Ramsoondar (1994) verificaram em laboratório que tanto machos como fêmeas de *L. longipalpis*, principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas (YOUNG e DUNCAN, 1994; KILLICK-KENDRICK, 1999), são atraídos por odores da pele humana, porém as fêmeas são mais fortemente atraídas. Tal investigação foi conduzida, basicamente, com placas de Petri manuseadas (teste), onde cada voluntário permaneceu durante cinco minutos movendo as mãos sobre a superfície das placas, e não manuseadas (controle). Os autores constataram ainda que as fêmeas foram mais responsivas do que os machos e que populações de *L. longipalpis* de procedências diferentes apresentaram diferentes graus de antropofília.

Rebollar-Tellez e colaboradores (1999) realizaram experimentos semelhantes aos que Hamilton e Ramsoondar realizaram em 1994, porém, a partir das placas manipuladas pelos voluntários, realizaram a extração dos odores, impregnados durante a manipulação, com diferentes solventes orgânicos e demonstraram, pela primeira vez, que é possível extrair odores da pele humana impregnados nas placas a partir da lavagem das mesmas com solventes orgânicos não polares. Com esse procedimento, os autores testaram a atração de *L. longipalpis* e concluíram que os atrativos presentes na pele humana devem ser de natureza volátil e a presença ou ausência dos mesmos influencia na atratividade de cada pessoa para esses flebótomos.

Pinto e colaboradores (2001), por sua vez, testaram armadilhas em campo para capturar exemplares de *L. (N.) whitmani* e *L. (N.) intermedia* com base na presença de odores humanos e de diferentes níveis de dióxido de carbono. Nesses testes, esses insetos demonstraram maior atração por armadilhas, constituídas por tendas, que exalavam dióxido de carbono e que continham um humano adulto em seu interior do que por armadilhas que exalavam apenas dióxido de carbono. Os autores verificaram ainda que as fêmeas apresentaram maior tendência a serem atraídas pelos odores humanos do que os machos.

Alguns trabalhos realizados tanto em campo quanto em laboratório demonstraram que fêmeas de *Nyssomyia neivai*, também consideradas como vetores de agentes etiológicos de LTA no Brasil, são atraídas pelo octenol (PINTO *et al.*, 2001, PINTO *et al.*, 2012), composto orgânico volátil presente no hálito e no suor humano (BERNIER *et al.*, 2000; XUE *et al.*, 2008). Capturas em campo de *L. longipalpis* e *L. (N.) intermedia* foram intensificadas com a utilização de um polímero dispensador de octenol, colocados em armadilhas modificadas do tipo de CDC, o que demonstrou que esses flebótomos também são atraídos por esse composto

(ANDRADE *et al.*, 2008). Sant'Ana e colaboradores (2002) avaliaram as respostas eletroantegráficas de fêmeas de *L. longipalpis* e verificaram que esses animais são capazes de detectar 1-octen-3-ol (octenol) em correntes de ar. Em consequência desses achados, trabalhos recentes sobre o comportamento de flebotomos diante de compostos orgânicos voláteis têm utilizado esse álcool insaturado como controle positivo em testes de atração em laboratório (PINTO *et al.*, 2012; MAGALHÃES-JÚNIOR *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2015).

1.5 MÉTODOS DE CONTROLE DE FLEBOTOMÍNEOS

Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS (2016), o manejo de insetos vetores consiste em uma ação multisetorial que pode representar uma alternativa de custo relativamente baixo e eficiente para o controle de doenças. O controle de flebotomíneos como alternativa para a prevenção/controla das leishmanioses, no entanto, é complexo e ainda não existe uma ferramenta de amplo espectro e eficiente para o manejo desses vetores (KILLICK-KENDRICK, 1999; ALEXANDER e MAROLI, 2003; AMÓRA *et al.*, 2009; GOLDING *et al.*, 2015). Tal complexidade se deve a diversos fatores, como, por exemplo, a dificuldade de se encontrar criadouros naturais de formas imaturas de flebotomíneos, o que faz com que a maior parte dos métodos de controle seja aplicada às formas adultas dos mesmos (ALEXANDER e MAROLI, 2003).

Ações aplicadas às formas adultas, entretanto, parecem ser difíceis de atingir um efeito de largo espectro, dada a variedade de espécies flebotomínicas envolvidas nos ciclos das leishmanioses (KILLICK-KENDRICK, 1999; ALEXANDER e MAROLI, 2003; SHARMA e SINGH, 2008; AMÓRA *et al.*, 2009; BATS *et al.*, 2015) e da diversidade de habitats nos quais se dão sua ocorrência. O controle da leishmaniose visceral americana, por exemplo, deve ser focado no controle do seu principal vetor, *L. longipalpis*, que tem ampla ocorrência geográfica e, apesar de ser mais frequente em regiões abertas e do semiárido, é também urbanizado (ALEXANDER e MAROLI, 2003; COSTA, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009), enquanto a leishmaniose tegumentar americana, por sua vez, é mais frequente em zonas rurais e de florestas, geralmente em ambientes de umidade relativamente alta (ALEXANDER e MAROLI, 2003).

O manejo ambiental, o controle químico e o controle biológico estão entre os principais métodos já aplicados para o controle de vetores de leishmanioses. As alternativas

de controle químico estão associadas ao uso de inseticidas e repelentes, utilizados na pele, roupas ou no interior das casas. O manejo ambiental como método de controle de flebotomíneos está, geralmente, associado ao desequilíbrio das condições ambientais nos criadouros naturais, a fim de torná-los impróprios ao desenvolvimento desses insetos (ALEXANDER e MAROLI, 2003; AMÓRA *et al.*, 2009). Esse desequilíbrio pode ocorrer de forma natural, com a ocorrência de chuvas fortes e inundações e consequente destruição de criadouros, tais como troncos, frestas em rochas e árvores, bem como o próprio solo, ou ser decorrente da intervenção humana, como, por exemplo, com a poda de árvores para aumentar a incidência de luz solar nas florestas e, assim, alterar as condições de umidade e temperatura do solo, o que pode vir a perturbar criadouros naturais de flebotomíneos (AMÓRA *et al.*, 2009; BRASIL, 2013). Contudo, pouco se sabe sobre a eficiência desse tipo de controle e intervenções e quais as consequências para outros organismos habitantes da mesma área de ação.

O controle químico, por sua vez, já foi amplamente testado, aplicado com frequência em ambientes interiores e inclui, por exemplo, organoclorados (ex.: diclorodifeniltricloroetano - DDT), organofosfatos (ex.: malation), carbamatos (ex.: propoxur) e piretróides (permetrin e deltametrin) (KILLICK-KENDRICK, 1999; ALEXANDER e MAROLI, 2003; SHARMA e SINGH, 2008; AMÓRA *et al.*, 2009). Essas alternativas, apesar de serem vantajosas pela capacidade de atuar sobre um amplo espectro de insetos e ser de custo relativamente baixo (ALEXANDER e MAROLI, 2003; SHARMA e SINGH, 2008), tem caído em desuso e, alguns produtos, como o DDT, teve uso proibido, em razão dos riscos de contaminação ambiental, intoxicação de organismos e do desenvolvimento de resistência do vetor (KILLICK-KENDRICK, 1999; ALEXANDER e MAROLI, 2003; SHARMA e SINGH, 2008; AMÓRA *et al.*, 2009).

Métodos de controle biológico podem atuar, por exemplo, sobre formas larvais e promover a interrupção do desenvolvimento do flebótomo, sobre formas adultas, com a indução da morte do inseto ou, ainda, promover a morte de parasitas *Leishmania* no intestino do flebótomo e assim auxiliar no controle da transmissão das leishmanioses. Larvas de *L. longipalpis* no terceiro estágio, por exemplo, são suscetíveis à *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelenses* (WERMELINGERR *et al.*, 2000) e, assim, essas bactérias podem, a princípio, ser consideradas potenciais ferramentas de controle de flebótomos em seus criadouros naturais. Algumas plantas, como *Solanum jasminoides*, *Ricinus communis* e *Bougainvillea glabra* são tóxicas para flebótomos adultos (SHARMA e SINGH, 2008). Outras, como *Capparis spinosa*, *Ricinus communis* e *Solanum luteum*, são utilizadas como fonte de alimento para

Phlebotomus papatasi, vetor de *Leishmania major*, e demonstraram ser capazes de reduzir a longevidade desses insetos bem como induzir a mortalidade e a reduzir viabilidade de *L. major* em experimentos realizados em laboratório (SCHLEIN e JACOBSON, 1994; JACOBSON e SCHLEIN, 1999; SCHELEIN, JACOBSON e MÜLLER, 2001). Achados dessa natureza podem representar uma alternativa economicamente viável e ecologicamente equilibrada para o controle de flebótomos e das leishmanioses, através, por exemplo, da utilização de plantas como barreiras de proteção em residências localizadas em áreas endêmicas.

O uso de semioquímicos tem sido sugerido como método de controle de flebótomos, sobretudo com o desenvolvimento de métodos de captura mais eficientes e mais práticos do que os utilizados atualmente, tais como a captura manual, o uso de armadilhas luminosas, como as do tipo CDC (desenvolvidas pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos – Center of Diseases Control - CDC) e armadilhas adesivas do tipo “sticky trap” (PINTO *et al.*, 2001; MONCAZ *et al.*, 2013). Alguns trabalhos tiveram sucesso com o aumento da captura de flebótomos em campo através da utilização de armadilhas impregnadas com odores de hospedeiros e dióxido de carbono (PINTO *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2008; BERNIER *et al.*, 2008; MONCAZ *et al.*, 2013). Apesar do sucesso, o uso de dióxido de carbono, assim como de armadilhas luminosas, implica, geralmente, em custo relativamente elevado para a manutenção das mesmas em campo. Assim, compostos voláteis que atuem como cairomônios ou feromônios para flebotomíneos são possíveis candidatos para serem utilizados em estratégias de controle e monitoramento desses insetos, tanto com o aumento da eficiência de armadilhas já existentes, quanto com a possibilidade de se elaborar métodos mais simples e mais baratos com odores que possam exercer forte atração para esses vetores.

O conhecimento acerca desse tema ainda é limitado e precisa ser mais explorado, principalmente diante da diversidade de vetores de protozoários causadores de leishmanioses, sobretudo de LTA. É importante investigar as relações básicas envolvidas entre diferentes espécies de flebotomíneos com esses odores e o conhecimento da ecologia química desses vetores poderá auxiliar na formulação de estratégias de controle tanto para o inseto adulto quanto para as suas formas larvais. O aprimoramento de armadilhas de captura é sem dúvida a aplicação mais rápida e direta para o monitoramento e controle das formas adultas de flebotomíneos. Contra formas imaturas, feromônios que estimulem a oviposição, por exemplo, podem ser utilizados na preparação de substratos mais atrativos para fêmeas adultas grávidas, de modo a direcionar a formação de criadouros e assim, facilitar a aplicação de larvicidas. Além disso, compostos voláteis emitidos por hospedeiros, capazes de atrair ou

repelir flebótomos, podem ser emitidos também por outros organismos, tais como plantas. Esses organismos, por sua vez, quando utilizados por flebotomíneos para alimentação, podem reduzir a longevidade dos mesmos ou, ainda, exercer efeito leishmanicida, como mencionado anteriormente (JACOBSON e SCHLEIN, 1999; SCHELEIN, JACOBSON e MÜLLER, 2001).

1.6 MEFS-HS/CG-MS COMO ESTRATÉGIA PARA O ESTUDO DE ODORES

Os odores humanos têm sido investigados com os mais variados propósitos, desde, por exemplo, a caracterização do perfil de odores na busca de possíveis feromônios humanos, como na busca de compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes no hálito, os quais possam servir como marcadores de determinadas doenças e, assim, como serem utilizados como ferramenta não invasiva e de baixo custo no diagnóstico das mesmas, sobretudo como potenciais marcadores de diversos tipos de câncer (DORMONT, BESSIERÈ e COHUET, 2013; HAICK *et al.*, 2014). Além dessas aplicações, os estudos relacionados aos odores humanos, principalmente aqueles emanados da pele, têm sido realizados para compreender as relações entre insetos antropofílicos hematófagos vetores de doenças e os odores exalados da pele humana, a fim de se investigar e identificar odores-chaves envolvidos nas relações de atração/repulsão entre esses vetores e o hospedeiro humano e, assim, buscar desenvolver alternativas de controle dessas doenças (DORMONT, BESSIERÈ e COHUET, 2013).

Para a determinação do perfil de COVs dos odores da pele humana, não há um protocolo padrão. Diversos métodos podem ser aplicados para coletar, extrair, transferir e detectar odores da pele humana (PANDEY e KIM, 2011). Contudo, a combinação das técnicas de Microextração em Fase Sólida (MEFS) e de Cromatografia Gasosa (CG) acoplada à Espectrometria de Massas (EM) tem sido aplicada com sucesso nas etapas de extração, separação e detecção dos compostos orgânicos voláteis (COVs) que compõem esses odores (VAS e VÉKEY, 2004; GALLAGHER *et al.*, 2008; DORMONT *et al.*, 2013).

A MEFS consiste em uma técnica de microanálise onde o processo de extração e pré-concentração de analitos é realizado com uma fibra ótica revestida por um polímero. De acordo com Valente e Augusto (2000), no processo de MEFS-HS é utilizado uma fibra ótica de sílica fundida recoberta por um fino filme de um polímero (exs.: polidimetilsiloxano – PDMS; poliacrilato – PA), no qual os COVs da amostra podem, por afinidade, aderirem-se nos sítios de ligação da fibra, para depois serem desorvidos no sistema CG-MS. A fibra mais

adequada irá depender do perfil qualitativo dos COVs da amostra testada e é bastante vantajosa por ser simples, sensível, não requer a utilização de solventes, tem alta capacidade de concentração dos voláteis a serem extraídos, é aplicável a diversos tipos de analitos e facilita o transporte do material extraído até o injetor do cromatógrafo, onde ocorre a dessorção térmica dos compostos adsorvidos, para que ocorra então a separação e detecção dos mesmos (FIGURA 3) (VALENTE e AUGUSTO, 2000; DORMONT, BESSIERÈ e COHUET, 2013).

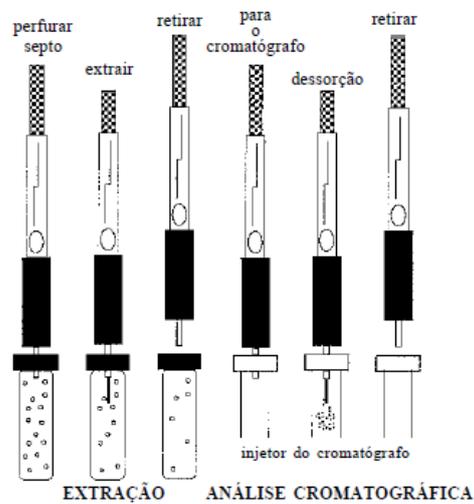


Figura 3 - Esquema básico das etapas de Microextração em Fase Sólida – MEFS no modo *headspace* - HS. (Fonte: Valente e Augusto, 2000).

Quando não se sabe ao certo qual o perfil de moléculas esperado, quanto à polaridade, tamanho e peso molecular, por exemplo, é aconselhável testar fibras com características diferentes para avaliar qual é a mais eficiente para a extração dos COVs da amostra estudada. A TABELA 1 mostra as fibras comercialmente disponíveis mais comuns e suas respectivas características (VALENTE e AUGUSTO, 2000; SULPECO INC., 2016). As fibras de Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno - PDMS/DVB e a Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano - DVB/CAR/PDMS estão entre as opções mais utilizadas em análises de COVs da pele humana (CURRAN *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; GALLAGHER *et al.*, 2008).

Tabela 1- Principais tipos de fibras comercialmente disponíveis e suas respectivas características.

Tipo	Composição	L_f (μm)	ΔT $^{\circ}\text{C}$	Aplicação
Não polar	PDMS	7 ;	200 – 320;	Compostos não polares (PM = 125 – 600);
		30; 100	200 – 280	Voláteis, amins e compostos nitro aromáticos;
Polar	PA	85	220 – 310	Medianamente a compostos altamente polares, como fenóis. Cetonas e álcoois. Voláteis de média e alta volatilidade.
Bipolar	PDMS/DVB	65	200 – 270	Voláteis e não voláteis e baixa e alta polaridade.
	DVB/CAR/PDM S	50/30	230 – 270	Voláteis e semivoláteis. C3-C20. PM = 40-275.
	CAR/PDMS	75/85	250 – 310	Voláteis de baixo peso molecular (30 – 225)

L_f = espessura de recobrimento da fibra; ΔT $^{\circ}\text{C}$ intervalo de temperatura para dessorção da fibra.

Frequentemente, a técnica de MEFS é aplicada após coleta prévia dos odores da pele através de, por exemplo, pedaços de gaze ou algodão, que, depois de friccionados contra a pele durante um determinado tempo, podem ficar impregnados com os compostos presentes nesses odores, os quais são então extraídos desses materiais, indiretamente, pela ação de solventes, ou diretamente, por volatilização térmica, seguida da aderência, por afinidade, em uma fibra adsorvente (VALENTE e AUGUSTO, 1999; DORMONT, BESSIERÈ e COHUET, 2013). Contudo, o uso dessas matrizes apresenta a desvantagem de se obter também compostos que não compõe o perfil de COVs da amostra coletada e que muitas vezes são inerentes ao próprio material, pois, ainda que estes sejam biologicamente estéreis, não o são do ponto de vista químico (PRADA, CURRAN e FURTON, 2010). A captura dos COVs pode ser realizada por meio de contato direto da fibra com a pele (DORMONT *et al.*, 2013), porém, esse método se torna financeiramente inviável quando há a necessidade de se coletar amostras de um número relativamente grande de pessoas em campo, pois seria necessário uma fibra para cada indivíduo, o que oneraria muito esse tipo de estudo, dado o custo relativamente alto desse polímero.

Desse modo, observou-se a necessidade de se desenvolver um método alternativo para a coleta de odores da pele de pessoas na área de estudo, o qual fosse de baixo custo, possível de ser realizado em poucos minutos, de forma indolor e com muito baixo ou nenhum risco de reações adversas na pele dos voluntários (tais como alergia e/ou irritação), e que permitisse o processamento rápido e direto, sem pré-tratamentos, a fim de minimizar os riscos de contaminação das amostras.

Diversos trabalhos desenvolvidos na área da ciência forense relataram a utilização de pelos humanos como matriz biológica para extração de COVs com a aplicação da técnica de microextração em fase sólida, no modo *headspace*, acoplada a cromatografia gasosa e espectrometria de massas (MEFS-HS/CG-EM), para investigação de marcadores químicos que indiquem o uso de drogas, tais como maconha, cocaína e álcool (STRANO-ROSSI e CHIAROTTI, 1999; PRAGST *et al.*, 2001; TOLEDO *et al.*, 2003; BERMEJO *et al.*, 2005). Pelos de cães também já foram utilizados com sucesso na determinação do perfil de COVs exalados por esses animais e inclusive na identificação de marcadores para infecção por *Leishmania infantum* (OLIVEIRA *et al.*, 2008; MAGALHÃES-JÚNIOR *et al.*, 2014).

A identificação dos COVs que compõe o perfil de odores da pele humana, sobretudo daqueles produzidos por bactérias da pele, poderá somar um importante conhecimento na compreensão das relações ecológicas entre vetor e hospedeiro e o ciclo de transmissão das leishmanioses. Além disso, os conhecimentos obtidos a partir dessa pesquisa podem ainda fornecer subsídios teóricos para o desenvolvimento de novas alternativas para o controle dessas doenças como, por exemplo, com o desenvolvimento de repelentes mais efetivos ou de armadilhas mais atraentes para esses insetos como já especulado para vetores de outras doenças, como, por exemplo, a malária (VERHULST *et al.*, 2010a; VERHULST *et al.*, 2011).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2.1 JUSTIFICATIVA

A transmissão das leishmanioses depende diretamente das relações entre vetores e hospedeiros. Desse modo, para o controle dessas doenças é importante compreender não apenas a biologia do parasita no interior do vetor e nas células do vertebrado hospedeiro, mas também as relações ecológicas entre ambos, sobretudo no que diz respeito à comunicação química através do olfato, haja vista que esse sentido é fundamental para a orientação dos insetos na natureza. Os odores exalados pelos vertebrados podem, portanto, ser cruciais para localizar a fonte alimentar sanguínea requerida pelo inseto hematófago. Como elucidado na introdução do presente trabalho, diferentes espécies de insetos vetores de agentes causadores de doenças que acometem humanos podem apresentar diferentes comportamentos diante dos mesmos compostos ou diante de uma mesma combinação de compostos, de modo que o que é atrativo para uma determinada espécie pode não ser para outra, fato este que demonstra a necessidade de se estudar o comportamento específico dos diferentes insetos vetores de doenças na busca da fonte alimentar sanguínea, por meio de pistas químicas.

Para intervir nas relações entre insetos vetores e vertebrados, de modo a prevenir que os patógenos se alastrem em uma determinada comunidade ou população, sobretudo humana, é importante conhecer os mecanismos que estão envolvidos nas interações que levam à transmissão de uma determinada doença por um inseto vetor. Apesar de estarem entre as principais doenças transmitidas por vetores no mundo e estarem incluídas no programa de controle prioritário da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010), pouco se sabe sobre as relações químicas envolvidas entre os insetos vetores de agentes de leishmanioses e os odores humanos.

O conhecimento sobre os COVs e seus efeitos envolvidos nas interações entre humanos e flebotomíneos, é importante para a elaboração de métodos de controle e monitoramento das leishmanioses, como, por exemplo, com o desenvolvimento de armadilhas mais atrativas e eficientes, que poderão ser utilizadas como importante ferramenta para o monitoramento da densidade populacional de flebotomos em áreas endêmicas dessas doenças e para a captura e redução desses vetores, de modo a reduzir a transmissão das leishmanioses. Além disso, esse conhecimento pode também viabilizar, por exemplo, a identificação de plantas que naturalmente produzem, por exemplo, compostos voláteis com efeitos repelentes

sobre esses vetores e, assim, podem também esses organismos ser utilizados como uma forma ecologicamente correta e economicamente viável de prevenir populações humanas contra essas doenças. Portanto, estudos exploratórios que visem fornecer informações a respeito da ecologia química entre insetos vetores e humanos são de grande importância para viabilizar o desenvolvimento de métodos de controle de doenças transmitidas por vetores, que sejam mais baratos, eficientes e com baixo ou nenhum impacto nocivo ao ambiente.

Outro aspecto motivador para o desenvolvimento deste trabalho foi o fato de que a disponibilidade de flebótomos é fator limitante para a concretização de pesquisas em laboratório (VOLF e VOLFOVA, 2011) e, portanto, o desenvolvimento de armadilhas mais eficientes poderá ser útil também para viabilizar a realização de diversos trabalhos em laboratório, tais como para o estudo da biologia desses flebótomos, avaliação da infecção natural, estudos ecológicos que avaliem as interações entre vetor, hospedeiro e parasita, estudos de imunoprofilaxia a partir da saliva de flebótomos, criação e estabelecimento de colônia flebotomínica em laboratório, dentre outros temas.

Uma vez que a LTA é, dentre as leishmanioses, a que apresenta maior incidência em humanos, o presente trabalho teve como objeto de estudo o comportamento das duas principais espécies de flebotomíneos vetores de LTA no Brasil: *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*, as quais ocorrem, geralmente, de forma simpátrica nas áreas de peridomícilios (MIRANDA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2002; SALOMÓN, 2009) e apresentam comportamentos endofílicos e antropofílicos (GOMES *et al.*, 1986; AZEVEDO *et al.*, 1996; CAMPBELL-LENDRUM, PINTO e DAVIE, 1999; GONTIJO e CARVALHO, 2003).

2.2 HIPÓTESE

Assumiu-se no presente trabalho a hipótese geral de que fêmeas de *Lutzomyia* sp., vetores de agentes causadores de LTA, são atraídas por compostos orgânicos voláteis que compõe os odores da pele humana.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

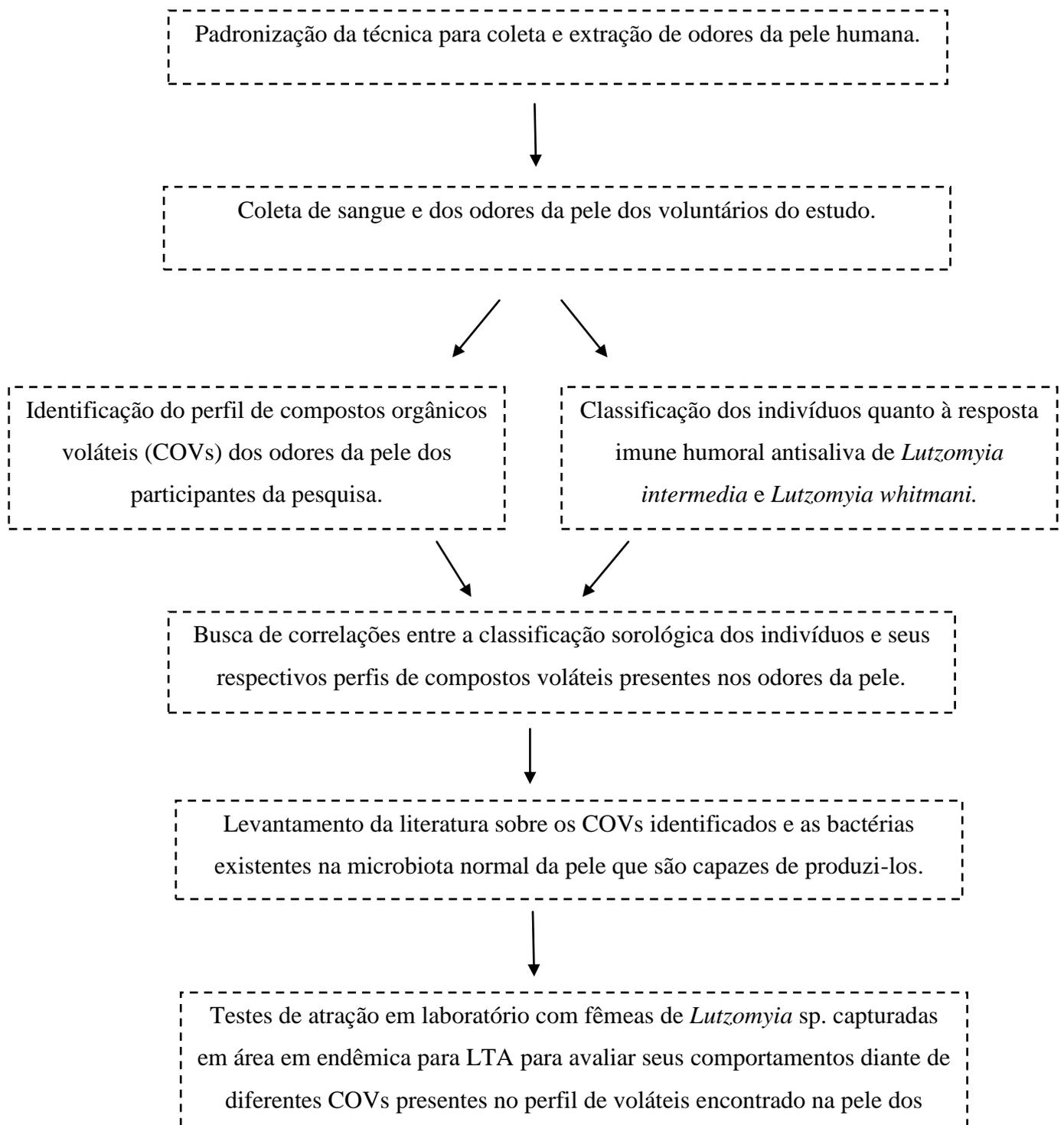
O objetivo geral deste estudo foi investigar os COVs presentes na pele humana e seus efeitos na atração de vetores de LTA com a finalidade de desenvolver e aprimorar alternativas para o controle dos mesmos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar os COVs presentes na pele de moradores de área endêmica para LTA;
- 2) Identificar bactérias produtoras dos COVs encontrados;
- 3) Avaliar a atração de flebotomíneos capturados em área endêmica para LTA pelos COVs identificados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos propostos, o presente trabalho foi realizado em, basicamente, seis etapas, as quais estão esquematizadas abaixo e estarão descritas nas próximas seções:



4.1 ÁREA DE ESTUDO, POPULAÇÃO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

4.1.1 Área de estudo

O Posto de saúde da localidade (FIGURA 3) está às margens da BR-101 (13.50'94.80 S, 39.44'84.84 W), a 275 km de Salvador, capital do estado da Bahia (AMPUERO, MACÊDO e MARSDEN, 2006), e é considerado centro de referência no diagnóstico e tratamento para LTA, de modo que atende mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea (LC) na região (quase que exclusivamente causada pelo protozoário *Leishmania braziliensis*), provenientes tanto da própria localidade, quanto de 14 municípios vizinhos, dentro de um raio de 34 km, apesar desses também possuírem seus postos de saúde locais (JIRMANUS *et al.*, 2012; LEWNARD *et al.*, 2014).

No Centro de Referência para Leishmaniose, na localidade de Corte de Pedra, situada no município de Presidente Tancredo Neves, são atendidos pacientes deste município e de outros municípios vizinhos localizados no sudoeste da Bahia– Brasil, e representa uma das áreas de maior prevalência de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) do estado (COSTA *et al.*, 1998). Dentre as espécies que atuam como vetores de agentes LTA predominantes na região estão *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia*, as quais ocorrem de modo simpátrico, com flutuações em relação à predominância entre elas¹ (MIRANDA *et al.*, 2002; COSTA, 2005). Segundo Carvalho e colaboradores (2012), a região abrange mais de 8000 km² de área e está a 15 – 500 metros acima do nível do mar, originalmente apresenta constituição vegetal de floresta tropical chuvosa, porém já sofreu intenso desmatamento para plantação de cacau, banana e mandioca. Quanto aos aspectos climáticos, os mesmos autores relataram média pluviométrica anual entre 1.100 e 2.100 mm e temperatura entre 18 e 30°C.



Figura 3 – Posto de Saúde de Corte de Pedra. À esquerda, placa de sinalização localizada à margem da BR-101, com indicação da entrada para o Posto de Saúde de Corte de Pedra (à direita da foto).

¹ Comunicação pessoal com o Dr. José Carlos Miranda, em julho de 2016.

4.1.2 População de estudo

Trinta e três moradores da região de estudo, todos sem histórico de LTA, participaram dessa pesquisa. A seleção dos participantes se deu a partir de um banco de dados construído durante um estudo epidemiológico prévio realizado por uma equipe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos – HUPES/Universidade Federal da Bahia - UFBA e do Laboratório de Imunoparasitologia (LIP), do Instituto Gonçalo Moniz (IGM), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador – Bahia, que estabeleceu uma coorte prospectiva com 264 indivíduos moradores da região, para caracterizar a resposta imune dessas pessoas diante da saliva de *L.(N.) intermedia* (CARVALHO *et al.*, 2015) e *L. (N.) whitmani*, que compõem, predominante, a fauna flebotomínica da região (SANTOS *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2002; COSTA, 2005).

Para formar um grupo o mais homogêneo possível, os voluntários atenderam aos seguintes critérios de inclusão: ser do sexo masculino; ter idade entre 18 e 60 anos; residir na região de estudo; apresentar exames clínicos sem alterações significativas de saúde geral; não apresentar antecedentes de alcoolismo e/ou de consumo de drogas; não ter antecedentes de anafilaxia e/ou alergias, doenças autoimunes, enfermidades crônicas e/ou agudas, bem como de tratamento psiquiátrico e/ou com imunossuppressores.

Foram adotados ainda os seguintes critérios de exclusão para este estudo: ter idade inferior a 18 anos ou acima de 60 anos; residir fora da região de estudo; apresentar evidência de lesão cutânea ou mucosa, suspeita ou não como decorrente de LTA; ter realizado tratamento prévio com drogas leishmanicidas nos últimos seis meses; apresentar evidências clínicas de alterações cardíacas, concomitância de tuberculose, hanseníase, câncer, diabetes mellitus ou outras doenças graves; apresentar histórico de alcoolismo; tratamento com corticosteroides ou outro imunossupressor; ter tomado banho e/ou utilizado cremes e/ou sabão e/ou perfumes na pele nas vinte e quatro horas precedentes a coleta; estar fazendo uso de medicamentos tópicos ou sistêmicos, sobretudo de vitaminas e/ou antibióticos, na ocasião da coleta, ter ingerido bebida alcoólica e/ou alimentos condimentados, bem como fumado nas vinte e quatro horas prévias à coleta.

Além de atender aos critérios de inclusão, os participantes permitiram a coleta de sangue por acesso venoso, bem como permitiram a coleta de pelos da superfície de suas peles. As coletas foram realizadas durante o período de 26 de abril a 01 de maio de 2015 e a equipe de pesquisadores envolvidos teve o Posto de Saúde de Corte de Pedra e suas instalações, que inclui estrutura laboratorial e uma casa anexa ao posto, como bases de apoio para o

processamento e armazenamento das amostras coletadas, bem como para a acomodação dos pesquisadores durante esse período. As amostras biológicas dos voluntários foram coletadas diretamente nas residências dos indivíduos participantes. Para acessar esses locais, distribuídos entre zona urbana e zona rural (FIGURA 4), foi necessário um veículo com tração 4 x 4.

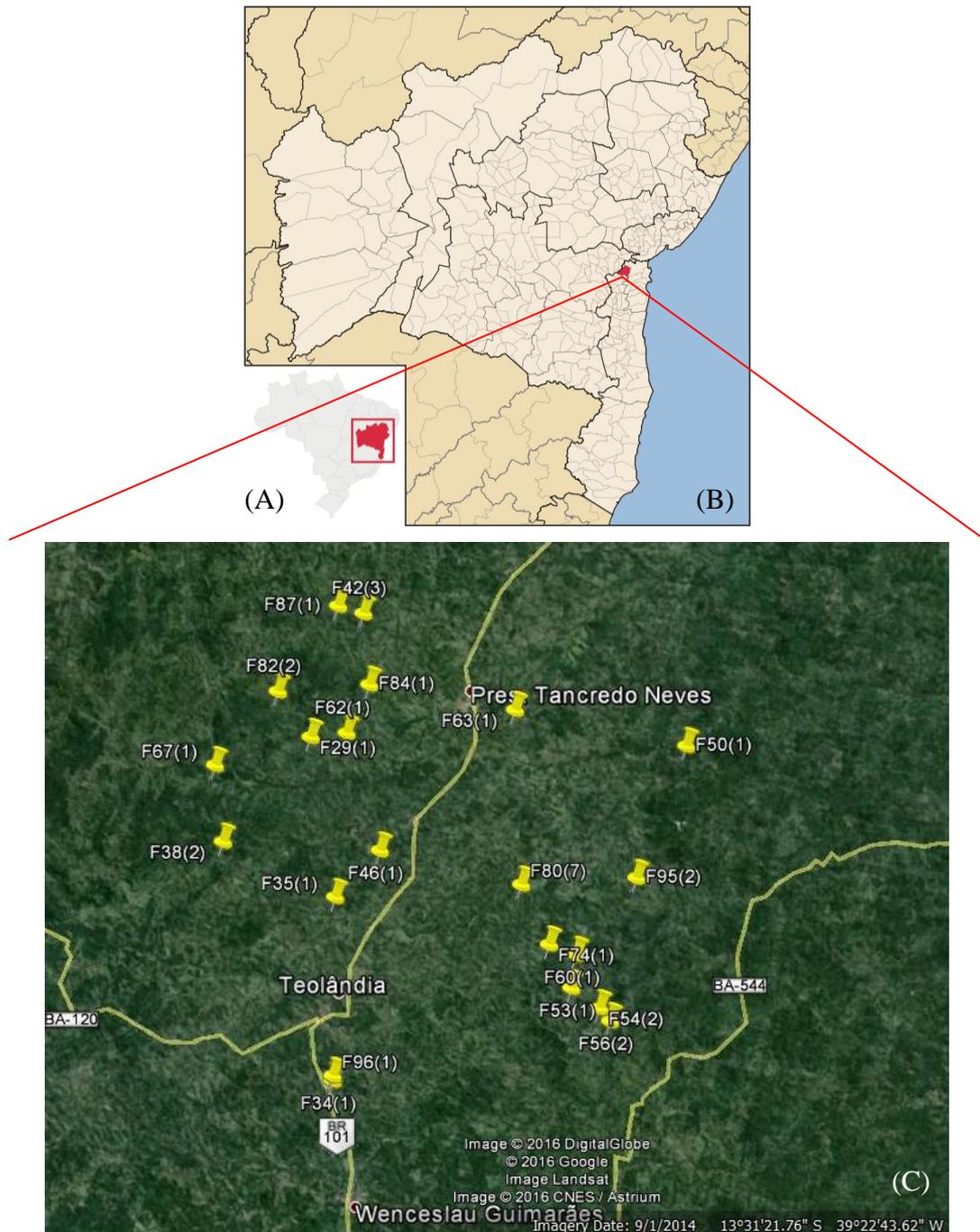


Figura 4 – Mapa do estado do Brasil com detalhe para o estado da Bahia (A) e mapa da Bahia com detalhe para o município de Presidente Tancredo Neves (B). Mapa com a distribuição dos locais visitados (códigos de cada família – F – visitada com o respectivo número de indivíduos participantes entre parênteses) durante as coletas em Corte de Pedra – BA (C). Imagem: Google Earth.

4.1.3 Aspectos éticos

Cada participante dessa pesquisa foi previamente contatado e informado sobre todos os critérios a serem atendidos para participar, de forma voluntária, do presente estudo, bem como sobre todos os procedimentos aos quais seriam submetidos, e que estão devidamente descritos no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE I) assinado por cada voluntário.

Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas do CPqGM da FIOCRUZ – Bahia, com número de Certificado de Apreciação Ética (CAAE) 19778013.6.0000.0040, e recebeu aprovação sob número de parecer 1.139.243.

4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PARTICIPANTES QUANTO À RESPOSTA IMUNE HUMORAL PARA SALIVA DE *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* E *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani*

A presença de anticorpos contra saliva para *L. intermedia* e *L. whitmani* no soro sanguíneo de indivíduos residentes em áreas de ocorrência desses insetos pode ser considerada um marcador de exposição aos mesmos, como já relatado para *L. intermedia* e outros flebótomos (VINHAS *et al.*, 2007; ANDRADE e TEIXEIRA, 2012; WEINKOPF, 2014; CARVALHO *et al.*, 2015). Assim, para avaliar a susceptibilidade dos participantes dessa pesquisa a picadas desses vetores de LTA, foi realizado ensaio imunoenzimático – ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, com os soros obtidos a partir do sangue desses indivíduos. A resposta anti-saliva do soro de cada indivíduo foi avaliada a partir dos resultados obtidos com testes ELISA realizados para a saliva de *L. (Nyssomyia) intermedia* e para a saliva de *L. (Nyssomyia) whitmani*, separadamente.

4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE COLETA, EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) PRESENTES EM ODORES DA PELE HUMANA

Por estarem em íntimo contato com a pele, assumiu-se neste trabalho que os pelos atuam como uma malha de retenção dos odores emanados a partir desse tegumento e, portanto, podem ser utilizados como amostras superficiais desse tegumento para extração dos COVs emanados a partir do mesmo. Com base nessa premissa, foi realizada uma série de

experimentos para avaliar a possibilidade de se utilizar amostras de pelos humanos na determinação do perfil de COVs da pele, através da técnica de microextração em fase sólida (MEFS), no modo *headspace* (HS), acoplada a cromatografia gasosa (CG) associada à espectrometria de massas (EM) – MEFS-HS/CG-EM, como está descrito a seguir. Os compostos 6-metil-5-hepten-2-ona, octanal, nonanal, decanal e geranilacetona, por serem frequentemente relatados como presentes no perfil de COVs emitidos pela pele humana, independentemente do método de coleta utilizado (DORMONT, BESSIERÈ e COHUET, 2013), foram adotados como marcadores de qualidade dessas análises.

4.3.1 Teste piloto

Inicialmente, foi realizado um teste piloto para avaliar se os pelos poderiam ser utilizados como matriz para extração de COVs da pele humana. O material utilizado nesse teste foi doado por um membro da equipe de pesquisadores do LIP, de 30 anos de idade na ocasião, pele branca e com perfeitas condições de saúde. O voluntário não ingeriu bebida alcoólica, nem alimentos condimentados, bem como não fumou e não tomou banho, ou fez uso de perfume, nas últimas vinte e quatro horas que antecederam a coleta. Essas medidas foram adotadas para minimizar o impacto de fontes exógenas de COVs no odor da pele do indivíduo avaliado (GALLAGHER, *et al.*, 2008; VERSHULST *et al.*, 2011).

O colaborador teve os pelos das pernas, abaixo do joelho, cortados a uma altura entre 1 e 3 mm da superfície da pele, com o auxílio de uma máquina de aparar pelos, marca WAHL®, modelo CLIPPER 9971516, portátil, com funcionamento a pilha AA. Nesse teste piloto foram utilizados 300 mg de pelos, divididos entre 3 amostras de 100mg, mensurados em balança analítica (precisão = 0.001g). Cada amostra foi colocada em um *vial* de 20 ml, lacrado com uma tampa de alumínio dotada de um septo de silicone.

Os métodos adotados para MEFS-HS/CG-MS, descritos a seguir, foram baseados no trabalho de Oliveira e colaboradores (2008). Cada *vial* com 100 mg de pelos foi inserido em um bloco de alumínio (altura = 4 cm; diâmetro = 8 cm), acoplado em uma placa de aquecimento com temperatura controlada. A extração dos COVs dessas amostras foi realizada com um suporte manual para MEFS (Sulpeco, Bellefonte), equipado com uma fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB 65µm, Supelco, Bellefonte), a qual foi exposta, a cada réplica, uma amostra de 100 mg de pelos, através do septo de silicone do *vial*, durante 45 minutos e a temperatura de 80°C (FIGURA 5A).

Após a etapa de extração, a fibra foi recolhida para o interior do suporte e transportada até o CG-MS (Shimadzu GC-2010/QP – 2010 quadropolo de alto desempenho, Japão), para as etapas de dessorção, separação e detecção dos COVs. Com auxílio do suporte manual, a fibra foi inserida no injetor do cromatógrafo e exposta durante 3 minutos para dessorção térmica (FIGURA 5B).

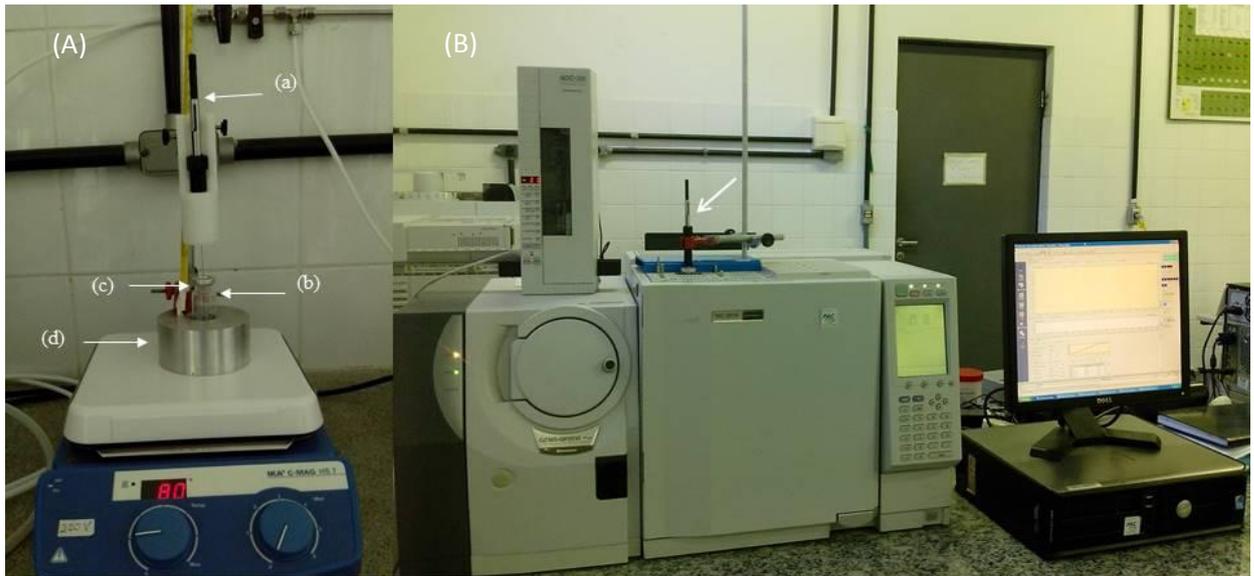


Figura 5 - (A) Microextração em fase sólida - MEFS. Injetor manual (a) com a fibra para extração exposta no *headspace* (b) no interior do *vial*, através da perfuração do septo de silicone da tampa de alumínio pelo suporte da fibra (c). Bloco de alumínio, sobre placa aquecedora, adaptado para o encaixe do *vial* de 20 ml (d). (B) Sistema do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-MS), conectados a um computador com o software.

O sistema CG-MS foi utilizado com as seguintes condições de instrumentação:

- coluna DB-1MS;
- dessorção térmica: 3 minutos;
- temperatura do injetor: 240°C;
- gás de arraste: He;
- modo de injeção: *splitless*;
- pressão: 25 kPa;
- fluxo total: 5 ml/min;
- modo de controle do fluxo: velocidade linear;
- velocidade linear: 30.2 cm/s;
- fluxo da coluna: 0.7 ml/min;
- fluxo de purga: 3 ml/min;

- programação da temperatura: 40°C por 30 min, 2°C min⁻¹ até 130°C, 130°C por 15 min, 2°C min⁻¹ até 245°C e 245°C por 4 min;
- tempo total de análise: 124.5 min;
- temperatura da linha de transferência e da fonte iônica: 240°C;
- energia de impacto de elétrons: 70 eV;
- frequência de escaneamento: 2s⁻¹ de m/z 40 a m/z 400.

Os resultados obtidos com esse teste inicial foram avaliados quanto ao número total de picos e a área total obtida nos cromatogramas, bem como a presença de contaminantes químicos.

4.3.2 Padronização do método de MEFS-HS/CG-EM com pelos humanos

Com base nos resultados obtidos no teste piloto, foi realizada uma série de experimentos para padronizar o método de extração de COVs a partir de amostras de pelos humanos, obtidos com o mesmo voluntário que participou do teste piloto. Inicialmente, foram avaliados os seguintes parâmetros para MEFS-HS: fibra de extração, temperatura de extração, tempo de extração e a quantidade de pelos (em mg) por amostra. Os fatores relativos ao CG/EM foram mantidos como descrito no item 4.3.1.

A definição de cada variável (fibra, temperatura, tempo e massa de pelos), deu-se a partir da avaliação quantitativa em relação ao número de picos e a área total dos mesmos, obtidos nos cromatogramas de cada fator testado. Além disso, foi levada em consideração a presença ou não de contaminantes químicos, sobretudo derivados de siloxano, que podem ser resultantes da degradação da coluna cromatográfica ou da fibra de extração, de modo que são considerados contaminantes químicos nessas análises e devem ser evitados.

4.3.2.1 Fibra de extração

Nesse trabalho, as fibras disponíveis para os testes foram a PDMS/DVB 65 µm, a CAR/PDMS 75 µm e a PDMS 100 µm. Para cada uma delas foram realizados testes em triplicata, com 100 mg de pelos por réplica, provenientes do mesmo voluntário e sob as mesmas condições apresentadas no item 4.3.1 Assim, a única variável em cada teste foi a fibra de extração.

4.3.2.2 Temperatura de extração

A temperatura é fator de grande influência na eficiência da MEFS, sobretudo quando a matriz em análise é sólida. O aquecimento da amostra pode fazer com que os analitos presentes nela se volatilizem de forma mais intensa e se concentrem no espaço acima da amostra, denominado *headspace* (HS), o que facilita o processo de extração pela fibra de MEFS (ZHANG, YANG e PAWLISZYN, 1994). Assim, foram testadas as seguintes temperaturas: 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e 90°C. Cada temperatura foi avaliada em triplicata (100 mg/réplica), com fibra PDMS/DVB, ao longo de 45 minutos de extração.

4.3.2.3 Tempo de extração

A MEFS consiste, basicamente, no equilíbrio dos analitos entre a fibra de extração e o meio envolto dela, com base na transferência de massas entre a matriz e a fibra através do *headspace* (VALENTE e AUGUSTO, 2000). Assim como a fibra e a temperatura, existe um tempo ótimo durante o qual o processo de MEFS deve ocorrer para que a eficiência da extração seja a melhor possível. Dessa forma, foram testados os seguintes intervalos de tempo: 10, 20, 30, 40 e 50 minutos de extração. Para cada intervalo de tempo, foram realizados testes em triplicata (100 mg/amostra), com fibra PDMS/DVB e temperatura de 90°C.

4.3.2.4 Massa de pelos por amostra

A massa da matriz de extração também pode afetar o rendimento da extração de COVs. Teoricamente, quanto maior a massa utilizada na extração, maior deverá ser a intensidade/abundância dos compostos encontrados. Contudo, o número de compostos pode ou não variar conforme a quantidade de amostra disponível para a extração. Nesse trabalho, o ideal almejado foi trabalhar com a menor massa possível de pelos, para que as coletas em campo pudessem ser realizadas de forma rápida e que a quantidade de pelos nas pernas dos voluntários não fosse fator limitante para as análises, pois, algumas pessoas podem apresentar uma quantidade relativamente maior ou menor que outras.

As massas avaliadas nessa etapa foram definidas com base no trabalho de Oliveira e colaboradores (2008): 20 mg, 50 mg, 100 mg e 200 mg. Cada extração foi realizada em

triplicata, com fibra PDMS/DVB, a 90°C, durante 40 minutos. Nessa etapa, o fator de maior relevância para a escolha da massa a ser utilizada foi o número de COVs visualizados nos cromatogramas, de modo que a menor massa possível de pelos pudesse ser estabelecida para as análises do material a ser coletado dos participantes da pesquisa.

4.4 COLETA E ANÁLISE DOS COVs QUE COMPÕE OS ODORES DA PELE DE MORADORES DE CORTE DE PEDRA – BAHIA

4.4.1 Coleta e extração de COVs

Os procedimentos apresentados a seguir foram adotados com base nos resultados obtidos no desenvolvimento do método apresentado no item 4.3. Assim, foram coletados 60 mg de pelos das pernas, sãs, abaixo dos joelhos (conforme descrito no item 4.3.1) de trinta e três indivíduos, entre 18 e 60 anos, residentes nas proximidades da localidade de Corte de Pedra – BA. Após coletadas, as amostras foram imediatamente identificadas e refrigeradas a -20°C até o momento das análises.

No laboratório de Toxicologia do Centro Tecnológico de Agropecuária da Bahia - CETAB, localizado em Salvador, as amostras foram distribuídas igualmente entre três *vials* de 20 ml. Cada recipiente com 20 mg de pelos foi devidamente lacrado com tampa de alumínio dotada de um septo de silicone. Os *vials* foram, individualmente, submetidos à temperatura de 90°C durante 40 minutos, para a extração de COVs, por MEFS, com a fibra PDMS/DVB. Após essa etapa, os COVs extraídos a partir de cada amostra submetida à MEFS e agora aderidos à fibra de extração, foram transportados na mesma até o injetor do cromatógrafo para as etapas de dessorção da fibra, separação e detecção dos compostos voláteis capturados pela mesma, como mencionado no item 4.3.1.

Os cromatogramas obtidos a partir de cada amostra testada foram gerados e analisados através do *software GC-MS solutions*. Os tempos de retenção (TR) e os valores de área de cada um dos picos obtidos nas análises foram registrados e organizados em uma planilha do Microsoft Excel 2010 (*Microsoft Office Home and Student 2010*) para serem posteriormente utilizados na identificação de cada possível composto indicado no cromatograma. Deste momento em diante é importante deixar claro que o TR representa o tempo durante o qual, a contar do início da “corrida” cromatográfica, o composto em questão permaneceu aderido à coluna cromatográfica. Em outras palavras, o TR indica o tempo, após iniciada a análise, no

qual o composto emergiu da coluna de cromatografia e detectado pelo detector do sistema CG-EM. A área do pico, por sua vez, é um valor adimensional que representa a abundância do composto dentro da amostra analisada, de modo que representa um valor relativo. Assim, para que as intensidades dos compostos pudessem ser comparadas os valores foram transformados em percentual relativo dentro de cada amostra.

4.4.2 Identificação dos COVs obtidos

A identificação dos COVs obtidos com a MEFS a partir das amostras de pelos coletados foi realizada em três etapas, como descrito a seguir.

4.4.2.1 Consulta a biblioteca NIST 08

A biblioteca NIST 08, versão lançada em 2008 pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos (*National Institute of Standard and Technology* – NIST), está disponível com o *software GC-MS solutions* e consiste em uma base de dados com milhares de compostos catalogados. Trata-se de uma ferramenta útil para guiar a identificação dos compostos obtidos experimentalmente na análise das amostras submetidas ao sistema CG-EM. Por meio de comparações dos espectros de massas apresentados na NIST 08 foi possível verificar quais são os compostos de maior grau de similaridade com aqueles presentes na amostra analisada.

Contudo, a presença de isômeros, bem como similaridade de estruturas e tipos de ligações químicas existentes, pode conduzir a uma identificação equivocada, ou não conclusiva, já que muitas vezes mais de um composto pode ser sugerido com o mesmo grau de similaridade na biblioteca. Assim, a biblioteca NIST 08, apenas, não garante a identificação dos COVs presentes nas amostras.

4.4.2.2 Cálculo dos Índices de Kovats (KI)

Como segunda etapa da identificação dos COVs presentes nas amostras analisadas, uma solução (1 µL) padrão de n-alcenos (C8-C40) (Sigma-Aldrich, USA) foi injetada diretamente no sistema CG-EM. Os tempos de retenção obtidos na análise dessa solução

foram utilizados no cálculo dos Índices de Kovats de cada composto encontrado nas amostras testadas, os quais foram, em seguida, comparados aos relatados na literatura, buscados através da base de dados do governo norte americano, PubChem - <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), para assim confirmar, ou não, o que foi sugerido na consulta à biblioteca NIST 08.

O KI é baseado na relação entre os TRs do composto analisado e dos alcanos encontrados imediatamente antes e imediatamente depois a esse composto, além de considerar o número de carbonos presente em cada alcano. O índice de Kovats (KI) foi calculado segundo a equação abaixo, onde $t'_{R(i)}$ é o TR ajustado do analito desconhecido (i), “n” corresponde ao número de carbonos do alcano de menor TR que está adjacente ao analito, enquanto “n+1” representa o alcano adjacente com maior TR (MÜHLEN, 2009):

$$KI = 100n + 100 \left(\frac{\log t'_{R(i)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right)$$

4.4.2.3 Injeção de padrões analíticos no sistema CG-EM

Para garantir maior número de compostos identificados e com o máximo de confiabilidade, foram injetados no sistema CG-MS, com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores de identificação, vinte e três padrões analíticos (TABELA 2), adquiridos junto à Sigma-Aldrich, USA, para obtenção dos respectivos TRs e, em seguida, comparação com os TRs dos analitos identificados.

Tabela 2 - Lista de padrões analíticos injetados diretamente no sistema CG-EM para identificação dos analitos encontrados nas amostras testadas

Lista dos compostos analíticos injetados no sistema CG-MS			
6-metil-5-hepten-2-ona	Verbenona	Octanal	Nonanal
Decanal	Undecanal	1-octanol	1-nonanol
1-dodecanol	1-tetradecanol	1-hexadecanol	1-octadecanol
Ácido nonanóico	Ácido tetradecanóico	Tetradecano	Pentadecano
Hexadecano	Heptadecano	Octadecano	Nonadecano
Eicosano	Fenilacetaldéido	Salicilato de 2-etilhexil	

4.5 AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O PERFIL DE COVs DOS VOLUNTÁRIOS E A CLASSIFICAÇÃO DOS MESMOS QUANTO À SOROLOGIA PARA SALIVA DE *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* E *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*

Os percentuais relativos registrados para os COVs identificados foram submetidos a análises exploratórias para avaliar se existe alguma associação entre o perfil de COVs dos indivíduos que participaram deste estudo e a sorologia anti-saliva de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*. Inicialmente, foi realizada uma Análise de Componentes Principais – PCA (do inglês *Principal Components Analysis*) a fim de buscar COVs que permitam o agrupamento dos indivíduos positivos e negativos. Tal análise é um método utilizado para múltiplas variáveis com o intuito de buscar combinações mais representativas dos dados através de combinações lineares mais convenientes para as análises dos dados e é um método bastante utilizado e bem aceito para análises químicas (NETO e MOITA, 1998; BRO e SMILDE, 2014).

Além das análises de PCA, foram realizadas análises de correlação de *Pearson* com os dados transformados para investigar quais compostos estão mais correlacionados com cada grupo sorológico. Análises de correlação de *Spearman* também foram aplicadas entre os COVs e a classificação sorológica dos indivíduos, com a ordem dos atributos definida por *hclust* para agrupar os COVs com base em suas distâncias de correlação, as quais foram visualizadas graficamente por *corrplot*. Nesta última análise, foram considerados apenas os COVs presentes em pelo menos 60% dos indivíduos. Esse limite foi definido devido ao fato de os mesmos testes realizados com 100% e 80% desses COVs não revelaram qualquer tipo de relação entre a classificação sorológica dos indivíduos e os COVs identificados. Análises de comparação de médias entre os grupos sorológicos foram realizadas com o test t de *student* para cada COV registrado, tanto composto a composto quanto pelos *clusters* formados.

As análises de PCA foram realizadas com distância euclidiana através do *software* Pirouette 4.5 InfoMetrix, os testes t de *student* ($p < 0,05$) com o programa *GraphPad Prism*, versão 5.0, 2007, San Diego CA (www.graphpad.com) e as correlações processadas no *software* R, licença livre, versão 3.2.3 (www.r-project.org).

4.6 LEVANTAMENTO DA LITERATURA SOBRE OS COVs IDENTIFICADOS E AS BACTÉRIAS EXISTENTES NA MICROBIOTA NORMAL DA PELE QUE SÃO CAPAZES DE PRODUZÍ-LOS

Para investigar se os COVs identificados odores da pele a partir de amostras de pelos dos participantes da pesquisa podem ser produzidos por bactérias comuns à pele humana, foi utilizada uma base de dados sobre COVs microbianos, denominada *Microbial Volatile Organic Compounds database – mVOC* (LEMFACK *et al.*, 2014), disponível na internet através do endereço <http://bioinformatics.charite.de/mvoc/>. A busca nessa base de dados pode ser feita de diversas maneiras, através de um ou mais parâmetros de busca, como, por exemplo, com o nome do composto buscado, seu peso molecular, fórmula molecular, identidade na base Pubchem /Pubchem ID, grupo químico e/ou organismos emissor (FIGURA 6).

As buscas foram conduzidas de modo que cada critério de pesquisa foi utilizado individualmente, a fim de garantir, quando não encontrado, que de fato o composto buscado não tem relatos de ser emitido por microrganismos. Além dessa base de dados, para reforçar o levantamento de literatura, foram utilizadas as ferramentas de busca Google Acadêmico – Google Scholar (<https://scholar.google.com.br>) e o PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), com as seguintes palavras-chaves (em português e em inglês): “nome do composto” (ex.: tetradecane ou tetradecano), bactéria (ou bacteria) pele humana (human skin). As bactérias relatadas como produtoras dos compostos encontrados na base de dados mVOC foram investigadas com o auxílio das ferramentas de pesquisa mencionadas acima para verificar se os microrganismos registrados são, de acordo com a literatura, componentes da microbiota da pele humana normal ou não. Para tal finalidade, foram utilizadas as seguintes palavras-chaves: “gênero/espécie da bactéria” + pele humana (ou human skin) + microbiota normal (normal microbiota).

A base de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) foi também consultada para confirmar informações a respeito dos compostos buscados, tais como pubchem ID, peso molecular, fórmula, outros nomes utilizados para o mesmo composto, entre outras informações. Dessa forma, foi tomado o máximo de cuidado durante essa investigação, para evitar quaisquer dúvidas no levantamento dessas informações.

bioinformatics.charite.de/mvoc/index.php?site=mvocsearch

Home search mVOC Signatures Pathways Add new mVOCs Statistics FAQ Contact

Search mVOCs

To search for mVOCs in the mVOC database you can use each search field and dropdown menu separately or you can combine them for a more specific mVOC search.

- Search for a specific mVOC by **Pubchem-ID**, **name** or **molecular formula**. It is also possible to enter a prefix or suffix of names like "ska" for "skatole". The same applies for molecular formula. By entering "C6", mVOCs containing 6 carbon atoms will be shown.
- Search for several mVOCs in a specific range of **molweight** or **logP**.
- To view mVOCs by species select a species from the **bacterial species** or **fungal species** dropdown menu.
- To view mVOCs by chemical group use the **Chemical classification** dropdown menu.
- To view a species' signature table chose a species from the **bacterial** or **fungal species** dropdown menu.
- Draw your own structure and perform a similarity or substructure search (**Structure Search**).
- Watch a short example **video** or go to the **FAQs**.

Pubchem-ID: e.g. 6736
 Name: e.g. Skatole
 Formula: e.g. C9H9N or C6
 Molweight: > < e.g. between > 100 and < 300
 logP: > < e.g. between > -1.5 and < 2
 Chemical Classification select e. g. Alkenes, Alcohols or Ketones
 Bacterial Species select
 Fungal Species select

Search

Figura 6 - Captura da tela de busca, com as diversas opções de critérios para a pesquisa, da base de dados de compostos orgânicos voláteis microbianos – mVOC.

4.7 AVALIAÇÃO, EM LABORATÓRIO, DA ATRAÇÃO DE *Lutzomyia* sp. PROVENIENTES DO CAMPO POR COVs PRESENTES NOS ODORES DA PELE DE MORADORES DA ÁREA DE ESTUDO

A atração de *Lutzomyia* sp. por COVs presentes nos odores da pele de moradores de área endêmica foi avaliada com base no comportamento de flebótomos, provenientes do campo, na presença desses compostos no interior de um túnel de vento, como será descrito a seguir. Esses testes foram realizados no Laboratório de Ecologia Química, vinculado ao Laboratório de Toxicologia, ambos localizados no CETAB, Salvador.

4.6.1 Obtenção e identificação dos flebótomos utilizados nos testes de atração

As capturas foram realizadas com armadilhas luminosas do tipo Hoover Puggedo (HP), durante três noites consecutivas, de 18h – 6h, em Corte de Pedra, a 280 km de Salvador, na localidade rural de “Toca da Onça” (13°32’S; 39°25’W), onde há relatos de grande densidade de flebótomos, com predominância das espécies *L.(N.) whitmani* e *L.(N.) intermedia*

(SANTOS *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2002; COSTA, 2005). Oitocentas e setenta fêmeas, capturadas em campo, foram utilizadas nos testes de atração em túnel de vento. Os testes foram iniciados no mesmo dia em que os flebótomos foram trazidos do campo e a cada teste novos insetos foram utilizados. Dessa forma, os insetos foram mantidos em laboratório até o momento de sua utilização. A manutenção dos mesmos em laboratório laboratoriais se deu por até no máximo oito dias e, apesar dos cuidados, foi possível perceber o aumento da mortalidade no decorrer desse período.

Após as coletas, os flebótomos capturados foram mantidos em gaiolas específicas, confeccionadas com armação de arame (aproximadamente 15 cm x 15 cm x 15 cm), envoltas por tecido *voil* branco (FIGURA 7), armazenadas em caixas de isopor com chumaços de algodão embebidos em água, trocados diariamente, para manutenção da umidade (aproximadamente 80% u.r.) e com refrigeração do ambiente para manutenção da temperatura (mantida em torno de 26°C). Essas condições foram estabelecidas imediatamente após as capturas e mantidas até o momento dos experimentos em laboratório. A alimentação foi ofertada de modo contínuo até o momento dos testes, com oferta de solução 50% v/v de sacarose (solução filtrada de água com açúcar comum) através de finas tiras de algodão, renovadas diariamente, colocadas na face superior de cada gaiola.

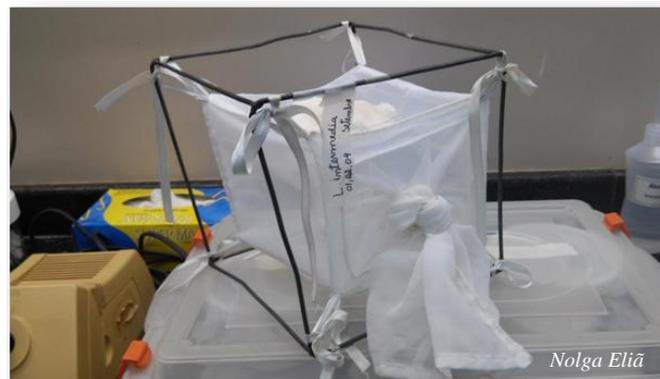


Figura 7 - Gaiola de insetário, confeccionada com arame e tecido *voil*, utilizada para o acondicionamento dos flebótomos até o momento da realização dos testes (Foto: Nolga Eliã).

Fêmeas de flebótomos capturados em campo foram separadas em grupos de três indivíduos, os quais foram colocados em cubos de acrílico transparente - câmara de liberação (6 cm x 6 cm x 6 cm) com umas das faces móvel, e deixados durante vinte minutos em uma câmara de aclimação, na qual os insetos ficaram no escuro e sem oferta de alimento. Após esse período, cada grupo foi submetido ao teste de atração em túnel de vento.

Após cada réplica o grupo de insetos ($n=3/\text{tubo}$) testados no túnel de vento foi imediatamente colocado em tubo de vidro com tampa, devidamente identificado, contendo álcool 70% e um chumaço de algodão (FIGURA 8), para evitar que choques mecânicos destruíssem as estruturas morfológicas desses insetos, de modo a preservá-los para posterior identificação da espécie. Uma amostra equivalente a 37,5% do total de flebótomos armazenados foi identificada para representar a composição da população testada.



Figura 8 - (A) Tubos de vidro com tampa, contendo álcool 70% e algodão para preservação dos flebótomos utilizados nos experimentos em túnel de vento; (B) Detalhe da base do tubo contendo três fêmeas de *Lutzomyia* sp.

4.7.1.1 Identificação dos flebótomos utilizados nos testes de atração em túnel de vento

Os procedimentos que serão descritos nesta seção foram baseados nos métodos descritos no trabalho de Damasceno (2007).

Os flebótomos armazenados em álcool 70% após os testes de atração em túnel de vento foram submetidos, em primeiro lugar, a um processo de clarificação para facilitar a visualização de suas estruturas morfológicas. Para a realização desse procedimento, todo o álcool contido nos tubos de armazenamento foi retirado para a adição de hidróxido de potássio 10%, o qual foi mantido durante seis horas para promover o clareamento da cutícula externa dos espécimes. Decorrido esse período, o hidróxido de potássio foi retirado e adicionado ácido acético 10%, o qual foi mantido nos tubos com os flebótomos durante 20 minutos para neutralizar os efeitos do hidróxido de sódio. Após essa etapa, os flebótomos foram submetidos a três séries de água destilada, cada série com 15 minutos de duração. Por fim, foi adicionado o lactofenol como fluido de montagem para as lâminas.

Cada flebótomo foi posicionado em uma lâmina de vidro, com uma gota de Berlese (fixador), com as patas voltadas para baixo e as asas voltadas para cima. Com auxílio de

estilete entomológico e lupa foi realizado, em cada espécime, um corte na junção cabeça-tórax e outro na junção tórax-abdômen, de modo que o primeiro corte foi feito para facilitar a visualização do cibário e da faringe e o segundo para facilitar a visualização da espermateca. Por fim, a lamínula foi posicionada sobre o flebótomo para então a lâmina ser analisada ao microscópio óptico, para reconhecimento da espécie com base na chave de identificação proposta por Young e Duncan (1994).

4.6.2 Túnel de vento – protocolo de experimentação

Experimentos em túnel de vento foram realizados com sucesso para avaliar a atração de flebotomíneos, provenientes tanto do campo quanto de criações em laboratório, por determinados compostos orgânicos voláteis (PINTO *et al.*, 2012; MAGALHÃES-JÚNIOR *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2015). Nesse trabalho, para avaliar o comportamento de fêmeas de *Lutzomyia* sp., foi utilizado um túnel de vento construído com acrílico transparente, dotado de portas laterais corredeiras, sistema de exaustão, controle de luminosidade com simulação da luz do dia, luz crepuscular e luz noturna, controle de fluxo de ar e sensor termo higrômetro para monitoramento das condições internas de temperatura e de umidade relativa do ar (FIGURA 9).

Os experimentos em túnel de vento descritos a seguir foram baseados nos métodos propostos por Magalhães-Júnior e colaboradores (2014). Antes de cada teste, o túnel foi previamente limpo com hexano e o fluxo de ar mantido ligado para retirada de quaisquer resquícios de odores. Para cada COV testado foram realizadas, pelo menos, dez réplicas, com três flebótomos cada.

A cada réplica, uma câmara de liberação, com o grupo de flebótomos já aclimatados (20 minutos em jejum e no escuro), foi encaixada em uma plataforma (altura = 25 cm) na extremidade oposta ao fluxo de ar, posicionada em frente a uma das aberturas de um mini túnel (comprimento = 120 cm; altura = 15 cm; largura = 15 cm), confeccionado em tecido *voil*, adaptado ao túnel de vento para facilitar a visualização do comportamento dos flebótomos e facilitar também a recaptura dos mesmos. Outra plataforma, de mesma altura, foi posicionada na extremidade oposta do mini túnel, próxima a fonte do fluxo de ar. Nessa plataforma foi colocado um papel filtro (4 cm x 4 cm), preso a um suporte, embebido com 200 µL do COV testado (FIGURA 9).

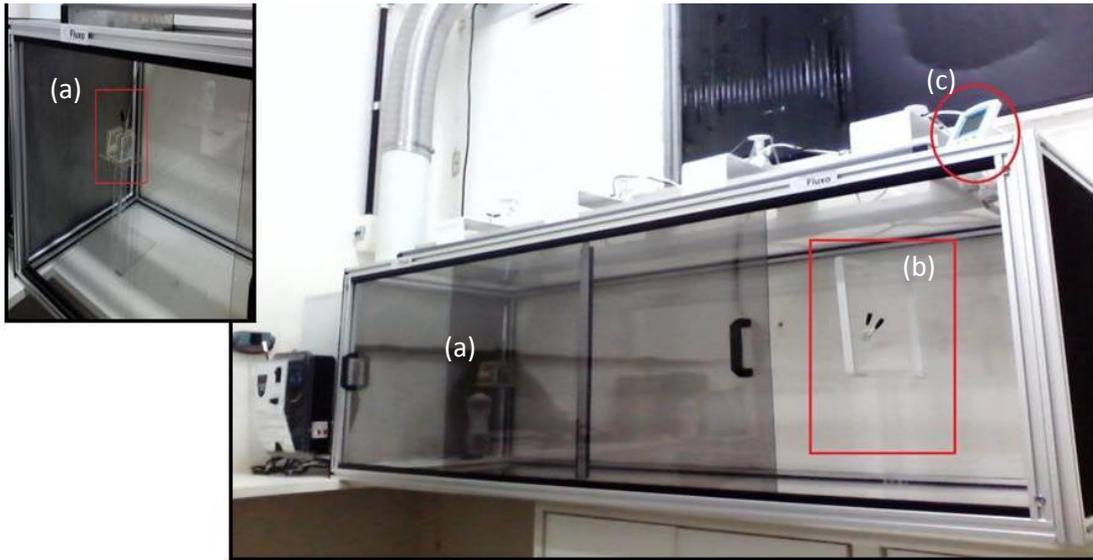


Figura 9- Túnel de vento utilizado nos teste de atração em laboratório. (a) Plataforma com câmera de liberação encaixada; (b) plataforma com suporte para o papel filtro; (c) termo higrometro com sensor exposto no interior do túnel. Fonte: a autora.

Todos os testes foram realizados entre 9h e 19h (por conveniência do pesquisador), com luz vermelha (única fonte de luz ligada durante o experimento) (FIGURA 10), fluxo de ar de 3.06 cm/s, temperatura entre 24 – 26°C e umidade relativa do ar entre 65 – 80%. Os experimentos consistiram em observações de dois minutos, para cada réplica, durante os quais foi registrado o número de flebótomos ativados (saíram da câmera de liberação, mas não ultrapassaram o primeiro terço do mini túnel) e atraídos (ultrapassaram o primeiro terço do mini túnel, em direção a fonte do odor). Para validar o sistema, foram testados, inicialmente, o hexano e o octenol como controles negativo e positivo, respectivamente (PINTO *et al.*, 2012; MAGALHÃES-JÚNIOR *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2015).

Apesar de ser realizada a limpeza completa do sistema após cada experimento, foi estabelecido o limite diário de três compostos testados por dia, além do controle negativo, a fim de evitar interferências entre as baterias de testes. Por ser o controle negativo, o hexano foi sempre o primeiro COV testado antes de cada experimento.



Figura 10 - Condição de iluminação durante os testes no túnel de vento. Apenas a luz vermelha do túnel ligada. A seta preta indica a direção do fluxo de ar. Fonte: a autora.

4.7.2 COVs utilizados nos testes de atração

Dentre os COVs identificados a partir das amostras de pelos dos indivíduos de Corte de Pedra – BA, doze compostos, além dos controles (negativo; hexano e positivo: octenol) estavam disponíveis para serem utilizados nos testes de atração. (todos adquiridos junto a Sigma-Aldrich, com no mínimo 90% de pureza) Quando líquidos tais compostos foram utilizados puros e quando sólidos, foram dissolvidos em hexano a concentrações de 10% e 100%, com base no cálculo de concentração comum (g/mL).

Para definir quais compostos seriam testados a cada dia, e a ordem, foi realizado um sorteio para que tal definição fosse feita de forma randômica e, assim, os compostos pudessem ser avaliados sem qualquer tendência de análise. Os compostos incluídos nesse sorteio estão apresentados na TABELA 3.

Tabela 3 – Lista dos compostos orgânicos voláteis (COVs) que foram testados no túnel de vento. *Foram incluídos nas concentrações de 10 e de 100%. Em itálico, os COVs utilizados como controle.

Listas de compostos orgânicos voláteis utilizados nos testes de atração			
6-metil-5-hepten-2-ona	Fenilacetaldéido	(1S)-(-) Verbenona)	Ácido nonanóico
Tetradecano	Hexadecano	Nonadecano	Eicosano*
1-octanol	1-nonanol	1-decanol	1-dodecanol*
<i>Octenol</i>	<i>Hexano</i>		

4.6.4 Análises estatísticas

Para avaliar as proporções de ativação e de atração de cada composto testado foi aplicado o teste exato de Fisher (teste F), por ser o teste mais robusto recomendado para tabelas de contingência 2 x 2 (MOTULSKY, 2007). Os percentuais totais de flébotomos ativados em diferentes intervalos de tempo foram analisados em comparação com o controle positivo, octenol, através de análises de variância bifatorial (ANOVA dois fatores). Esses dados foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias. As análises foram realizadas com o *software GraphPad Prism*, versão 5.0, 2007, San Diego CA (www.graphpad.com).

4.8 ANÁLISES DOS DADOS

Os métodos aplicados nas análises dos dados obtidos nesse trabalho foram descritos em suas respectivas seções, apresentadas acima.

5 RESULTADOS

5.1 ÁREA DE ESTUDO – ACESSO ÀS RESIDÊNCIAS DOS VOLUNTÁRIOS

Para a realização desse estudo foram percorridos 700 km, entre rodovias e estradas de terra, nas proximidades da localidade de Corte de Pedra, Bahia. No total, foram visitadas vinte e uma residências, onde foi coletado o material dos trinta e cinco voluntários que participaram dessa pesquisa. A maior parte das residências visitadas estava localizada na zona rural da área de estudo, muitas vezes com acesso difícil por meio de terrenos acidentados e eventualmente escorregadios em decorrência de chuvas (FIGURA 11).



Figura 11 - Imagens características da área de estudo. (A) Estrada de terra, característica frequente dos caminhos percorridos durante as coletas em campo; (B) Uma das residências visitadas, localizada na zona rural da área de estudo. Fonte: Diva Tavares.

5.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PARTICIPANTES QUANTO À RESPOSTA IMUNE HUMORAL PARA SALIVA DE *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* E *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*

De acordo com os resultados dos testes ELISA, 15 indivíduos apresentaram resposta sorológica anti-saliva negativa tanto para saliva de *L. (N.) intermedia* quanto para saliva de *L. (N.) whitmani*, enquanto 18 apresentaram resposta sorológica anti-saliva positiva para ambas as espécies de flebotomos.

5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE COLETA, EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) PRESENTES EM ODORES DA PELE HUMANA

5.3.1 Teste Piloto

Foram obtidos cerca de 90 COVs nas análises de MEFS-HS/CG-EM das amostras testadas de pelos humanos, dentre os quais, de acordo com a biblioteca NIST 08, foram detectados os cinco marcadores de qualidade buscados: 6-metil-5-hepten-2-ona, octanal, nonanal, decanal e geranylacetona (FIGURA 12).

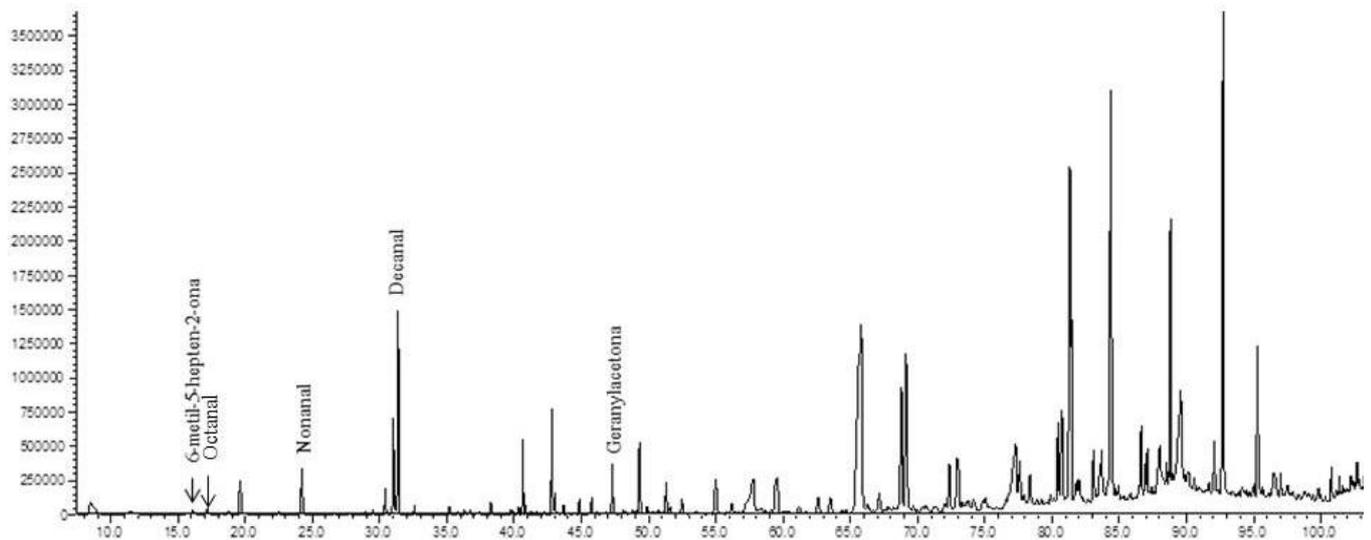


Figura 12 - Cromatograma com indicação dos picos, em seus respectivos tempos de retenção, correspondentes aos cinco compostos definidos como marcadores de qualidade: 6-metil-5-hepten-2-ona, nonanal, decanal e geranylacetona.

Com base nesses resultados, foram realizados testes para padronizar os parâmetros envolvidos nas técnicas aplicadas e, assim, aperfeiçoar o método, cujos resultados estão apresentados a seguir.

5.3.2 Padronização do método de MEFS-HS/CG-EM com pelos humanos

5.3.2.1 Escolha da fibra de extração

A fibra PDMS/DVB foi a que apresentou melhor desempenho, tanto em relação ao número de picos obtidos nos cromatogramas quanto em relação à área total dos mesmos, seguida da CAR/PDMS (FIGURA 13). Com base nesses resultados, a fibra PDMS/DVB foi escolhida como padrão para extração de COVs de pelos humanos através da técnica de SPME-HS.

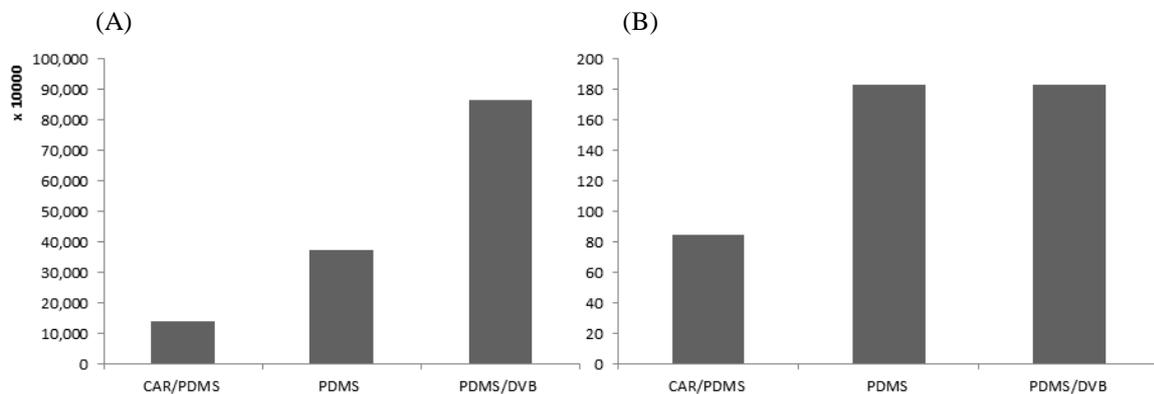


Figura 13 - Área total média (A) e número de picos totais (B) obtidos nos testes de realizados com cada fibra.

5.3.2.2 Escolha da temperatura de extração

O número de picos obtidos com as diferentes temperaturas testadas variou entre 79 e 200 e esse valor foi diretamente proporcional ao aumento de temperatura. Os maiores valores foram verificados a 70°C, 80°C e 90°C (n = 200). Dessa forma, a área total/intensidade dos picos foi o fator determinante para a definição desse parâmetro. Da mesma forma que foi observada para o número de picos, a intensidade dos mesmos foi também diretamente proporcional ao aumento da temperatura e, assim, o maior rendimento encontrado foi a 90°C (FIGURA 14).

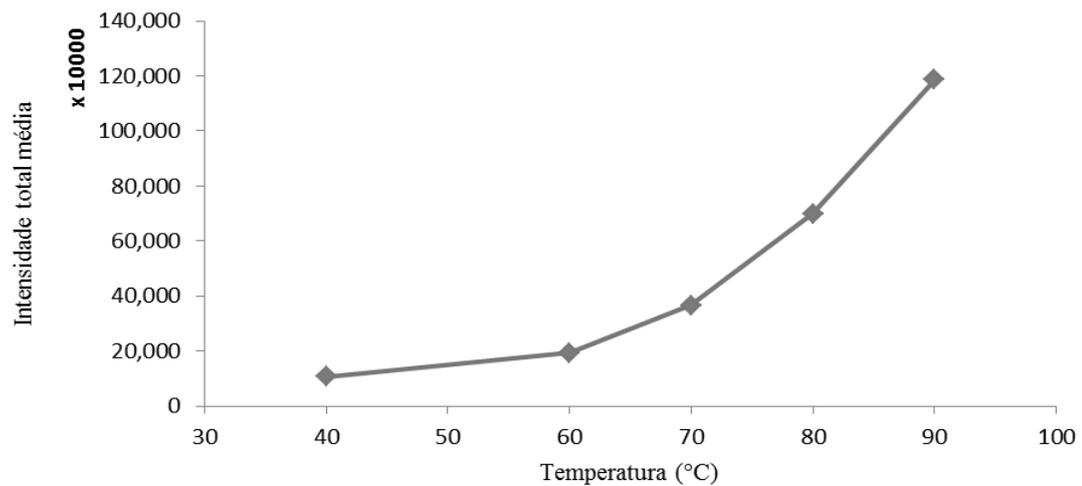


Figura 14 - Variação da intensidade dos picos obtidos nas análises de CG-MS em relação a diferentes temperaturas a partir de amostras de voláteis extraídos de pelos humanos com a técnica de MEFS-HS.

5.3.3.3 Escolha do tempo de extração

O tempo de extração não teve grande influência em relação ao número de picos obtidos durante as análises, porém, demonstrou ter influência direta no aumento da intensidade dos compostos extraídos das amostras de pelos humanos. Os melhores rendimentos foram obtidos com 40 e 50 minutos de extração, com resultados bastante similares (FIGURA 15). Contudo, quanto menor for o tempo investido nessa etapa, mais rapidamente as amostras podem ser processadas e, por tal razão, o tempo de 40 minutos foi definido como padrão para extração de compostos voláteis a partir de amostras de pelos humanos.

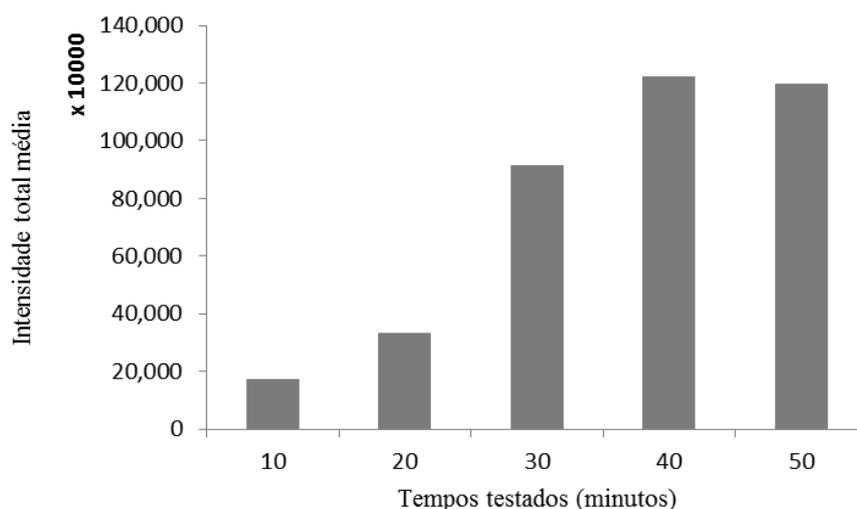


Figura 15 - Variação da intensidade dos picos obtidos nas análises de CG-MS em relação a diferentes tempos de extração a partir de amostras de voláteis extraídos de pelos humanos com a técnica de MEFS-HS.

5.3.3.4 Escolha da quantidade (mg) de pelos por amostras

Dentre as massas de pelos avaliadas, observou-se que a intensidade total dos picos foi diretamente proporcional à quantidade de pelos, de modo que os maiores valores foram obtidos com 200 mg. No entanto, o número médio de picos foi o mesmo para todas as quantidades testadas ($n = 150$). Para que a coleta fosse o mais rápido e o menos invasiva possível, além de considerar a possibilidade de que a disponibilidade de pelos poderia ser um fator limitante em alguns indivíduos, optou-se por adotar a menor quantidade de pelos avaliada ($m = 20$ mg), já que essa quantidade seria utilizada para todos os indivíduos, de modo não traria quaisquer prejuízos nas análises químicas dessas amostras.

5.3.3 Coleta e análise dos COVs que compõe os odores da pele de moradores de Corte de Pedra – Bahia

Foram coletadas amostras de pelos de trinta e três indivíduos (15 soronegativos e 18 soropositivos), os quais foram submetidos ao processo de MEFS-HS para extração de COVs. Com as análises dos cromatogramas gerados a partir da CG-EM foram detectados, em média, 150 picos por indivíduo. A intensidade total média dos mesmos foi similar em ambos os grupos ($P=0.230$; $t = 1.224$; $df = 32$) (FIGURA 16).

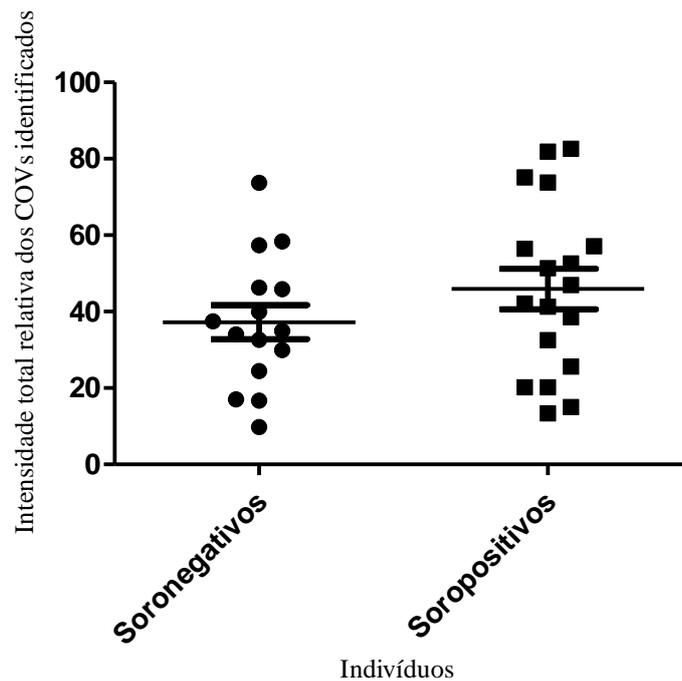


Figura 16 - Intensidade total relativa dos compostos orgânicos voláteis - COVs detectados entre indivíduos com sorologia negativa (soronegativos) e indivíduos com sorologia positiva (soropositivos) para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*.

Do total de compostos detectados nas análises cromatográficas foram identificados 42 COVs através de análises comparativas com dados da biblioteca NIST 08 e dos índices Kovats. Vinte e três desses compostos tiveram suas identidades testadas e confirmadas com a comparação do tempo de retenção experimental com o tempo de retenção do seu respectivo padrão analítico sintético (TABELA 4).

Tabela 4 - Compostos orgânicos voláteis identificados, em ordem crescente de tempo de retenção (TR), e seus respectivos índices de Kovats (IK). CPAS = confirmação com padrão analítico sintético.

Composto	TR (min)	Nome	Grupo funcional	IK _{experimental}	IK _{literatura}	CPAS
1	16.10	6-metil-5-hepten-2-ona	Cetona	966	966	X
2	17.15	Octanal	Aldeído	981	981	X
3	18.68	Fenilacetaldéido	Aldeído	1002	1002	X
4	22.42	1-octanol	Álcool	1059	1059	X
5	23.74	6-metil-3,5-heptadien-2-ona	Cetona	1076	1077	
6	24.21	Nonanal	Aldeído	1084	1083	X
7	27.00	Cis-verbenol	Álcool	1123	1123	
8	27.76	2-nonenal	Aldeído	1133	1134	
9	29.50	1-nonanol	Álcool	1158	1157	X
10	30.42	Verbenona	Cetona	1170	1170	X
11	31.36	Decanal	Aldeído	1184	1184	X
12	34.85	2-decenal	Aldeído	1236	1236	
13	36.91	Ácido nonanóico	Ácido carboxílico	1268	1268	X
14	38.25	Undecanal	Aldeído	1286	1286	X
15	41.63	2-undecenal	Aldeído	1338	1338	
16	44.84	Dodecanal	Aldeído	1387	1387	
17	45.75	Tetradecano	Hidrocarboneto	1400	1400	X
18	46.94	Gamma decalactona	Éster	1414	1414	
19	47.19	Metilparabeno	Éster	1419	1419	
20	47.30	Geranilacetona	Cetona	1426	1424	
21	48.10	Dodecen-1-al	Aldeído	1439	1439	
22	49.32	1-dodecanol	Álcool	1456	1455	X
23	51.47	Tridecanal	Aldeído	1486	1486	
24	52.44	Pentadecano	Hidrocarboneto	1500	1499	X
25	55.97	(E)-2-tridecenal	Aldeído	1541	1537	
26	51.47	Ácido dodecanóico	Ácido carboxílico	1554	1554	
27	61.17	Tetradecanal	Aldeído	1588	1588	
28	62.55	Hexadecano	Hidrocarboneto	1600	1601	X
29	69.09	1-tetradecanol	Álcool	1664	1665	X
30	72.02	Pentadecanal	Aldeído	1693	1693	
31	72.90	Heptadecano	Hidrocarboneto	1700	1701	X
32	77.57	Ácido tetradecanóico	Ácido carboxílico	1763	1764	X
33	78.32	2-etil-hexil salicilato	Éster	1769	1764	X
34	79.20	2-fenil dodecano	Hidrocarboneto	1791	1791	
35	80.41	Octadecano	Hidrocarboneto	1800	1801	X
36	83.64	Ácido pentadecanóico	Ácido carboxílico	1858	1854	
37	84.31	1-hexadecanol	Álcool	1866	1865	X
38	86.59	Nonadecano	Hidrocarboneto	1900	1901	X
39	89.56	Ácido hexadecanóico	Ácido carboxílico	1957	1956	
40	92.03	Eicosano	Hidrocarboneto	2000	2001	X
41	92.62	Palmitato de isopropila	Éster	2013	2013	
42	95.26	1-octadecanol	Álcool	2067	2067	X

Os compostos identificados são pertencentes à, basicamente, seis funções orgânicas: Álcool, Aldeído, Ácido carboxílico, Cetona, Éster e Hidrocarboneto. Em relação ao número de compostos, o maior percentual relativo foi de aldeídos (33.33%; N = 14), seguido de hidrocarbonetos (19.05%; N = 8) e álcoois (16.66%; N = 7) (FIGURA 17). Quanto ao percentual da intensidade total de cada função orgânica, os álcoois foram os compostos mais abundantes (43.24%) (FIGURA 18).

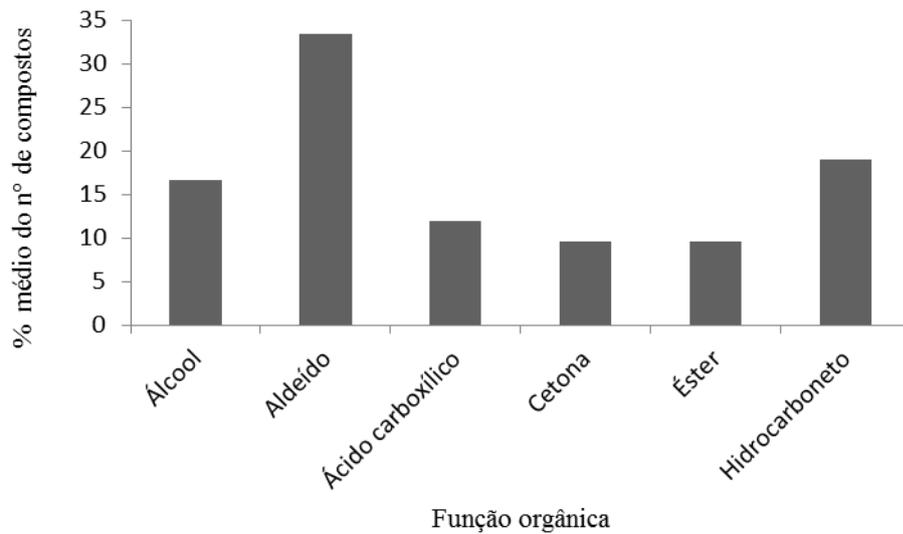


Figura 17 - Percentual médio do número de compostos pertencentes a cada uma das funções orgânicas encontradas entre os COVs dos indivíduos avaliados.

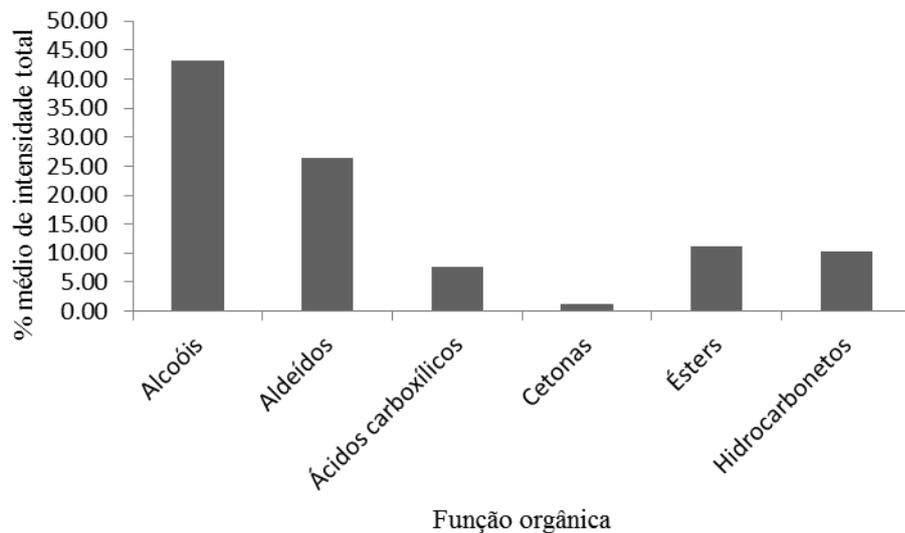


Figura 18 - Percentual médio da intensidade total das funções orgânicas encontradas entre os COVs dos indivíduos avaliados.

Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos soronegativos e soropositivos em relação ao percentual da intensidade total de cada função orgânica encontrada ($P = 0.997$; $t = 0.002$; $df = 5$) (FIGURA 19).

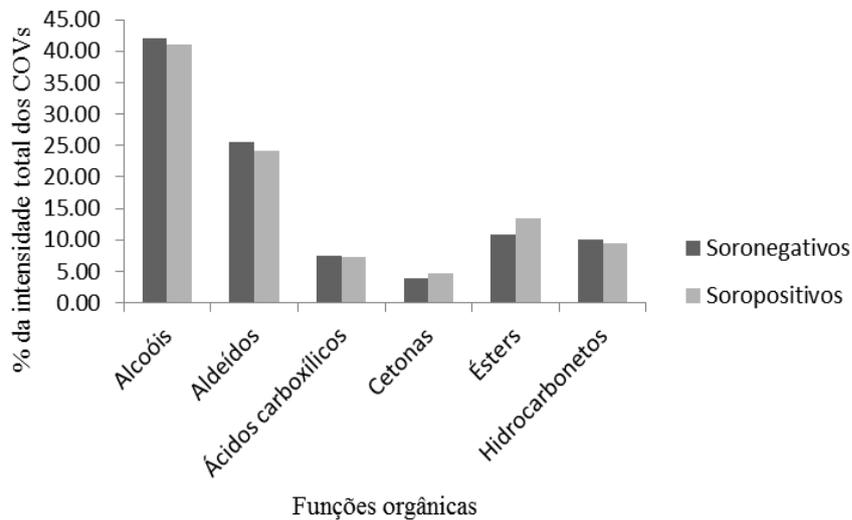


Figura 19 - Percentual da intensidade total de compostos orgânicos voláteis pertencentes às suas respectivas funções químicas.

5.4 EXISTÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O PERFIL DE COVs DOS VOLUNTÁRIOS E A CLASSIFICAÇÃO DOS MESMOS QUANTO À SOROLOGIA PARA SALIVA DE *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* E *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*

A análise de componentes principais (PCA) realizada com todos os indivíduos, com inclusão de todos os 42 compostos identificados, não revelou qualquer distinção entre os grupos de indivíduos avaliados (FIGURA 20). Assim, com base nessas análises não foi possível encontrar compostos, ou grupos de compostos capazes de agrupar indivíduos de sorologia negativa e indivíduos de sorologia positiva para resposta anti-saliva de *Lutzomyia* spp. A FIGURA 21 ilustra a variedade da composição de COVs presentes nos odores da pele, extraídos a partir das amostras de pelos, dessas pessoas.

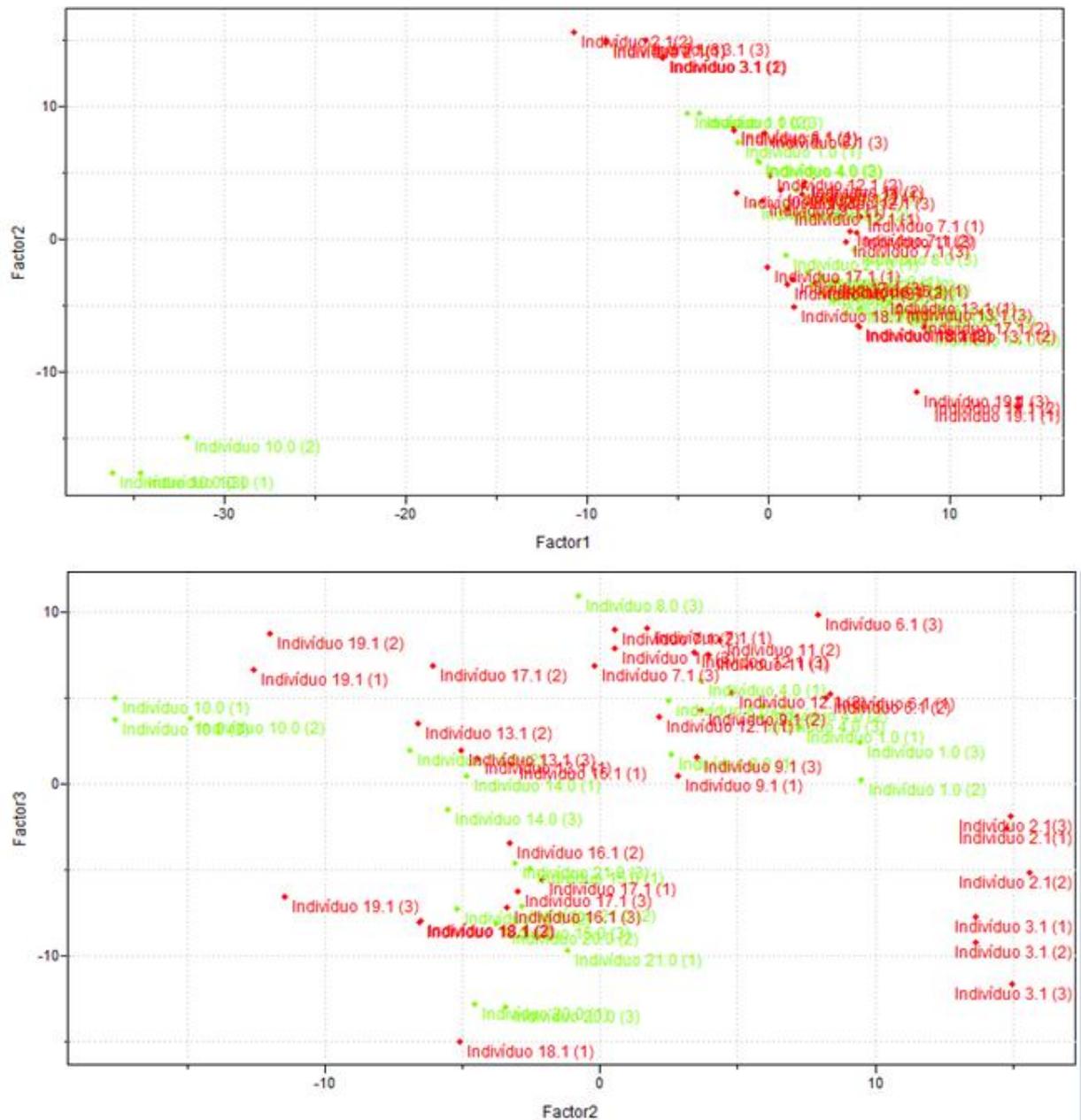


Figura 20 - Análises de componentes principais (PCA) com base no total de indivíduos e nos COVs identificados. Em vermelho estão representados os indivíduos positivos para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* e em verde os indivíduos negativos.

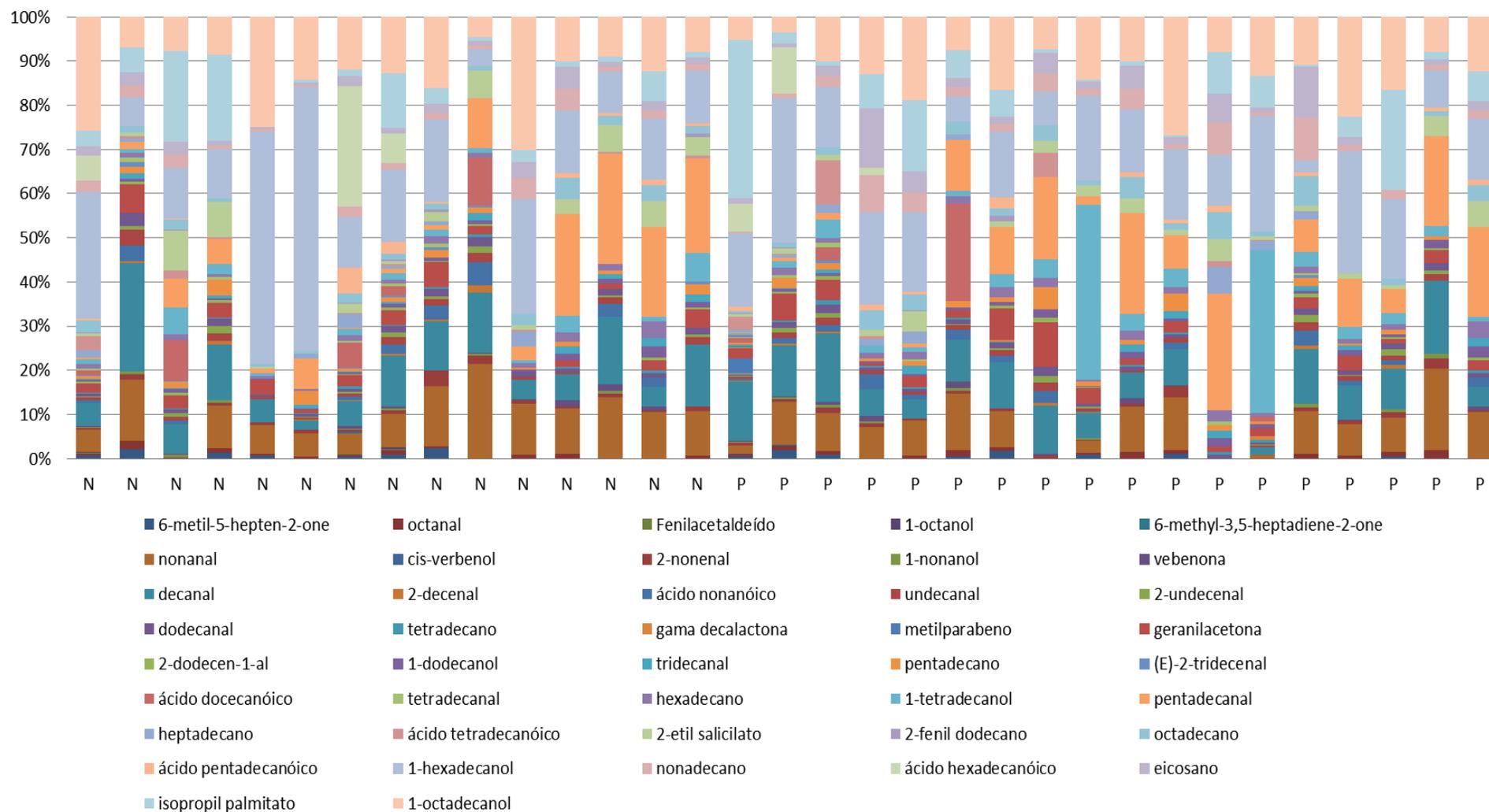


Figura 21 - Percentuais relativos dos compostos orgânicos voláteis - COVs identificados nos odores da pele dos participantes do estudo com as análises de SPME-HS/CG-EM realizadas com amostras de pelos. N = indivíduo com sorologia negativa para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, P = indivíduos com sorologia positiva para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*

Apesar de não ter sido detectado um perfil de odores característico para cada grupo sorológico avaliado, foi observado correlações positivas entre alguns COVs dentro de cada um desses grupos quando analisados separadamente (FIGURAS 22 e 23).

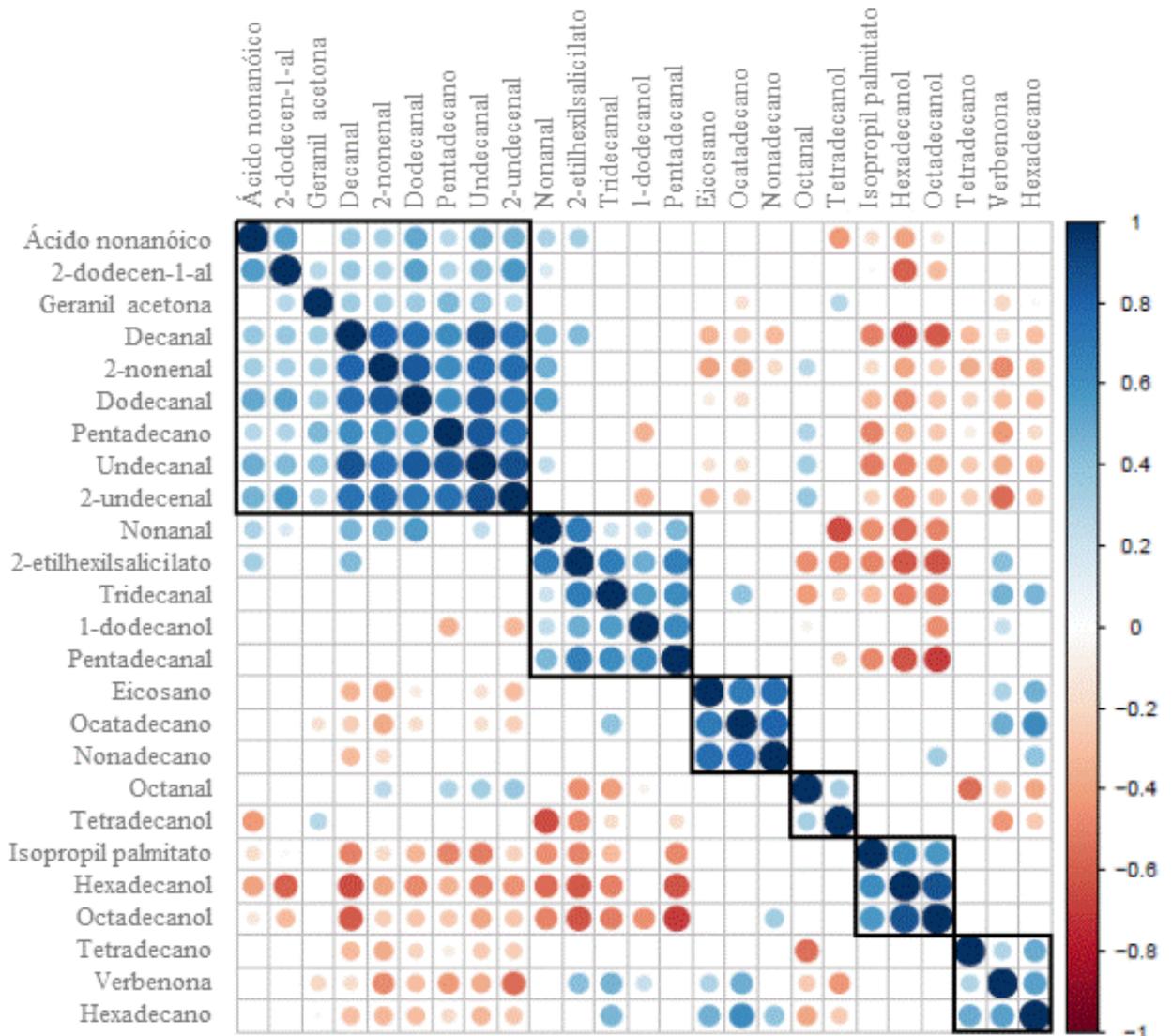


Figura 22 - Correlação entre os compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nos odores da pele dos indivíduos com sorologia negativa para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*. Representação gráfica por corrplot das correlações de Spearman observadas entre os COVs identificados nos indivíduos negativos para o teste sorológico anti-saliva de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*. O aumento da intensidade da cor azul indica aumento da correlação positiva, enquanto o aumento da intensidade da cor vermelha indica o aumento da correlação negativa. Os quadrados delimitados indicam grupos formados por COVs correlacionados.

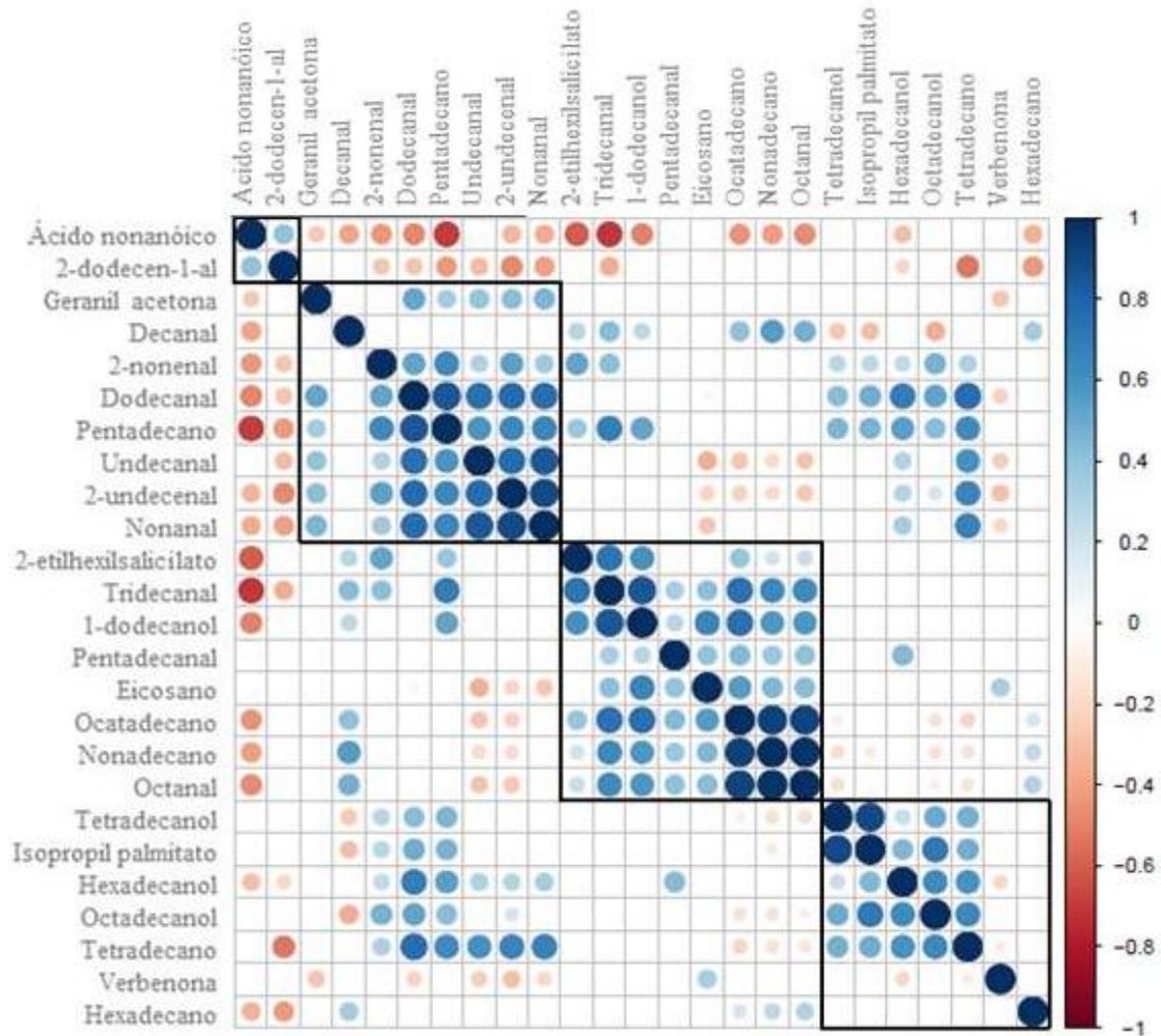


Figura 23 – Correlação entre os compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nos odores da pele dos indivíduos com sorologia positiva para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e para saliva de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*. Representação gráfica por corrplot das correlações de Spearman observadas entre os COVs identificados nos indivíduos positivos para o teste sorológico anti-saliva de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*. O aumento da intensidade da cor azul indica aumento da correlação positiva, enquanto o aumento da intensidade da cor vermelha indica o aumento da correlação negativa. Os quadrados delimitados indicam grupos formados por COVs correlacionados.

Com base nas análises de correlação apresentadas acima, foi possível perceber que entre os indivíduos soronegativos existem seis grupos de COVs que se correlacionam positivamente. No grupo de indivíduos soropositivos, por sua vez, foram observados quatro grupos de COVs que se correlacionam positivamente. Em outras palavras, dentro de cada agrupamento, ou *cluster*, encontrado nessas análises, estão COVs que se correlacionam diretamente entre si, de modo que quando um aumenta em abundância todos os outros do mesmo grupo aumentam em conjunto. Da mesma forma, quando um diminui, todos os outros

do mesmo agrupamento também diminuem. Os grupos formados nas análises de “corrplot” estão destacados na TABELA 5 a seguir.

Tabela 5 – Grupos obtidos dos compostos orgânicos voláteis correlacionados a partir das análises de corrplot.

Grupos de COVs correlacionados dentro de cada grupo	Classificação sorológica anti-saliva de <i>Lutzomyia</i> (<i>Nyssomyia</i>) <i>intermedia</i> e <i>Lutzomyia</i> (<i>Nyssomyia</i>) <i>whitmani</i>	
	Soronegativos	Soropositivos
Grupo 1	Ácido nonanóico, 2-dodecen-1-al, geranil acetona, decanal, 2-nonenal, dodecanal, pentadecano, undecanal, 2-undecenal	Ácido nonanóico, 2-dodecen-1-al
Grupo 2	Nonanal, 2-etilhexilsalicilato, tridecanal, 1-dodecanol, pentadecanal.	Geranilacetona, decanal, 2-nonenal, dodecanal, pentadecano, undecanal, 2-undecenal, nonanal
Grupo 3	Eicosano, octadecano, nonadecano	2-etilhexilsalicilato, tridecanal, 1-dodecanol, pentadecanal, eicosano, octadecano, nonadecano, octanal
Grupo 4	Octanal, tetradecanol	Tetradecanol, isopropil palmitato, hexadecanol, octadecanol, tetradecano, verbenona, hexadecano
Grupo 5	Isopropil palmitato, hexadecanol, octadecanol	-
Grupo 6	Tetradecano, verbenona, hexadecano	-

A partir desses grupos de COVs correlacionados foram realizados testes t de *student* para avaliar se o somatório das intensidades relativas dos COVs componentes de cada *cluster* formado dentro de cada grupo sorológico, ou seja, difere quando seus valores são comparados entre indivíduos soronegativos e soropositivos. Nessas análises foi detectada diferença entre indivíduos soronegativos e soropositivos apenas em relação ao grupo 2 dos soronegativos ($P = 0,0471$; $t = 2,067$; $df = 31$), de modo que o somatório dos COVs desse grupo mostrou ser mais abundante entre os indivíduos soronegativos do que entre os indivíduos soropositivos. Além disso, verificou-se com análises de correlação de Pearson dos dados transformados que quatro COVs apresentaram correlações positivas maiores no grupo de indivíduos

soropositivos do que nos indivíduos soronegativos: dodecanol ($p < 0,01$), tetradecanol ($p < 0,001$), isopropil palmitato ($p < 0,01$) e tetradecano ($p < 0,05$).

5.5 BACTÉRIAS COMUNS À PELE HUMANA QUE PRODUZEM OS COVs IDENTIFICADOS NOS ODORES DA PELE DOS VOLUNTÁRIOS

A busca na literatura de espécies ou gêneros bacterianos capazes de produzir os compostos orgânicos voláteis identificados neste trabalho revelou dez gêneros bacterianos, os quais estão distribuídos entre quatro filos: Actinobacteria (*Actinomyces* spp., *Streptomyces* sp.), Bacteroidetes (*Prevotella* sp.), Firmicutes (*Bacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Staphylococcus* sp.) e Proteobacteria (*Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Stenotrophomonas* sp.).

De acordo com a base de dados mVOC database, 73,80% dos 42 compostos identificados nesse trabalho são produzidos por bactérias, onde 52,38% desse valor representa COVs que são produzidos por pelo menos uma espécie bacteriana já relatada como comum à pele humana e 21,42% são relatados como produtos de bactérias não relacionadas, de acordo com a literatura atual, com a microbiota da pele humana, mas sim com outras regiões do corpo, como mucosa oral e vaginal, ou provenientes de outras fontes, sobretudo ambientais, tais como solo e água, por exemplo. Por não serem descritas como espécies comuns à pele humana, essas bactérias não estão apresentadas nesse trabalho. Por fim, 26,19% dos 42 compostos investigados não possuem, até o presente momento, qualquer relato sobre bactérias capazes de produzi-los. Os dados desse levantamento estão apresentados na TABELA 6.

Tabela 6 - Lista dos 42 COVs identificados nos odores da pele dos voluntários e os gêneros/espécies bacterianas descritas na literatura como existentes na pele humana e produtoras dos respectivos compostos. NR = bactérias não relatadas como presentes na pele humana

Função Orgânica	COV	Bactérias produtoras (PPH)	Função Orgânica	COV	Bactérias produtoras (PPH)		
Ácidos (Ác.) carboxílicos	Ác. nonanóico	<i>Leuconostoc</i> sp.	Aldeídos	(E)-2-tridecenal	-		
	Ác. tetradecanóico	<i>Prevottela</i> sp.; <i>Pseudomonas</i> spp.		Tetradecanal	NR		
	Ác. pentadecanóico	NR		Pentadecanal	-		
	Ác. hexadecanóico	<i>Prevottela</i> sp.		Fenilacetaldéido	<i>Staphylococcus</i> spp.; <i>Serratia</i> sp.; <i>Stenotrophomonas</i> spp.; <i>Bacillus</i> spp.		
Álcoois	Ác. dodecanóico	<i>Serratia</i> sp.	Cetonas	Geranilacetona	NR		
	1-octanol	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Serratia</i> sp.; <i>Staphylococcus aureus</i> .		6-metil-5-hepten-2-ona	<i>Actinomycetes</i> sp.; <i>Streptomyces</i> sp.		
	1-nonanol	NR		6-metil-3,5-heptadien-2-ona	-		
	1-dodecanol	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Staphylococcus aureus</i>		Verbenona	-		
	1-tetradecanol	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Staphylococcus aureus</i>		Ésteres	2-etil-hexil salicilato	-	
	1-hexadecanol	<i>Bacillus subtilis</i> ;			Palmitato de isopropila	-	
	1-octadecanol	-			Gamma decalactona	NR	
	Cis-verbenol	-			Metilparabeno	NR	
	Aldeídos	Octanal		NR	Hidrocarbonetos	Tetradecano	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Serratia</i> spp.
		Nonanal		<i>Pseudomonas</i> spp.		Pentadecano	<i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Serratia</i> spp.
Decanal		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ;	Hexadecano	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; <i>Serratia</i> spp.; <i>Straptomyces</i> spp.			
2-nonenal		-	Heptadecano	NR			
2-decenal		NR	Octadecano	-			
Undecanal		<i>Serratia</i> spp.	Nonadecano	<i>Bacillus</i> sp.; <i>Pseudomonas</i> spp.			
2-undecenal		NR	2-fenil dodecano	-			
Dodecanal		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Eicosano	-			
Dodecen-1-al	<i>Pseudomonas</i> spp.						
Tridecanal	<i>Pseudomonas fragi</i>						

5.6 AVALIAÇÃO, EM LABORATÓRIO, DA ATRAÇÃO DE *Lutzomyia* sp. POR COVs PRESENTES NOS ODORES DA PELE DE MORADORES DA ÁREA DE ESTUDO

5.6.1 Teste de atração em túnel de vento

Nos testes de validação do sistema, os flebótomos apresentaram resposta positiva tanto para ativação quanto para atração ao octenol (controle positivo), com valores estatisticamente significativos ($P = 0.023$ para ambos os parâmetros) quando comparados ao hexano (controle negativo). Esses resultados indicaram que as condições adotadas no protocolo experimental foram adequadas para a realização dos experimentos.

Dentre os doze COVs testados além do controle, foi detectado comportamento de ativação significativo quando os flebótomos foram expostos ao fenilacetaldéido ($P = 0,0044$), ao eicosano ($P = 0,0257$), ao 6-metil-5-hepten-2-ona ($P = 0,0352$) e ao nonadecano ($P = 0,0400$). Apesar de não ter apresentado valor estatisticamente significativo, o percentual de flebótomos ativados pelo hexadecano foi expressivo ($P = 0.0523$). Para alguns COVs testados foi possível observar que houve maior ativação dos flebótomos quando expostos ao hexano, apesar de as análises estatísticas não terem apresentado resultados expressivos.

Quanto ao comportamento de atração, foram observadas diferenças estatísticas significativas, comparadas ao controle negativo, nos testes com fenilacetaldéido ($P = 0.0328$) e com eicosano ($P = 0.0257$). Os resultados dos testes de ativação e de atração estão apresentados nas FIGURAS 24 e 25, respectivamente.

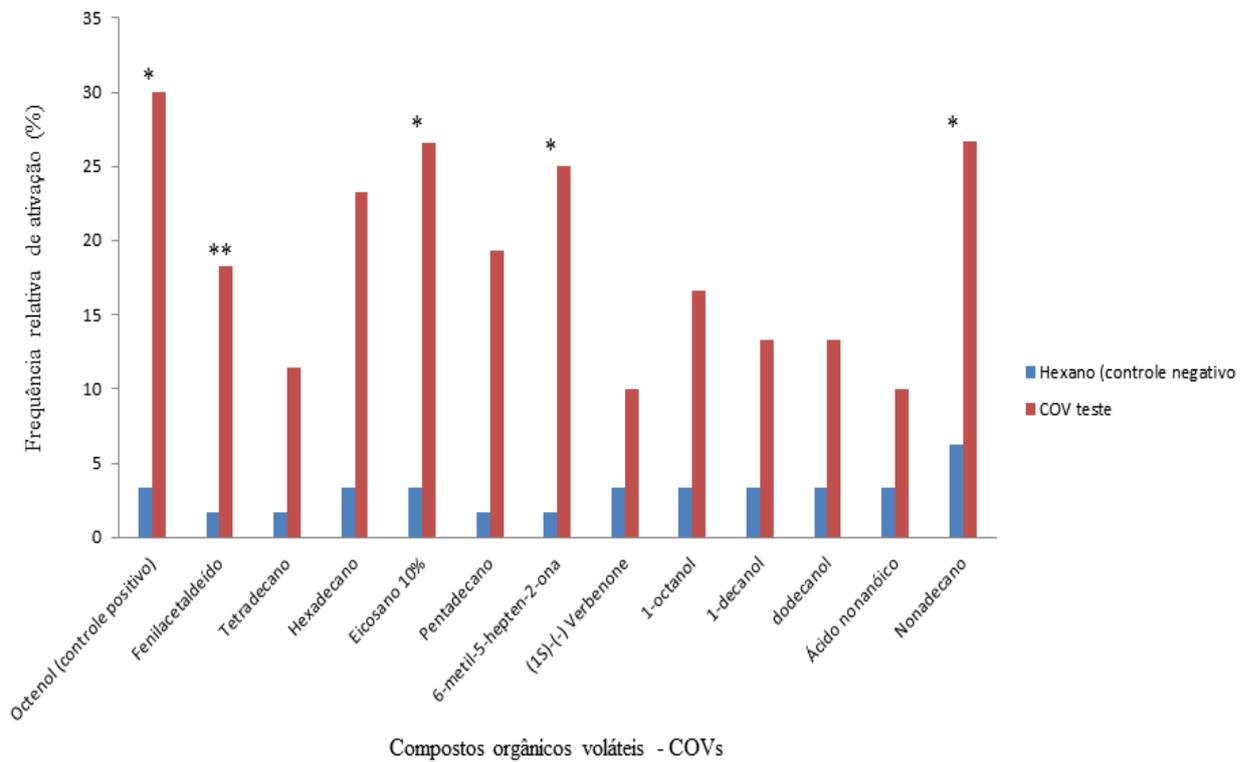


Figura 24 – Frequência relativa (%) da resposta de ativação das fêmeas de *Lutzomyia* sp. diante dos compostos orgânicos voláteis testados nos teste de atração em túnel de vento. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; † $P = 0.0523$.

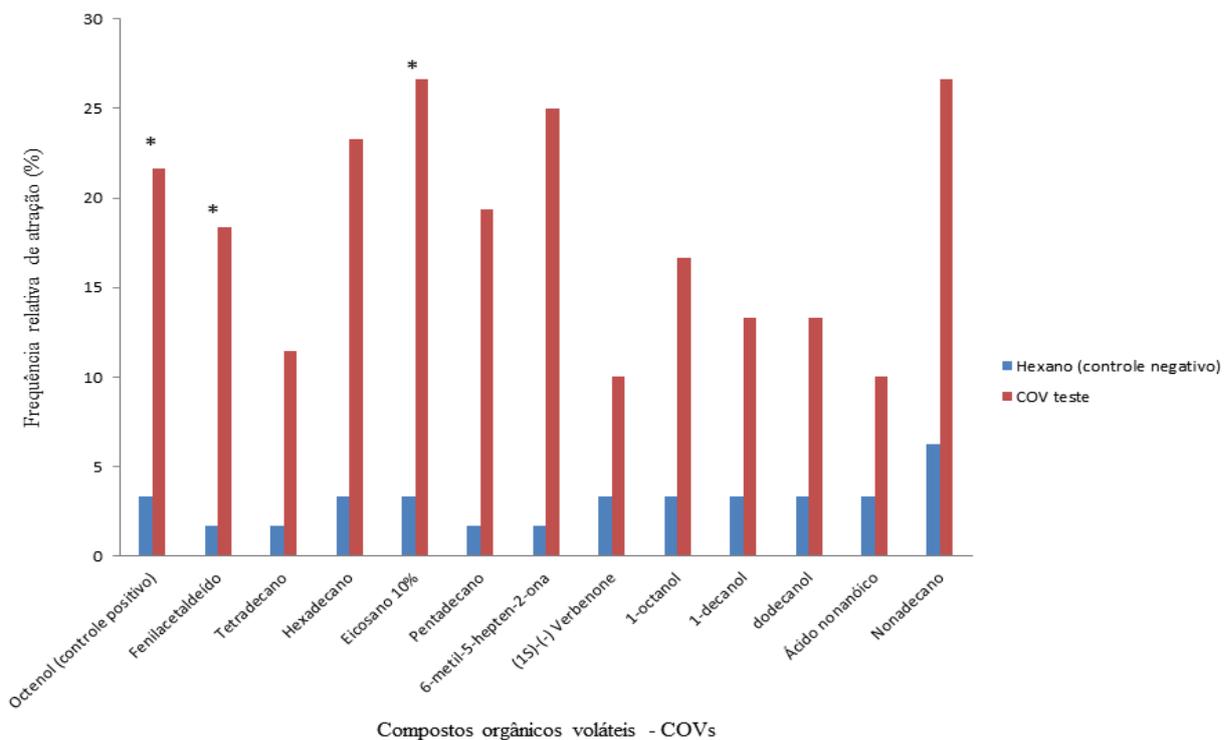


Figura 25 – Frequência relativa (%) da resposta de atração das fêmeas de *Lutzomyia* sp. diante dos compostos orgânicos voláteis testados nos teste de atração em túnel de vento. * $p < 0.05$.

5.6.2 Identificação dos flebótomos utilizados nos testes de atração em túnel de vento

Dos flebótomos identificados 78,34% foram classificados como fêmeas da espécie *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, 11,46% como fêmeas de *Lutzomyia migonei*, 5,10% como fêmeas de *Lutzomyia(Nyssomyia) whitmani* e 5,10% como fêmeas de *Lutzomyia fischeri*.

6 DISCUSSÃO

A maioria dos estudos publicados nos últimos vinte anos que investigou a atração de insetos vetores de doenças por odores humanos avaliou, de modo geral, a atração desses insetos, em laboratório ou em campo, por odores totais, sobretudo da pele (HAMILTON e RAMSOONDAR, 1994; REBOLLAR-TELLEZ *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 2001; NIJRU *et al.*, 2006; BERNIER *et al.*, 2007), por odores produzidos por bactérias comuns à microbiota da pele humana (LEYDEN *et al.*, 1981; BRAKS e TAKKEN, 1999; MEIJERINK *et al.*, 2000; BRAKS *et al.*, 2001; CURRAN, RABIN e CURTON, 2005; SMALLEGANGE *et al.*, 2005; SMALLEGANGE *et al.*, 2009; VERHULST *et al.*, 2010a; VERHULST *et al.*, 2010b; VERHULST *et al.*, 2011; SMALLEGANGE, VERHULST e TAKKEN, 2011) ou, ainda, por compostos voláteis já descritos na literatura como presentes em odores humanos, exalados pelo hálito, suor ou pela pele (MAGALHÃES-JÚNIOR *et al.*, 2014; VAN LOON *et al.*, 2015). No entanto, são escassas as investigações mais completas nesse campo, que envolvam, por exemplo, além dos experimentos de atração, a coleta, análise e identificação química desses odores, principalmente daqueles provenientes da pele, já que essa é a interface envolvida na ação hematófaga entre insetos vetores e humanos.

Dentro desse contexto, o presente trabalho pode ser considerado um dos poucos com essa proposta e é o primeiro a identificar o perfil de compostos voláteis que compõe os odores da pele de moradores de uma área endêmica para leishmaniose, mais especificamente para LTA, e a testar a atração de flebotomos provenientes da mesma área por esses compostos, de modo a aproximar as condições experimentais em laboratório às condições naturais existentes no campo. A concretização desse projeto foi possível graças à colaboração dos funcionários do posto de saúde de Corte de Pedra, os quais detêm grande confiança da população da área de estudo. É importante salientar que o agente de saúde, constitui, geralmente, o elo entre a comunidade e o sistema de saúde e que essa relação de confiança é construída, principalmente, em razão de esses profissionais conseguirem, geralmente, transcender as dimensões biológicas e compreenderem os aspectos sócios culturais da população em questão (LARA, BRITO e REZENDE, 2011). Nesse trabalho, o agente de saúde foi uma ponte essencial entre a comunidade e a equipe científica, de modo que atuou como um facilitador no acesso às residências dos voluntários, não só pela confiança depositada nele pela população, mas também por conhecer bem as estradas e o endereço de cada participante, o que possibilitou a concretização da logística planejada para a execução das coletas de material biológico ao longo dessa semana de trabalho em campo.

Ao assumir que todos os indivíduos vivem na área endêmica sob o mesmo nível de exposição aos vetores de LTA presentes na região de estudo, o perfil de odores foi avaliado como forma de distinguir os participantes desta pesquisa quanto a sua classificação sorológica em relação à resposta imune humoral para a saliva de *L.(N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*, de modo a buscar COVs que caracterizem cada um dos grupos sorológicos considerados, soropositivos e soronegativos e, assim, ainda que de modo indireto, sugerir um perfil de odores que possa estar relacionado com indivíduos mais atrativos, ou menos atrativos, a esses vetores.

Dormont, Bessière e Cohuet (2013) fizeram uma extensa revisão de literatura a respeito dos compostos voláteis emitidos pela pele humana, na qual afirmaram que existe uma grande variação quantitativa e qualitativa dos COVs presentes na pele humana que já foram descritos na literatura e que tal variação está associada a diversos fatores, que envolvem desde a região do corpo analisada até o método de coleta e de análise das amostras, sendo a coleta considerada como a etapa mais crítica na busca desses compostos. Segundo esses autores, mais de 400 compostos já foram detectados e identificados como provenientes da pele humana, porém, muitos desses parecem ser contaminantes, geralmente provenientes do ambiente. No entanto, estudos que realizaram a extração de compostos a partir de amostras confinadas no *headspace* (espaço existente acima da matriz analisada em recipiente fechado- FIGURA 5) sem interferência de fatores externos, tais como ar circundante do ambiente, resultaram na detecção de 20-90 COVs (MEIJERINK *et al.*, 2000; CURRAN *et al.*, 2005; ZANGH *et al.*, 2005; GALLAGHER *et al.*, 2008; DORMONT *et al.*, 2013).

Dentre os métodos já utilizados para coleta e identificação de COVs da pele humana, os adotados por Bernier, Booth e Yost (1999) e por Penn e colaboradores (2007) foram os que apresentaram maiores rendimentos, com a identificação de 303 e 373 COVs, através das análises, respectivamente, de odores impregnados em esferas de vidro, depois de manipuladas por alguns minutos por quatro voluntários, e de odores extraídos a partir do contato direto de fibras PDMS com o suor das axilas de 197 indivíduos. Verhulst e colaboradores (2013) também utilizaram esferas de vidro, porém para coletar odores dos pés de 48 voluntários, e identificaram 15 COVs. Dormont *et al.* (2013), por sua vez, aplicaram quatro métodos diferentes para coletar odores dos pés de dez voluntários: (1) extração com solventes a partir de raspagens dos calcanhares; (2) *Headspace*-SPME, com 15 minutos de equilíbrio e 45 minutos de exposição da fibra de SPME; (3) contato direto das fibras de SPME; (4) inserção dos pés em sistema fechado com aplicação do método de purga e armadilha, com polímero adsorvente, para captura do ar circundante (*Headspace* dinâmico). Nesse trabalho, os autores

identificaram um total de 44 COVs, com a maioria deles detectados simultaneamente pelos quatro métodos aplicados. Jiang e colaboradores (2013), por sua vez, analisaram os COVs presentes nos odores coletados com uma membrana de PDMS em contato direto com a parte superior das costas, com o antebraço e coxas de um mesmo indivíduo. Nesse estudo foram identificados 99 compostos, dos quais 27 foram encontrados simultaneamente nessas três regiões avaliadas. É importante mencionar que Bernier, Booth e Yost (1999) utilizaram três colunas cromatográficas diferentes, o que certamente contribuiu para a detecção e identificação de um maior número de compostos. No trabalho de Penn e colaboradores (2007), por sua vez, coletaram amostras de 197 indivíduos, o que também pode ter sido um fator favorável para a detecção do número relativamente alto de compostos, já que o perfil de COVs de cada indivíduo pode ser bastante variável (DORMONT, BESSIERÈ e COHUET, 2013).

Todos esses métodos se mostraram eficientes na coleta de odores da pele humana. No entanto, assim como para outras técnicas que utilizaram, por exemplo, coleta de suor, fricção de gazes e algodão ou uso de camisetas durante algumas horas ou dias, existem nessas diversas inconvenientes que podem tornar a logística de um trabalho em campo impraticável. Dentre os principais inconvenientes é possível citar, por exemplo, o uso de solventes orgânicos diretamente na pele, o que pode provocar irritação do tecido cutâneo, uso de lâminas para raspagem da pele, que podem oferecer maior risco à integridade física dos voluntários, necessidade de análise no sistema CG-EM imediatamente após a coleta, o que não é possível quando o local de realização das coletas é muito distante do laboratório de análises, necessidade de pré-tratamentos dos instrumentos de coleta (ex.: gazes e algodão), o tempo requerido aos voluntários para coletar as amostras que, a depender do método, pode variar de alguns minutos até horas ou dias e até mesmo necessidade de que os sujeitos envolvidos na pesquisa realizem atividades físicas antes das coletas (BERNIER, BOOTH e YOST, 1999; MEINJERIK *et al.* 2000; HAZE *et al.*, 2001; CURRAN *et al.*, 2005; CURRAN *et al.*, 2007; GALLAGHER *et al.*, 2008; VERHULST *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2013; DORMONT *et al.*, 2013; VERHULST *et al.*, 2016). Outro fator de grande importância que deve ser considerado no planejamento desse tipo de trabalho em campo, com um número relativamente grande de participantes, é o custo envolvido na pesquisa, já que muitas vezes recursos financeiros podem representar um fator limitante ao desenvolvimento da pesquisa.

A padronização prévia do método de coleta adotado no presente trabalho foi essencial para assegurar que as coletas em campo seriam produtivas. Os resultados obtidos nessa etapa atenderam ao requisito mínimo de apresentar os marcadores de qualidade adotados, com a

detecção dos picos dos cinco compostos voláteis frequentemente relatados na literatura como presentes nos odores da pele humana: 6-metil-5-hepten-2-ona, octanal, nonanal, decanal e geranilcetona e (DORMONT, BESSIERÈ e COHUET, 2013). As análises das amostras coletadas em campo confirmaram essa eficiência, tanto em termos quantitativos como qualitativos, com a identificação de 42 compostos, os quais estão todos dentro das principais funções químicas mencionadas por Dormont, Bessierè e Cohuet (2013) como comuns aos odores da pele: ácidos carboxílicos, aldeídos, derivados de ésteres, hidrocarbonetos (sobretudo alcanos), álcoois de cadeia curta e cetonas. Aproximadamente 74% do total desses compostos já foi relatado em outros trabalhos que utilizaram diferentes métodos de coleta, extração e de análise para identificação do perfil de compostos de odores da pele (QUADRO 1), o que demonstra que a utilização de pelos das pernas como matriz biológica para MEFS-HS/CG-EM é uma alternativa simples, segura, rápida, relativamente fácil de ser executada e de baixo custo, que pode ser adotada como método de coleta de odores da pele de indivíduos no campo.

O estudo da composição de odores presentes na pele humana é muito complexo, já que está sujeito a diversos fatores que podem interferir nos resultados, não apenas em relação aos métodos aplicados nessas investigações, mas também em razão de possíveis variações da grande variação de perfis entre diferentes indivíduos, bem como variações da composição desses odores em um mesmo indivíduo, em razão, por exemplo, de variações temporais (PENN *et al.*, 2006). Contudo, a avaliação da composição dos odores da pele dos indivíduos que participaram do presente estudo foi realizada para buscar compostos capazes de atuar como pistas químicas na orientação de insetos vetores de LTA na área de estudo. Com a grande variedade de compostos e de suas respectivas intensidades entre os voluntários, já prevista no início do trabalho, buscou-se, como explicado na seção de material e métodos, agrupar essas pessoas com base nos resultados da sorologia dos mesmos em relação à presença de anticorpos anti-saliva de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*, a fim de guiar a escolha de possíveis candidatos a serem testados como atrativos químicos para esses flebótomos.

Quadro 1 - Compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nos odores da pele humana. COVs presentes na pele humana relatados na literatura obtidos com diferentes métodos de coleta e de extração.

Referências	Métodos de coleta e extração de odores	COVs identificados no presente trabalho e que já foram relatados na literatura
BERNIER, BOOTH e YOST, 1999	Manipulação de esferas de vidro (5-15 min) / injeção criogênica no CG.	Ácido tetradecanóico, ácido pentadecanóico, ácido hexadecanóico, ácido dodecanóico, tetradecanol, hexadecanol, tetradecano, pentadecano, heptadecano,
MEIJERINK <i>et al.</i> , 2000	Coleta de suor/purga e captura em coluna de Tenax seguido de eluição com solução 2:1 de pentano e éter.	6-metil-5-hepten-2-ona, 6-metil-3,5-heptadien-2-ona, geranilcetona, 1-octanol, 1-nonanol, 1-dodecanol, 1-tetradecanol, 1-hexadecanol, octanal, nonal, decanal
HAZE, <i>et al.</i> , 2001	Camisas vestidas por 3 dias/extração, a partir de pedaços dos tecidos utilizados, por purga e captura em coluna de tenax-TA seguido de eluição com dietil-éter	2-nonenal, octanal, nonanal, decanal, 1-octanol, hexadecanol, octadecanol
CURRAN <i>et al.</i> , 2007 ²	Manipulação gazes de algodão pré-tratadas/MEFS com fibra PDMS/DVB/CAR	6-metil-5-hepten-2-ona, octanal, nonanal, decanal, undecanal, tetradecanal, 2-nonenal, 2-decanal, octanol, nonanol, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano, eicosano, ácido dodecanóico.
GALLAGHER <i>et al.</i> , 2008 ³	Extração com solução de 50:50 de etanol e hexano aplicados diretamente sobre a pele.	6-metil-5-hepten-2-ona, geranilcetona, octanal, nonanal, decanal, 2-etilhexilsalicilato, ácido tetradecanóico, ácido pentadecanóico, ácido hexadecanóico, ácido dodecanóico
	Exposição direta da fibra de MEFS sobre a pele – MEFS no modo <i>headspace</i> (fibra CAR/DVB/PDMS)	

Quadro 1 (continuação) - Compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nos odores da pele humana. COVs presentes na pele humana relatados na literatura obtidos com diferentes métodos de coleta e de extração.

Referências	Métodos de coleta/extração de odores	COVs identificados no presente trabalho e que já foram relatados na literatura
DORMONT <i>et al.</i> , 2013	Raspagem superficial da pele dos tornozelos/lavagem da lâmina de raspagem com dietil-éter ou diclorometano	6-metil-5-hepten-2-ona, geranilacetona, octanal, 2-nonanal, nonanal, decanal, undecanal, tridecanal, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano, ácido nonanóico.
	Exposição direta da fibra de MEFS sobre a pele (45 min) modo <i>headspace</i> (fibras PDMS/ DVB e CAR/DVB/PDMS)	geranilacetona, octanal, nonal, decanal, undecanal, tridecanal, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano,
	Exposição da fibra de MEFS por contato direto – fricção suave sobre a pele (fibras PDMS/ DVB e CAR/DVB/PDMS)	octanal, nonanal, decanal, 2-decenal, undecanal, tetradecano, pentadecano, hexadecano, heptadecano, ácido nonanóico, geranilcetona
	<i>Headspace</i> dinâmico – sistema de purga e captura, com coluna de Carbotrap B + Tenax – TA, para coleta e extração de odores dos pés dos voluntários colocando dentro de um saco de nalophan. .	Dodecanol, octanal, nonanal, decanal, 2-decenal, undecanal, tetradecano, pentadecano, heptadecano, tridecenal, ácido nonanóico, geranilcetona, hexadecano.
VERHULST <i>et al.</i> , 2013	Fricção de esferas de vidro contra a sola dos pés (10 min)/dessorção térmica	6-metil-5-hepten-2-ona, octanal, nonanal, decanal, geranilcetona, ácido tetradecanóico.
JIANG <i>et al.</i> ,	Membranas em discos de PDMS colocados diretamente sobre a pele (60 min)/dessorção térmica	6-metil-5-hepten-2-ona, octanal, nonanal, decanal, 2-undecanal, tetradecanal, pentadecanal, hexadecanal, 1-nonanol, 1-dodecanol, pentadecano, octadecano, nonadecano, eicosano, ácido tetradecanóico, ácido hexadecanóico, ácido dodecanóico, isopropil palmitato.

Como mencionado na seção 4.2 a presença de anticorpos contra a saliva de *L.(N.) intermedia* e *L.(N.) whitmani* no soro sanguíneo de indivíduos avaliados pode ser considerada um marcador de exposição a esses insetos (VINHAS *et al.*, 2007; ANDRADE e TEIXEIRA, 2012; WEINKOPF, 2014; CARVALHO *et al.*, 2015) e, assim, indivíduos soropositivos podem ser considerados relativamente muito picados enquanto indivíduos soronegativo são relativamente pouco picados. Todavia, o presente trabalho não se propôs a testar a atratividade de indivíduos soronegativos e soropositivos, bem como não teve como objetivo buscar marcadores para cada um desses grupos, mas sim avaliar comparativamente o perfil de odores desses dois grupos sorológicos para obter um referencial capaz de indicar COVs ou conjuntos de COVs com potencial para serem utilizados como atrativos para *Lutzomyia* sp., de modo a fornecer subsídios teóricos para o desenvolvimento de alternativas para o controle da LTA em áreas endêmicas.

A busca das relações entre o perfil de odores da pele dos indivíduos e a classificação dos mesmos quanto à resposta imune humoral para saliva de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani* exigiu extensa exploração dos dados, haja vista que a quantidade de COVs identificados, bem como suas respectivas proporções entre os indivíduos foi bastante variável (FIGURA 23), e resultou em interessantes achados que podem auxiliar no desenvolvimento de alternativas para o controle da LTA, como será discutido a seguir. As análises de PCA não distinguiram os indivíduos em relação a sua classificação sorológica, porém, foi possível encontrar algumas correlações características dentro de cada grupo avaliado e, com base nas mesmas, detectar diferenças quanto ao perfil de odores entre o grupo de indivíduos com resposta imune humoral negativa para as salivas de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani* e entre o grupo de indivíduos com resposta imune humoral positiva. Comparados aos indivíduos soropositivos, os indivíduos soronegativos apresentaram, em média, uma maior proporção do somatório dos COVs nonanal, 2-etilhexilsalicilato, tridecanal, 1-dodecanol e pentadecanal. Tal resultado permite especular que o conjunto desses compostos pode atuar como repelente, de modo que a presença dos mesmos na pele desses indivíduos os torna menos atrativos aos flebotomíneos presentes na região e, por isso, são menos picados do que os indivíduos soropositivos.

Quando comparadas as correlações entre os COVs da pele dos indivíduos soronegativos e soropositivos, foi possível verificar quatro compostos que estão mais correlacionados (positivamente) com o grupo de indivíduos soropositivos do que com o grupo dos indivíduos soronegativos: dodecanol, tetradecanol, isopropil palmitato e tetradecano. Esses compostos, por sua vez, podem ser considerados candidatos para testes de atração de

flebotomíneos e, caso exerçam de fato efeito de atração, podem vir a ser utilizados no desenvolvimento de armadilhas mais eficientes para o controle e o monitoramento desses vetores de leishmanioses. Para o mosquito *Anopheles gambiae*, Mweresa e colaboradores (2016) demonstraram que uma mistura sintética denominada “The Mbita blend” - MB, conhecida por atrair vetores de malária tanto quanto um humano, teve sua eficiência aumentada na atração desse vetor quando adicionado o álcool dodecanol ao MB. Para o tetradecanol, isopropil palmitato e tetradecano, entretanto, não foram encontrados relatos na literatura que sugiram esses compostos voláteis como atrativos de formas adultas de insetos vetores de doenças humanas.

Dentre os COVs identificados como mais fortemente correlacionados aos indivíduos soropositivos (isopropil palmitato, tetradecanol, dodecanol e tetradecano) os compostos dodecanol e tetradecano estavam disponíveis para os testes de atração em túnel de vento (TABELA 3), porém, nem um deles influenciam no comportamento dos flebotomíneos nos testes de atração em túnel de vento. Dentre os COVs testados que ativaram o comportamento de voo dos flebotomíneos, a cetona 6-metil-5-hepten-2-ona é um dos encontrados com maior frequência na literatura como semioquímico de insetos de importância médico-veterinária. Experimentos em laboratório realizados em olfactômetro em Y, por exemplo, demonstraram que tal cetona, em baixas concentrações, reduz a atividade de voo e a atividade de inserção da probóscide de *Aedes aegypti* na pele humana, a qual foi mensurada pela proporção de mosquitos que inseriram suas probóscides através de malhas colocadas nas extremidades dos olfactômetros onde um voluntário expunha sua mão (LOGAN *et al.*, 2008). Também em laboratório, Menger, Van Loo e Takken (2014) registraram a redução em 66% do pouso de fêmeas de *Anopheles gambiae* em uma câmara experimental, com controle de temperatura e umidade, dotada de uma superfície para pouso, a partir do qual foram inseridas fitas de nylon impregnadas com os odores teste.

A combinação das cetonas 6-methyl-5-hepten-2-ona e geranilacetona resultou em um eficiente repelente, por um período relativamente curto, contra os mosquitos *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* e *Culex quinquefasciatus*, quando utilizado topicamente em voluntários, os quais expuseram o antebraço a esses mosquitos em gaiolas fechadas apropriadas para esse tipo de experimento (LOGAN *et al.*, 2010). Testes de CG-EM acoplado a eletroantenográfico (EAG) indicaram que a cetona 6-metil-hepten-2-ona é capaz de ativar receptores de odores na antena de *Aedes aegypti* e de *Anopheles gambiae*, o que comprova que esses mosquitos são capazes de detectar esse composto, porém, não se sabe se ele é de fato um repelente ou se se

trata de um composto capaz de despistar esses insetos vetores em relação às pistas químicas na busca de hospedeiros (LOGAN *et al.*, 2008; CAREY *et al.*, 2010).

No presente trabalho, a 6-metil-5-hepten-2-ona, apesar de ter atraído, em valores absolutos, um maior número de flebotomos do que o hexano, não interferiu de modo considerável na atração das fêmeas de *Lutzomyia* sp., mas ativou significativamente um maior número desses insetos do que o controle negativo ($P = 0.0352$). Tais observações não permitem concluir se o 6-metil-5-hepten-2-ona é um atrativo ou repelente, pois, o fato de esse composto ter ativado um percentual de insetos significativamente maior do que o controle negativo, não significa que dizer que essa ativação seja em resposta a um estímulo de atração. Pode ser que, a exemplo do que há relatado para *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, esse volátil seja reconhecido por receptores presentes na antena de *Lutzomyia* sp., no entanto, com efeito repelente.

Os compostos voláteis fenilacetaldéido e eicosano foram os únicos que promoveram simultaneamente maior ativação e maior atração das fêmeas de flebotomíneos nos testes em túnel de vento. Segundo a base de dados “The Pherobase”, esses compostos são também encontrados em outros organismos, tais como flores e frutos, e atuam em muitas situações como sinalizadores químicos para insetos das mais diversas ordens, tais como coleópteros, lepidópteros, díptera e himenóptera, entre os quais podem atuar como atrativos, feromônios, alomônios e cairomônios. Para insetos vetores de doenças de importância médica veterinária, verificou-se, através de testes de CG-EM/EAG, que o fenilacetaldéido induz atividade eletrofisiológica em antenas de mosquitos *Culex pipiens* (Culicidae), insetos comuns em ambientes domésticos nos Estados Unidos e na Europa e que atuam como vetores de doenças, tais quais a febre do Nilo e a malária aviária (FARAJOLLAHI *et al.*, 2011). Esse composto orgânico volátil demonstrou ser atrativo a esses mosquitos, assim como observado no presente trabalho para *Lutzomyia* sp., em experimentos de atração em túnel de vento (JHUMUR, DÖTTERL e JÜRGENS, 2007). Para o hidrocarboneto eicosano (C₂₀), entretanto, não foram encontrados registros sobre seu efeito biológico no comportamento de insetos vetores de doenças animais, de modo que o presente estudo é o primeiro a relatar tal função biológica ao demonstrar que o mesmo atraiu de modo significativo *Lutzomyia* sp. em túnel de vento.

Além do eicosano, outros hidrocarbonetos testados neste estudo foram o tetradecano (C₁₄), o pentadecano (C₁₅), o hexadecano (C₁₆) e o nonadecano (C₁₉), os quais induziram, em valores absolutos, o comportamento de ativação e de atração em um maior número de fêmeas de flebotomíneos do que o controle negativo, porém tal diferença não foi considerada

significativa pelo teste exato de Fisher e, assim, não se pode afirmar que esses compostos são capazes de fato de ativar ou atrair os flebotômíneos em questão. Esses compostos foram investigados na base de dados “The Pherobase” e foi verificado que são relatados principalmente como feromônios entre espécies das ordens astigmata, dictioptera, heteroptera, tisanoptera, himenóptera e coleóptera, sendo que para esta última também atuam com frequência como alomônio, de modo que é produzido pelo próprio organismo e emitido como mecanismo de defesa contra outra espécie. Contudo, pouco se sabe sobre a função biológica desses compostos entre vetores de doenças.

O hexadecano, apesar de não ter apresentado resultados com significância estatística na diferença da ativação de flebotomos em relação ao controle negativo, ativou um número considerável desses insetos e a probabilidade de esse efeito ter se dado ao acaso foi de apenas de 5.23% ($P = 0.0523$). Contudo, com um maior número de réplicas talvez fosse possível de fato confirmar o efeito desse composto na ativação de flebotomos, com redução dessa probabilidade a valores menores que 5%. O mesmo talvez também pudesse ser alcançando em relação ao comportamento de atração, haja vista que, apesar de não ter sido encontrada diferença com significância estatística entre hexadecano e o controle negativo, o primeiro atraiu mais fêmeas do que o segundo. Ainda que registros sobre a ação semioquímica do hexadecano entre insetos vetores de doenças não tenham sido encontrados, há diversos registros na base de dados “The Pherobase” sobre a ação desse composto como, por exemplo, feromônios, entre outros insetos, inclusive dípteros, tais como *Lycoriella mali* e *Anastrepha fraterculus*, conhecida como “mosca da fruta”. Além disso, os resultados encontrados no presente trabalho indicam que há uma tendência desse composto em atrair fêmeas de *Lutzomyia* sp. em laboratório.

Outro composto testado que deve ser destacado aqui é o nonadecano, que promoveu a ativação dos flebotômíneos avaliados nos experimentos em túnel de vento. Para esse hidrocarboneto também não foram encontrados relatos sobre seus efeitos na ecologia química de formas adultas de insetos vetores de doenças, de modo que este parece ser o primeiro relato a respeito. Assim como observado para o composto 6-metil-5-hepten-2-ona, o nonadecano ativou, porém não atraiu fêmeas de *Lutzomyia* sp. nos testes em túnel de vento, de modo que esse resultado não permite concluir se tal composto é um potencial atrativo ou repelente para esses insetos. Todavia, faz-se necessário a realização de novos testes para avaliar a função biológica desse alceno no comportamento desses vetores de leishmanioses.

O octanol (C8) já foi relatado como atrativo para machos de *Lutzomyia longipalpis* (MAGALHÃES-JÚNIOR *et al.*, 2014) e para fêmeas de *Nyssomyia neivai* (MACHADO *et*

al., 2015), espécies de flebotomíneos vetores de LV e LTA, respectivamente. Entretanto, no presente trabalho não foram observados quaisquer efeitos significativos no comportamento de ativação ou de atração dos flebótomos capturados na área de estudo. Todavia, a população de flebótomos avaliada foi composta quase que exclusivamente por *L. (N.) intermedia* (aproximadamente 80%), além de alguns poucos representantes de *L. (N.) whitmani*, *L. migonei* e *L. fischeri*, espécies diferentes das que foram investigadas por esses autores.

O decanol (C10) e o dodecanol (C12), ambos álcoois, também foram testados, porém, não influenciaram a ativação ou atração dos vetores de LTA investigados no presente estudo. Machado e colaboradores (2015) verificaram ativação e atração de fêmeas de *Nysomyia neivai* em testes em túnel de vento na presença de decanol na concentração de 50%, mas o mesmo não foi observado para as concentrações de 10 e 100%. Assim como observado por esses autores, a concentração de 100% o decanol não ativou e nem atraiu os flebótomos avaliados no túnel de vento. Todavia, não foram testadas concentrações inferiores desse composto. Para o dodecanol, por sua vez, não foram encontrados outros trabalhos que tenham testado seus efeitos no comportamento de espécies de flebotomíneos, mas há relatos, como mencionado anteriormente, que esse composto é capaz de intensificar a eficiência de misturas químicas já utilizadas como atrativo para captura de vetores de malária (MWERESA *et al.*, 2016). Esse composto, de acordo com os resultados do presente trabalho, está mais correlacionado com indivíduos considerados muito atrativos para *Lutzomyia* spp. do que com indivíduos pouco atrativos e, por essa razão, talvez seja um potencial candidato para novos testes de atração.

As comparações apresentadas acima reforçam a necessidade de se investigar o comportamento de espécies vetores de importância médica individualmente e que generalizações quanto aos efeitos de COVs devem ser evitadas, haja vista a especificidade que essas relações podem ter. Contudo, essas comparações são úteis para ajudar na idealização de novos estudos e assim conduzir a achados cada vez mais próximos do que ocorre na natureza e que possam, sobretudo, serem aproveitados na concretização de estratégias de controle de doenças. Compostos como os álcoois octanol, decanol e dodecanol, por exemplo, não demonstraram ser atrativos para os flebótomos testados no presente estudo nas concentrações de 100%, mas talvez o sejam, por exemplo, quando combinados entre si. Desse modo, testes com diferentes concentrações desses compostos, assim, como com a combinação dos COVs tetradecanol, dodecanol, isopropil palmitato e tetradecano, relatados aqui como mais correlacionados com indivíduos soropositivos para saliva de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*, podem ser sugeridos como candidatos para novos testes de

atração com esses vetores, haja vista que, de acordo com a literatura e com os resultados desta pesquisa são potenciais caixões para flebotômios.

Outro aspecto considerado neste trabalho foi a possível origem de cada composto identificado. Diversos trabalhos afirmaram que os compostos presentes nos odores da pele humana são provenientes principalmente do metabolismo de bactérias presentes na microbiota da pele, muitas vezes capazes de transformar compostos não odoríferos em compostos odoríferos (LEYDEN *et al.*, 1981; BRAKS e TAKKEN, 1999; MEIJERINK *et al.*, 2000; BRAKS *et al.*, 2001; CURRAN, RABIN e CURTON, 2005; SMALLEGANGE *et al.*, 2005; SMALLEGANGE *et al.*, 2009; VERHULST *et al.*, 2010a; VERHULST *et al.*, 2010b; VERHULST *et al.*, 2011; SMALLEGANGE, VERHULST e TAKKEN, 2011). De fato, os resultados encontrados nesta investigação corroboram com tal ideia, já que mais de 70% dos compostos identificados aqui são descritos na literatura como produtos de metabolismo bacteriano, em sua maioria bactérias comuns à microbiota da pele humana, sobretudo pertencentes aos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes (ver TABELA 6). Ao considerar apenas os compostos, encontrados na presente investigação, que já haviam sido identificados por outros autores em odores de pele é possível constatar que apenas 13% desses COVs não têm relatos que comprovem que se trate de produtos do metabolismo bacteriano: 2-nonenal, 2-etilhexil salicilato, eicosano e isopropil palmitato.

Salgado e colaboradores (2016) realizaram uma interessante avaliação comparativa entre a microbiota bacteriana de ulcerações cutâneas de pacientes com LTA residentes na mesma área endêmica do presente estudo, com a microbiota bacteriana da pele sã. Dentre outros achados, esses autores identificaram que as bactérias presentes na pele sã da perna dessas pessoas eram predominantemente pertencentes aos filos Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria. Como mencionado anteriormente, a maior parte das bactérias encontradas na literatura como produtoras da maioria dos compostos identificados nos odores da pele dos indivíduos que participaram do presente estudo, pertencem, predominantemente, aos filos Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria. Associado a isso, o fato de esses indivíduos residirem na mesma área de estudo do trabalho realizado por Salgado e colaboradores (2016), pode, ainda que se diga isso com muita cautela, ser um indício de que a microbiota da pele dos participantes do presente trabalho seja também dominada por gêneros bacterianos provenientes desses três filos, o que daria maior sustentação a ideia de que os COVs identificados nos odores da pele dessas pessoas são provenientes do metabolismo bacteriano.

Dentre os compostos testados, o eicosano foi o único para o qual não foram encontrados registros na literatura que afirmem que tal composto é emitido por bactérias

presentes na pele humana ou que o mesmo é um subproduto do metabolismo desses microrganismos. Contudo, dada a grande diversidade de bactérias na pele e ao pouco conhecimento a respeito da composição de espécies comuns à microbiota humana, não se pode descartar a possibilidade de que esse volátil encontrado nos odores da pele dos participantes desta pesquisa, bem como na pele de indivíduos em outro trabalhos previamente publicados (CURRAN *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2013), possa ser produzido por bactérias presentes na pele dessas pessoas, ou ser um subproduto do metabolismo das mesmas. Para os compostos fenilacetaldeído, tetradecano, pentadecano, hexadecano e 6-metil-5-hepten-2-ona, foram encontrados registros de gêneros bacterianos comuns à microbiota da pele humana e que são capazes de produzir esses compostos, os quais são, sobretudo pertencentes aos filos Proteobactéria (*Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Serratia* sp.), Actinobacteria (*Streptomyces* sp., *Actinomyces* sp.) e Firmicutes (*Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp.).

O conhecimento das relações ecológicas entre vetor, parasita, hospedeiro e ambiente, tendem a ser complexas, mas sua compreensão, ainda que de modo parcial, pode elucidar conhecimentos capazes de auxiliar na construção de alternativas para o controle de doenças transmitidas por insetos vetores. Assim, os resultados obtidos neste estudo podem servir de alicerce para a elaboração dessas alternativas. Compostos como eicosano e fenilacetaldeído, por exemplo, podem, inicialmente, serem testados isoladamente ou combinados para avaliar a capacidade de atração de *Lutzomyia* sp. no campo, como alternativa para intensificar a captura desses insetos com armadilhas do tipo HP, por exemplo, as quais permitem a captura dos insetos vivos, os quais podem ser utilizados em experimentos em laboratório. Armadilhas adesivas do tipo “stick trap” podem também ser impregnadas com esses odores. Ambas as armadilhas podem ser potencializadas com esses semioquímicos e, dessa forma, auxiliar no desenvolvimento de pesquisas e no monitoramento da densidade populacional desses insetos, bem como da taxa de infecção dos mesmos, e, assim, estimar servir como ferramenta de apoio para estimar a taxa de risco de infecção por LTA em uma determinada localidade.

O composto 6-metil-5-hepten-2-ona também parece ser um potencial semioquímico, quem sabe como repelente, assim como constatado para outras espécies de dípteros vetores de doenças (LOGAN *et al.*, 2008; LOGAN *et al.*, 2010). O mesmo pode ser considerado para o nonadecano. Contudo, novos testes em laboratório, tanto com desenhos experimentais voltados para testar a atração quanto modelos para testes de repulsão, precisam ser realizados para desvendar as funções biológicas desses compostos na ecologia química de vetores de LTA.

Por fim, pode-se considerar que o presente trabalho foi o primeiro a caracterizar o perfil de odores de moradores de uma área endêmica para LTA e a identificar compostos, com ocorrência natural nesses indivíduos, potencialmente capazes de atrair vetores de LTA em campo. A partir dos resultados obtidos com esta investigação é possível sugerir alguns candidatos que podem ser testados como potenciais atrativos para vetores de LTA, sobretudo para *L. (N.) intermedia*, espécie predominante nos testes de atração e abundante na área de estudo. Em resumo, pelo menos quatro compostos podem ser apresentados como candidatos principais: 6-metil-5-hepten-2-ona, fenilacetaldeído, eicosano e nonadecano. Além desses compostos, podem ser considerados, como mencionado ao longo desta discussão, os álcoois octanol, decanol e dodecanol, em diferentes concentrações e combinações entre os compostos tetradecanol, dodecanol, tetradecano e isopropil palmitato.

7 CONCLUSÕES

Assim como demonstrado em outros trabalhos que investigaram a composição dos odores da pele de humanos em outros países, o perfil de odores da pele dos moradores da localidade de Corte de Pedra, Bahia, foi bastante variado. Encontrar marcadores químicos capazes de agrupar esses indivíduos com base nesse perfil e suas respectivas classificações sorológicas em resposta à saliva de *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani* é algo complicado de se conseguir e, embora não tenham sido verificados COVs específicos que distinguíssem os grupos de indivíduos com sorologia negativa ou sorologia positiva para a resposta anti-saliva desses flebotomos, algumas relações entre os COVs identificados foram encontradas e podem ser úteis em estudos futuros.

A combinação dos COVs nonanal, 2-etilhexilsalicilato, tridecanal, 1-dodecanol, pentadecanal, por exemplo, pode apresentar um efeito repelente contra flebotomíneos vetores de agente de LTA, tais como *L. (N.) intermedia* e *L. (N.) whitmani*, uma vez que o somatório das intensidades médias desses compostos foi maior nos indivíduos de sorologia negativa e, dessa forma, esses COVs possam atuar como um fator de proteção contra picadas desses insetos. Por outro lado, maiores intensidades dos COVs dodecanol, tetradecanol, isopropil palmitato e tetradecano, foram correlacionadas aos indivíduos soropositivos, de modo que esses COVs merecem ser melhor investigados em testes de atração para esses flebotomos, seja testados individualmente em diferentes concentrações ou combinados entre si.

Os COVs fenilacetaldeído e eicosano, identificados como presentes no perfil de odores da pele dos moradores de Corte de Pedra – Bahia, área endêmica para LTA, foram atrativos para *Lutzomyia* sp. nos testes de atração realizados em túnel de vento e, por tal razão, são potenciais candidatos a serem testados em campo para avaliar seus efeitos como atrativos na captura de vetores de agentes de LTA em campo. Por fim, com esses resultados é possível confirmar a hipótese de que COVs presentes nos odores da pele humana são atrativos para *Lutzomyia* sp. vetores de agentes causadores de LTA. Todavia, a diversidade de COVs encontrados torna evidente a necessidade de se realizarem novos testes com esses compostos, tanto com aqueles ainda não testados quanto com combinações, a fim de se aumentar as chances de se elaborar uma alternativa o mais atrativa possível para captura de flebotomíneos antropofílicos e, assim, colaborar com estratégias de controle das leishmanioses.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, P. L. M. M. et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 26, n. 4, p. 330–333, 2009.

ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 1–18, 2003.

AMÓRA, S. S. A. et al. Control of Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) Leishmaniasis Vectors. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 303–310, 2009.

AMPUERO, J.; MACÊDO, V.; MARSDEN, P. Características clínicas da leishmaniose tegumentar em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1. p. 22-26, 2006.

ANDRADE, A. J. et al. Are lights traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 4, p.337–343, 2008.

ANDRADE, B. B.; TEIXEIRA, C. R. Biomarkers for exposure to sand flies bites as tools to aid control of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–7, 2012.

ANTON, A.; AGAPIOU, A. Breath and sweat analysis as a tool for medical diagnostics. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON WIRELESS MOBILE COMMUNICATION AND HEALTHCARE, 4. 2014, Atenas, Grécia. 2014, p. 250–253.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p-523-532, 1996.

AYRES, C. F. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **The Lancet**, v. 16, p. 278–279, 2016.

AZEVEDO, A. C. R. et al. The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of Cutaneous Leishmaniasis in Ilhéus, State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 1, p. 75-79, 1996.

BANNERMAN, T. L. e KLOOS, W. E. *Staphylococcus capitis* subsp. ureolyticus subsp. nov. from Human Skin. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n.1, p. 144–147, 1991.

BATES, P.A. et al. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. **Parasite e Vectors**, v. 8, n. 131, p. 1–8, 2015.

BERMEJO, A. M. et al. Solid-phase microextraction for the determination of cocaine and cocaethylene in human hair by gaschromatography–mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 156, p. 2–8, 2006.

BERNIER, U. R.; BOOTH, M. M.; YOST, R. A. Analysis of Human Skin Emanations by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 1. Thermal Desorption of Attractants for the Yellow Fever Mosquito (*Aedes aegypti*) from Handled Glass Beads. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 1–7, 1999.

BERNIER, U. R. et al. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass-spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 747–756, 2000.

BERNIER, U. R. et al. Synergistic Attraction of *Aedes aegypti* (L.) to Binary Blends of L-Lactic Acid and Acetone, Dichloromethane, or Dimethyl Disulfide. **Journal of Medical Entomology**. v. 40, n. 5, 2002.

BERNIER, U. R. et al. Laboratory comparison of *Aedes aegypti* attraction to human odors and to synthetic human odors compounds and blends. **Journal of the America Mosquito Control Association**, v. 23, n. 3, p. 288–293, 2007.

BERNIER, U. R. et al. Laboratory Studies of *Aedes aegypti* Attraction to Ketones, Sulfidies, and Primary Chloroalkanes Tested Alone and in Combination with L-Lactic Acid. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 31, n. 1, p. 63–70, 2015.

BRADBURY, R. S.; REID, D. W.; CHAMPION, A. C. Urease production as a marker of virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Biomedical Science in Brief**, v. 71, n.4, p. 175, 2014.

BRAKS, M. A. H.; TAKKEN, W. Incubated human sweat but not fresh sweat attracts the malaria mosquito *Anophele gambiae* sensu stricto. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 3, p. 663–672, 1999.

BRAKS, M. A. H. et al. Microbial growth enhances the attractiveness of human sweat for the malaria mosquito, *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). **Chemoecology**, 10, p. 129-134. 2000.

BRAKS, M. A. H; MEIJERINK, J.; TAKKEN, W. The response of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, to two components of human sweat, ammonia and l-lactic acid, in an olfactometer. **Physiological Entomology**, v. 26, n. 2, p. 142–148, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral**. 1ª ed.. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portal da Saúde**. Disponível em: www.saude.gov.br. Acesso em: 01 maio 2016.

BRAY, D. P. et al. The chemical ecology of sandflies. In: TAKKEN, W. e KNOLS, B. G. J. **Ecology and Control of Vector-Borne diseases. Olfaction in vector-host interaction**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2010. v. 2. cap. 9. p. 203–215.

BRAZIL, R. P.; HAMILTON, J. G. C. Isolation and Identification of 9-methylgermacrene-B as the Putative Sex Pheromone of *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 435–436, 2002.

CAMARGO, L. M. A. e BARCINSK, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

BRO, R. e SMILDE, A. K.. Principal component analysis. **Analytical Methods**, v.6. p. 2812–2831, 2014.

CAMERON, M. M. et al. Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceara State, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 9, p. 263–372, 1995.

CAMPBELL-LENDRUM, D.; PINTO, M. C.; DAVIES, C. Is *Lutzomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912) more endophagic than *Lutzomyia whitmani* (Antunes e Coutinho, 1939) because it is more attracted to light? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 21-22, 1999.

- CAREY, A. F. et al. Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Nature**, v. 464, n. 4, p. 66–71, 2010.
- CARVALHO, A. M. et al. Interleukin 10-Dominant Immune Response and Increased Risk of Cutaneous Leishmaniasis After Natural Exposure to *Lutzomyia intermedia* sand flies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 1, p. 157–165, 2015.
- COSTA, J. M. L. et al. Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças e adolescentes procedentes de áreas endêmicas Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia), Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 279-288, 1998.
- COSTA, J. M.L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 75, n. 1, p. 13–17, 2005.
- COSTA, S. M. et al. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes e Coutinho, 1939)(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 2, p. 149-153, 2007.
- CURRAN, A. M. et al. Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 7, p. 1607–1609, 2005.
- CURRAN, A. M. et al. The frequency of occurrence and discriminatory power of compounds found in human scent across a population determined by SPME-GC/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 86–97, 2007.
- DAMESCENO, I. P. **Estudo da Fauna Flebotômica em Contendas do Sincorá, Bahia, área endêmica para Leishmaniose**. 2007. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Católica de Salvador, Salvador, 2007.
- DE LONG, R. e KNOLS, B. G. J. Selection of biting sites on man by two malaria mosquito species. **Experimentia**, v. 51, p. 80–84, 1995.
- DO VALE, V. F.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 1151–1159, 2007.
- DORMONT, L.; BESSIÈRE, J.; COHUET, A. Human Skin Volatiles: A Review. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 569–578, 2013.

DORMONT, L. et al. New methods for field collection of human skin volatiles and perspectives for their application in the chemical ecology of human–pathogen–vector interactions. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 15, p. 2783–2788, 2013.

DOSTÁLOVÁ, A. e VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 276, p. 1-12, 2012.

DOUGHERTY, M. J.; WARD, R. D.; HAMILTON, G. Evidence for the accessory glands as the site of production of the oviposition attractant and/or stimulant of *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE). **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 7, p. 1165-1175, 1992.

DOUGHERTY, R. D.; GERIN, P. M.; WARD, M. J. Identification of oviposition attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in volatiles of feces from vertebrates. **Physiological Entomology**, v.20, p. 23–32, 1993.

DOUGHERTY, R. D.; HAMILTON, M. J.; WARD. Semiochemical mediation of oviposition by the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 7, n.3, p. 219-224, 1993.

DOUGHERTY, R. D. e HAMILTON, M. J. Dodecanoic acid is the oviposition Pheromone of *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 12, 1997.

ELUMALAI, D.; HEMALATHA, P.; KALEENA, P. K. Larvicidal activity and GC–MS analysis of *Leucas aspera* against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 11, p. 1–8, 2015.

FARAJOLLAHI, A. et al. “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, n. 11, p. 1577–1585, 2011.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Os insetos transmissores das leishmanioses. **Glossário de Doenças**. Disponível em: <www.fiocruz.br/ccs>. Acesso em: 03 maio 2012.

GALLAGHER, M. et al. **British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 4, p. 780–791, 2008

GERENSTEIN, P. G. e HILDEBRAND, J. G. Role and effects of environmental carbon dioxide in insect life. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 161–178, 2008.

GIER, M. et al. Odour-guides host finding mosquitoes: identification of new attractants on human skin. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON URBAN PESTS, 4. 2002. p. 37–46.

GILLES, M. T. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: culicidae): a review. **Bulletin of Entomological Research**, v. 70, p. 525–532, 1980.

GOLDING, N. et al. Integrating vector control across diseases. **BMC Medicine**, v. 13, n. 249, p. 1–6, 2015

GOMES, A. C.; SANTOS, J. L. F. GALATI, E. A. B. Ecological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 280-287, 1986.

GONTIJO, B. e CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GRICE, E. A. et al. A diversity profile of the human skin microbiota. **Genome Research**, v.18, p. 1043-1050, 2008.

HAICK, H. et al. Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers. **Chemical Society Reviews**, v. 43, p. 1423–1449, 2014.

HAMILTON, J. G. C.; RAMSOONDAR, T. M. C. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human odours. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 8, p. 375-380, 1994.

HAMILTON, J. G. C.; DAWSON, G. W.; PICKETT, J. A. 9-methylgermacrene-B: proposed structure for novel homosesquiterpene from the sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, n. 8, p. 1477–1491, 1996.

HAMILTON, J. G. C. Sandfly pheromones: their biology and potential for use in control programs. **Parasite**, v. 15, p. 252–256, 2008.

HAZE, S. et al. 2-Nonenal Newly Found in Human Body Odor Tends to Increase with Aging. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 116, n. 4, p. 520–524, 2001.

HUDSON, J. E. Bloodsucking diptera (Culicidae, Psychodidae, Ceratopogonidae, Simuliidae, Tabanidae) collected in Suriname, 1978-1982. **Acta Leidensia**, v. 57, n. 1, p. 1-27, 1988.

JACOBSON, R. L.; SCHLEIN, Y. Lectins and toxins in the plant diet of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) can kill *Leishmania major* promastigotes in the sandfly and in culture. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 93, n. 4, p. 351–356, 1999.

JACOBSON, R. L.; SCHLEIN, Y.; MÜLLER, G. C.. Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the Control of leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4. 2001.

JHUMUR, U. S.; DÖTTERL, S.; JÜRGENS, A. Electrophysiological and behavioural responses of mosquitoes to volatiles of *Silene otites* (Caryophyllaceae). **Arthropod-plant Interactions**, v.1, p. 245–254, 2007.

JIANG, R. et al. A non-invasive method for in vivo skin volatile compounds sampling. **Analytic Chimica Acta**, v. 804, p. 111–119, 2013.

JIRMANUS, L. et al. Epidemiological and Clinical Changes in American Tegumentary Leishmaniasis in an Area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Transmission Over a 20-year Period. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n.3, p. 426-433, 2012.

KAHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences**, v. 1, n. 3, p. 1-13, 2011.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. e KILLICK-KENDRICK, M. Honeydew of aphids as a source of sugar for *Phlebotomus ariasi*. **Medical and Veterinay Entomology**, v. 1, p. 297–302, 1987.

KILLICK-KENDRICK, R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 279-289, 1999.

KUMAR, R. e ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical Translational Immunology**, v. 13, n. 3, p. 1-6, 2014.

LARA, M. O.; BRITO, M. J. M.; REZENDE, L. C. Aspectos culturais das práticas dos Agentes Comunitários de Saúde em áreas rurais. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, n. 3, p. 673–680, 2012.

LEMFACK, M. C. et al. mVOC: a databse of microbial volatiles. **Nucleic Acid Research**, v. 42, p. D744–D748, 2014.

LEWNARD, J. A. et al. Forecasting Temporal Dynamics of Cutaneous Leishmaniasis in Northeast Brazil. **Plos Neglected**, v. 8, n.10, p. 1–11, 2014.

LEYDEN, J. J. et al. The Microbiology of the Human Axilla and Its Relationship to Axillary Odor. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 77, n. 5, p. 413–416, 1981.

LOGAN, J. G. et al. Identification of Human-Derived Volatile Chemicals that Interfere with Attraction of *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 308-322, 2008.

LOGAN, J. G. et al. Arm-in-cage testing of natural human-derived mosquito repellents . **Malaria Journal**, 9, n. 239, p. 1–10, 2010.

MACHADO, V. E. et al. Attraction of the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds in a wind tunnel. **Parasites e Vectors**, v. 8, n. 147, p. 1–4, 2015.

MAGALHÃES-JÚNIOR, J. T. et al. A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae), **Parasites e Vectors**, v. 7, n. 60, p. 2–5, 2014.

MEIJERINK, J. et al. Identification of olfactory stimulants for *Anopheles gambiae* from human sweat samples. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 6, p. 1367–1382, 2000.

MENGER, D. J.; VAN LOO, J. J. A.; TAKKEN, W. Assessing the efficacy of candidate mosquito repellents against the background of an attractive source that mimics a human host. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, n. 4, p. 407–413, 2014.

MIRANDA, J. C. et al. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 185-188, 2002.

MONCAZA, A. et al. Attraction of phlebotomine sand flies to baited and non-baited horizontal surfaces. **Acta Tropica**, v. 126, p. 205–210, 2013.

MORA, D. e ARIOLI, S. Microbial Urease in Health and Disease. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1–4, 2014.

MOTULSKY, H. J. **Prim 5 Statistic Guide**. Graph Pad Software. Inc., San Diego. 2007.

MÜHLEN, C. V. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 21–29, 2009.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika vírus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. 595–596, 2014.

NETO, J. M. M. e MOITA, G. C.. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n.4, p. 467–469, 1998.

NICOLAS, G. e SILLAN, D. Immediate and latent effects on carbon dioxide in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 97–116, 1989.

NIJRU, B. N. et al. Trapping of the malaria vector *Anopheles gambiae* with odour-baited MM-X traps in semi-field conditions in western Kenya. **Malaria Journal**, v. 5, n. 39, p. 1 – 8, 2006.

OLIVEIRA, L. S. et al. Headspace solid phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry combined to chemometric analysis for volatile organic compounds determination in canine hair: A new tool to detect dog contamination by visceral leishmaniasis. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 392-398, 2008.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Report of the Scientific Working Group meeting on Leishmaniasis. Geneva: Organização Mundial de Saúde 2004. 137p.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the OMS Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. **Technical reports series**, n. 949, 186 p. 2010.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **Technical Reports Series**, n. 975, 2012.

OWINO, E A. et al. Field evaluation of natural human odours and the biogent-synthetic lure in trapping *Aedes aegypti*, vector of dengue and chikungunya viruses in Kenya. **Parasites e Vectors**, v. 7, n. 451, p. 1–9, 2014.

PANDEY, S. K.; KIM, K. Human body-odor components and their determination. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 784–796, 2011.

PENN, D. J. et al. Individual and gender fingerprints in human body odour. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 4, p. 331–340, 2007.

PETROSINO, J.F. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 856-866, 2009.

PINTO, M. C. et al. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, p. 132-139, 2001.

PINTO, M. C. et al. Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. **Parasites e Vectors**, v. 5, n. 210, p. 2-8, 2012.

PRADA, P. A.; CURRAN, A. M.; FURTON, K. G. Comparison of extraction methods for the removal of volatile organic compounds (VOCs) present in sorbents used for human scent evidence. **Analytical Methods**, v. 2, p. 70-78, 2010.

PRAGST, F. et al. Analysis of fatty acid ethyl esters in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Forensic Science International**, v. 121, p. 76-88, 2001.

QIU, Y. T. et al. Interindividual variation in the attractiveness of human odours to the malaria mosquito *Anopheles gambiae* s. s. **Medical Veterinary Entomology**, v. 20, p. 280-287, 2006.

RANGEL, E. F. et al. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* (Lutz e Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), Phlebotominae. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 2, p.19-26, 1985.

REBOLLAR-TELLEZ, E. A.; HAMILTON, J. G. C.; WARD, R. D. Response of female *Lutzomyia longipalpis* to host odour kairomones from human skin. **Physiological Entomology**, v. 24, p. 220-226, 1999.

REIHARD, J. Insect chemical communication. **Chemical sense**, v. 6, n. 4, p. 1-6, 2004.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

SALGADO, V. R. et al. The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 4, p. 231-251, 2016.

SALOMÓN, O. D. Vectores de leishmaniasis em las Américas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 143, n. 79, p. 3-15, 2009.

- SANGIORI, B. et al. Natural Breeding Places for Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Semiarid Region of Bahia State, Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, p. 1-6, 2012.
- SANTOS, J. B. et al. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 3, p. 701–708, 2000.
- SANT'ANA, A. L.; EIRAS, A. E.; CAVALCANTE, R. R. Electroantennographic Responses of the *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz e Neiva) (Diptera: Psychodidae) to 1-octen-3-ol. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 1, p. 13–17, 2002.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, L. R. Mortality of *Leishmania major* in phlebotomus papatasi caused by plant feeding of the sand flies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n.1, p. 20–27, 1994.
- SHARMA, U. e SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, p. 255-272. 2008.
- SMALLEGANGE, R. C. et al. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). **Chemical Senses**, v. 30, p. 145-152, 2005.
- SMALLEGANGE, R. C. et al. The Effect of Aliphatic Carboxylic Acids on Olfaction-Based Host-Seeking of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 933-943, 2009.
- SMALLEGANGE, C.; VERHULST, N. O.; TAKKEN, W. Sweaty skin: an invitation to bite? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 10, p. 1–6, 2011.
- SMALLEGANGE, R. C. et al. Malaria Infected Mosquitoes Express Enhanced Attraction to Human Odor. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 1-3, 2013.
- SOUZA, N. A. et al. Seasonality of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 759-765, 2002.

STEELMAN, C. D. et al. Individual variation within breeds of beef-cattle in resistance to horn fly (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 30, p. 414–420, 1993.

STRANO-ROSSI, S.; CHIAROTTI, M. Solid-Phase Microextraction for Cannabinoids Analysis in Hair and its Possible Application to Other Drugs. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 23, p. 7–10, 1999.

SULPECO INC. **Solid Phase Microextraction**. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Brochure/1/supelco-7-spme.pdf>. Acesso em: 20 maio 2016.

SUTTHANONT, N. et al. Chemical composition and larvicidal activity of edible plant-derived essential oils against the pyrethroid-susceptible and -resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 35, n.1, p. 106–115, 2010.

TAKKEN, W. e KNOLS, B. G. J. Odor-mediated behavior of afrotropical malaria mosquitoes. **Annual Reviews of Entomology**, v. 44, p. 131-157, 1999.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. C. Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* enhance leishmania infectivity. **Science**, v. 239, p. 1306-1308, 1988.

TOLEDO, F. C. P. et al. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 798, p. 361–365, 2003.

VAS, G. e VÉKEY, K.. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, p. 233–254, 2004.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n.4, p. 523–530, 2000.

VANCE, E. Nature. **What is that smell?**. Disponível em: <http://www.nature.com/news/2008/081008/full/455726a.html>. Acesso em: 20 set. 2016.

VAN LOO, J. J. A. et al. Mosquito attraction: crucial role of carbon dioxide in formulation of a five-component blend. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 567–573, 2015.

VERHULST, N. O. et al. Differential Attraction of Malaria Mosquitoes to Volatile Blends Produced by Human Skin Bacteria. **Plos One**, v. 5, n. 12, p. 1–9, 2010a.

VERHULST, N. O. et al. Chemical ecology of interactions between human skin microbiota and mosquitoes. **Microbial Ecology**, v. 74, p. 1–9, 2010b.

VERHULST, N. O. et al. Composition of Human Skin Microbiota Affects Attractiveness to Malaria Mosquitoes. **Plos One**, v. 6, n. 12, p. 1–7, 2011.

VERHULST, N. O. et al. Relation between HLA genes, human skin volatiles and attractiveness of humans to malaria mosquitoes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18. p. 87–93, 2013.

VERHULST, N. O. et al. Attractiveness of volatiles from different body parts to the malaria mosquito *Anopheles coluzzii* is affected by deodorant compounds. **Nature Scientific Reports**, v. 1, n. 6, p. 1–9, 2016.

VINHAS, V. et al. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 3111–3121, 2007.

VOLF, P.; VOLFOVA, V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, p.1–9, 2011.

WEINKOPFF, T. et al. Repeated exposure to *Lutzomyia intermedia* sand fly saliva induces local expression of interferon-inducible genes both at the site of injection in mice and in human blood. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2014.

WERMELINGERR, E. D. et al. Toxicity of Bacillus Species to Larvae of *Lutzomyia longipalpis* (L. e N.) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 3, p. 609–614, 2000.

XUE, R. et a. Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometre. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 22, p. 1181–1186, 2008.

YOUNG, D. G. e DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (diptera: psychodidae). **Memories of the American Entomological Institute**, n. 54, p. 881, 1994.

ZHANG, Z.; YANG, M. J.; PAWLISZYN, J. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 17, p. 844A–853A, 1994.

ZHANG, Z.; CAI, J.; RUAN, G.; LI, G. The study of fingerprint characteristics of the emanations from human arm skin using the original sampling system by SPME-GC/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 822, p. 244–252, 2005.

ZHANG, X. et al. Effect of quorum sensing by *Staphylococcus epidermidis* on the attraction of female adult yellow fever mosquitoes, *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae), to a blood-feeding source. **Plos one**, v. 10, n. 12, p. 1–15, 2015.

APÊNDICE I



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

(De acordo com a Resolução nº 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

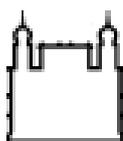
O (A) Sr. (Sra.) foi selecionado (a) e está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada “Atração de *Lutzomyia intermedia* (Diptera:Psychodidae) por odores produzidos por bactérias da microbiota da pele humana”, desenvolvida como tese de doutorado no curso de pós-graduação em Patologia, no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, unidade da Fundação Oswaldo Cruz em Salvador, Bahia.

O objetivo central desse trabalho será avaliar a atração do inseto *Lutzomyia intermedia*, vetor (transmissor) de leishmaniose tegumentar, por odores (cheiros) produzidos por bactérias presentes na pele humana.

Sua participação consistirá, basicamente, em três etapas:

1) Responder a um questionário clínico-epidemiológico, com perguntas relativas a seus hábitos pessoais como, por exemplo, relativos às suas condições de saúde, se faz uso diário de medicamentos, se consome, e com qual frequência, bebidas alcoólicas e/ou cigarros, se faz uso diário de repelentes, tipo de roupas utilizadas no dia a dia, renda familiar, características do local onde mora, dentre outras questões. Seu questionário receberá um código de associação para que o seu nome seja ocultado (escondido) e sua identidade mantida em sigilo, de modo que somente os pesquisadores envolvidos nessa pesquisa terão acesso a essas informações;

2) Permitir que sejam retiradas amostras superficiais da pele de sua perna, com o auxílio de uma haste flexível com algodão na extremidade, como um “cotonete”. Durante tal procedimento, que é realizado em poucos segundos, o sr. (a) não sentirá dor e nem sofrerá qualquer tipo de corte ou ferimento, de modo que serão tomados todos os cuidados para preservar sua integridade física. As amostras que você irá doar serão utilizadas para o cultivo e identificação de bactérias presentes na sua pele, para identificação de



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

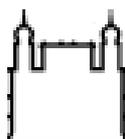
compostos químicos orgânicos voláteis (cheiros), produzidos pelas mesmas, e para testes de atração de insetos. Essas amostras serão devidamente descartadas logo após as análises, ou dentro de um prazo máximo de seis meses. Sua identidade será mantida em confidencialidade ao longo de todo o estudo e apenas a equipe de profissionais envolvida nessa pesquisa terá acesso a essas amostras. Todos e quaisquer resultados obtidos com esse trabalho serão utilizados apenas para fins de divulgação científica e poderão ser, portanto, publicados, por exemplo, em revistas científicas e congressos. Em todos os casos sua identidade será sempre mantida em sigilo.

- 3) Por fim, para participar dessa pesquisa como doador de amostras superficiais da pele, como descrito no item 2, é necessário que o sr. (a) esteja de acordo em, nas vinte e quatro horas que antecederem a coleta do material, não tomar banho com sabão/sabonete, não comer alimentos apimentados e não ingerir bebida alcoólica.

Sua participação é voluntária, ou seja, não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se quer ou não participar dessa pesquisa. Você não será penalizado de maneira alguma caso não queira participar da pesquisa ou queira desistir dela, contudo, sua colaboração será de grande importância para a realização da mesma. Qualquer dado que possa identificá-lo nesse trabalho será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa e o material da pesquisa será descartado imediatamente após as análises e, caso seja, por alguma razão, necessário armazená-lo, será feito em local seguro e por prazo máximo de seis meses.

Caso aceite participar dessa pesquisa, irá contribuir para um estudo que poderá produzir conhecimentos para o desenvolvimento de novos métodos de controle na transmissão da leishmaniose tegumentar e assim reduzir, ou mesmo evitar, a propagação dessa doença.

Esse termo é redigido em três páginas, conforme numeração de rodapé, e em duas vias, sendo uma destinada ao Sr. (a) e a outra a equipe responsável pela pesquisa. Qualquer



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

dúvida poderá entrar em contato com qualquer membro dessa equipe ou com o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz através dos telefones ou endereços apresentados abaixo.

(Dr. José Carlos Miranda – Coordenador da Pesquisa)

(Drª. Aldina Maria Prado Barral – Orientadora)

(Drª. Vanessa Riesz Salgado – Co-Orientadora)

(Mª. Diva da Silva Tavares – orientanda)

Contatos

Equipe responsável pela pesquisa

Laboratório de Imunoparasitologia – LIP
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz
 Rua Waldemar Falcão, 121 – Candeal CEP: 40296 - 710
 Salvador- BA Telefones: (71) 3176-2259 / 3176-2279

Comitê de Ética e Pesquisa

Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CEP/CPqGM)
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz
 Rua Waldemar Falcão, 121 – Candeal CEP: 40296 – 710
 Salvador-BA Telefones: (71) 3176-2285/ 3176-2327

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e aceito participar.

Local/data: _____

(Voluntário (a) da pesquisa)