

**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Saúde Pública**

**Revisão taxonômica e filogenia da Seção  
Myzorhynchella de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*)  
(Diptera: Culicidae)**

**Sandra Sayuri Nagaki**

**Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Saúde Pública  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências.**

**Área de Concentração: Epidemiologia**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Anice  
Mureb Sallum**

**São Paulo  
2015**

**Revisão taxonômica e filogenia da Seção  
Myzorhynchella de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*)  
(Diptera: Culicidae)**

**Sandra Sayuri Nagaki**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.**

**Área de Concentração: Epidemiologia**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Anice Mureb Sallum**

**São Paulo  
2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

Catálogo da Publicação  
Biblioteca/CIR: Centro de Informação e Referência em Saúde Pública  
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo  
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nagaki, Sandra Sayuri

Revisão Taxonômica e filogenia da Seção Myzorhynchella de Anopheles (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae) / Sandra Sayuri Nagaki; orientadora Maria Anice Mureb Sallum. -- São Paulo, 2015.

139 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2015.

1. Myzorhynchella. 2. Culicidae. 3. Revisão taxonômica . 4. Nyssorhynchus. 5. Filogenia. I. Mureb Sallum, Maria Anice , orient. II. Título.

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Aiko Nagaki e Kazuo Nagaki, e ao  
meu tio Hideo Nagaki (in memoriam),  
com gratidão e amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa, apoio financeiro para realização deste trabalho (Processo 2011/13322-0).

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Anice Mureb Sallum, pelo apoio e valiosos ensinamentos no decorrer de todos esses (muitos) anos.

À Profa. Dra. Eunice Bianchi Galati pela leitura criteriosa e valiosas contribuições na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvio Nihei, pelos comentários e sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Andrey Andrade pelas contribuições no exame de qualificação do projeto, assim como na pré banca e pela doação de espécimes de Brasília que muito auxiliaram nos resultados desta tese.

Ao Prof Dr. Lincoln Suesdek, pelos comentários e sugestões na elaboração deste trabalho.

À Dra. Eliana Colucci, pelas sugestões dadas no exame de qualificação;

Ao Prof. Dr. Delsio Natal e Dr. Paulo Urbinatti pelos ensinamentos, auxílio sempre que necessário e doação de espécimes;

Ao Aristides Fernandes e Dra. Marcia Bicudo por estarem sempre prontos a ajudar, pela amizade e apoio durante toda a pós graduação;

Ao Prof. Dr. Mauro Marrelli, por permitir o uso do equipamento de automontagem de fotos.

Ao Daniel Corugedo Flores pela ajuda nas fotografias em microscópio eletrônico de varredura.

Ao Sr. Saint' Clair de Vasconcelos por permitir as várias coletas realizadas em sua fazenda em Campos do Jordão.

Ao pesquisador Dr. Eduardo Bergo pela ajuda nas coletas de campo.

Aos pesquisadores Dra. Ana Maria Duarte, Dra. Teresa Fernandes e Dr. Gabriel Laporta pela doação de espécimes.

Aos pesquisadores Dr. Richard Wilkerson, Dra Yvone-Marie Linton e David Pecor pelo auxílio na visita à coleção do Museu Nacional de História Natural de Washington, também à Judith Stoffer pelas fotos dos espécimes e Taina Litwak pelas dicas nas ilustrações.

Ao pesquisador Dr. Ralph Harbach por todo auxílio na visita à coleção do Museu de História Natural de Londres.

À secretária Renilda Shimono por toda ajuda durante todos esses anos.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Tatiane Porangaba por todo auxílio no laboratório de sistemática molecular, Denise pela ajuda nas coletas de campo, Ivy Sá, Leonardo Suveges, Caio C. Moreira, Carolina Gutierrez, Paulo Moutinho e Susan Greni, pela convivência e amizade.

Ao Filipe, Ronan e cia do Anexo pelos momentos no café da tarde.

À amiga Dra. Bruna Demari e Silva pelo auxílio nas análises moleculares e por compartilhar os momentos difíceis e de alegria desde o início do mestrado.

À amiga Maysa T. Motoki pela ajuda na coleta em Campos do Jordão, e assistência na minha chegada a Washington DC.

À amiga Fabiana T. Vesgueiro pelo auxílio nas coletas do Paraná e Santa Catarina.

Ao amigo Fredy Galvis Ovallos pela ajuda em coleta de campo e companheirismo durante o doutorado.

Aos muitos amigos que a FSP me proporcionou durante a pós graduação, Cleiton Fiório, Eliana Masuda, Mahmi Fujimori, Letícia Marteis, Dra. Rosário Avellaneda, Dra. Edlaine Villela... por todos os bons momentos.

Às pessoas que conheci nas viagens durante as coletas de campo pelas muitas localidades do país.

À minha família, em especial à Haru e Anderson pela paciência e apoio incondicional...

## RESUMO

Nagaki SS. Revisão taxonômica e filogenia da Seção Myzorhynchella de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). [Tese de Doutorado]. São Paulo: FSP-USP, 2015.

*Anopheles* é o gênero da família Culicidae mais estudado devido sua importância médica. Atualmente o gênero *Anopheles* compreende 472 espécies válidas que estão divididas em sete subgêneros. Os principais vetores de plasmódio da Malária no Brasil pertencem ao subgênero *Nyssorhynchus*, que inclui 39 espécies oficialmente reconhecidas e um número crescente de complexos de espécies crípticas que estão distribuídas em três Seções: Myzorhynchella, Albimanus e Argyritarsis. Atualmente a Seção Myzorhynchella é formada por seis espécies: *An. lutzii*, *An. parvus*, *An. nigratarsis*, *An. guarani*, *An. antunesi* e *An. pristinus*. Para o desenvolvimento da análise morfológica, observou-se material-tipo depositado em diferentes coleções, espécimes depositados na coleção entomológica da FSP/USP, além de outros obtidos em coletas realizadas durante o presente estudo em diferentes localidades do Brasil. As análises moleculares foram desenvolvidas a partir de espécimes obtidos nas coletas. Revisão taxonômica da Seção Myzorhynchella é apresentada, incluindo-se descrições de quatro novas espécies e redescrições das demais, informações sobre bionomia, importância médica, caracterização molecular, distribuição geográfica, estado de preservação do material-tipo, além de chaves de identificação de adultos, larva de quarto estágio e genitália masculina. Os resultados das análises filogenéticas utilizando sequências de ITS2, COI e Catalase indicam a existência de pelo menos doze espécies dentro da Seção Myzorhynchella, os espécimes que vêm sendo identificados como *An. antunesi* constitui um complexo formado por possíveis cinco espécies e aqueles de *An. parvus* e *An. pristinus* também podem representar complexos de espécies. As sequências de ITS2 podem ser utilizadas como marcador diagnóstico para espécies da Seção Myzorhynchella. Contudo, o estudo ainda demonstra que pouco se conhece sobre a diversidade de espécies de *Anopheles* que ocorrem em ambientes onde a malária ocorre em baixa endemicidade. Pelo número de espécies novas encontradas e pela escassez de trabalhos com espécies da Seção, fica evidente a necessidade de mais estudos.

Palavras-chave: *Nyssorhynchus*, Myzorhynchella, revisão taxonômica, análise molecular, novas espécies.

## ABSTRACT

Nagaki SS. Taxonomic review and phylogeny of Myzorhynchella Section of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). [Doctoral thesis]. São Paulo: FSP-USP, 2015.

*Anopheles* is the Culicidae Family genus most studied because of its medical importance. The genus currently comprises 472 valid species that are divided into seven subgenus. The main vectors of plasmodium malaria in Brazil belong to the subgenus *Nyssorhynchus*, that includes 39 valid species and a growing number of cryptic species complexes that are divided in three Sections: Myzorhynchella, Albimanus and Argyritarsis. Myzorhynchella Section currently consists of six species: *An. lutzii*, *An. parvus*, *An. nigritarsis*, *An. guarani*, *An. antunesi* and *An. pristinus*. For the morphological analysis, type material deposited in different collections were studied, specimens deposited in the entomological collection of FSP/USP, and other obtained from field collections in different localities in Brazil during this study. The molecular analyzes were taken from specimens obtained in field collections. Taxonomic review of Myzorhynchella Section is presented, including descriptions of four new species and redescriptions of the others, information on bionomics, medical importance, molecular characterization, geographical distribution, preservation status of type material, as well as identification keys of adults, fourth instar larvae and male genitalia. The results of phylogenetic analysis using sequences of ITS2, *COI* and *Catalase* indicate the existence of at least twelve species within Myzorhynchella Section, the specimens which have been identified as *An. antunesi* is a species complex formed by possible five species and those of *An. parvus* and *An. pristinus* may also represent species complexes. The ITS2 sequences can be used as a diagnostic marker for species of Myzorhynchella Section. However, the study also shows that little is known about the diversity of *Anopheles* species that occur in environments where malaria occurs in low endemicity. By the number of new species found and the lack of studies with species of the Section, it is evident the need for further studies.

Keywords: *Nyssorhynchus*, Myzorhynchella, taxonomic review, molecular analysis, new species.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. SEÇÃO MYZORHYNCHHELLA .....	2
1.1.1. História Taxonômica .....	2
1.1.1. Espécies da Seção Myzorhynchella .....	5
1.2. TAXONOMIA INTEGRATIVA .....	7
1.2.1. Marcadores Moleculares .....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	10
2.1. OBJETIVO GERAL .....	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
3.1. COLETAS .....	11
3.2. MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO .....	12
3.3. MONTAGEM DO MATERIAL .....	14
3.3.1. Adultos .....	14
3.3.2. Imaturos .....	14
3.3.3. Genitália Masculinas .....	15
3.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	16
3.5. ILUSTRAÇÕES E IMAGENS .....	16
3.6. IDENTIFICAÇÃO .....	17
3.7. ESTUDO MORFOLÓGICO .....	17
3.7.1. Material Examinado .....	18
3.7.2. Descrição e Redescrição .....	18
3.7.3. Chave Dicotômica de Identificação .....	19
3.8. ESTUDO MOLECULAR .....	19
3.8.1. Extração de DNA .....	19
3.8.2. Amplificação de DNA .....	20
3.8.3. Purificação e Quantificação de DNA .....	21
3.8.4. Clonagem de ITS2 .....	21
3.8.5. Sequenciamento de DNA .....	22

3.8.6. Cromatografia de gel filtração .....	22
3.8.7. Edição e Alinhamento .....	23
3.8.8. Análise Molecular .....	23
3.9. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA .....	24
3.10. DEPÓSITO DO MATERIAL .....	24
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR .....	24
4.1.1. Redescrições e Descrições .....	24
<i>Anopheles (Nys.) lutzii</i> Cruz, 1901 .....	25
<i>Anopheles (Nys.) nigritarsis</i> (Chagas, 1907) .....	38
<i>Anopheles (Nys.) parvus</i> (Chagas, 1907) .....	41
<i>Anopheles (Nys.) guarani</i> (Shannon, 1928) .....	49
<i>Anopheles (Nys.) antunesi</i> Galvão & Amaral, 1940 .....	57
<i>Anopheles (Nys.) pristinus</i> Nagaki & Sallum, 2010 .....	65
<i>Anopheles (Nys.) lutzii</i> - Forma 1 n. sp. Nagaki & Sallum .....	72
<i>Anopheles (Nys.) antunesi</i> - Forma 1 n. sp. Nagaki & Sallum .....	78
<i>Anopheles (Nys.) antunesi</i> - Forma 2 n. sp. Nagaki & Sallum .....	83
<i>Anopheles (Nys.) antunesi</i> - Forma 3 n. sp. Nagaki & Sallum .....	88
4.1.2. Distribuição Geográfica .....	92
4.1.3 Chave de Identificação de Adultos .....	93
4.1.4 Chave de Identificação de Larvas de quarto estágio .....	94
4.1.5 Chave de Identificação de Genitália masculina .....	95
4.2. FILOGENIA .....	96
4.2.1. ITS2 .....	96
4.2.2. <i>COI</i> .....	97
4.2.3. <i>Catalase</i> .....	99
4.2.4. <i>COI</i> + <i>Catalase</i> .....	101
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>103</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>108</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXOS</b>	
Anexo 1 – Ficha de campo .....	126

Anexo 2 – Quetotaxia .....	127
Anexo 3 – Informação dos espécimes utilizados para as análises moleculares.....	130
Anexo 4 – Asas .....	135
Anexo 5 – Genitálias masculinas .....	136
Anexo 6 – Trompas .....	137

**LATTES**

## 1. INTRODUÇÃO

Culicidae é uma família de insetos popularmente chamados de mosquitos. Esta é considerada grupo monofilético, possui atualmente 3.546 espécies válidas que estão agrupadas em duas subfamílias e 112 gêneros (HARBACH, 2015). A subfamília Culicinae possui 109 gêneros e a Anophelinae, que inclui os vetores de plasmódio que causam malária em humanos, está subdividida em três gêneros: *Anopheles* Meigen (cosmopolita), *Bironella* Theobald (Australasia) e *Chagasia* Cruz (Neotropical) (HARBACH, 2004; HARBACH e KITCHING, 2005). Os anofelíneos são encontrados em todas as regiões biogeográficas do mundo, mas a riqueza de espécies é maior nas áreas tropicais e subtropicais (FORATTINI, 2002).

*Anopheles* é um dos gêneros da família Culicidae mais estudado devido sua importância na transmissão de filárias e protozoários ao homem. Atualmente, o gênero *Anopheles* compreende 472 espécies válidas que estão agrupadas em oito subgêneros: *Anopheles* Meigen (Cosmopolita, 183 espécies), *Baimaia* Harbach, Rattanarithikul & Harrison (Oriental, 1 espécie), *Cellia* Theobald (Velho Mundo, 224 espécies), *Christya* Theobald (África Subsaariana, 2 espécies), *Kerteszia* Theobald (Neotropical, 12 espécies), *Lophopodomyia* Antunes (Neotropical, 6 espécies), *Nyssorhynchus* Blanchard (Neotropical, 39 espécies) e *Stethomyia* Theobald (Neotropical, 5 espécies) (HARBACH, 2015; 2013). Entre os subgêneros, quatro incluem espécies que transmitem parasitos da malária ao homem: *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia* e *Nyssorhynchus* (HARBACH, 2013).

Estima-se que 3.3 bilhões de pessoas no mundo estão sob o risco de serem infectadas e desenvolverem malária (WHO, 2014). No Brasil, aproximadamente, 143.000 foi o número de casos registrados em 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os principais vetores de plasmódio da malária no Brasil pertencem ao subgênero *Nyssorhynchus*, que inclui 39 espécies oficialmente reconhecidas e um número crescente de complexos de espécies morfológicamente semelhantes. O subgênero está subdividido em três Seções, *Myzorhynchella*, *Albimanus* e *Argyritarsis*. As duas últimas foram objetos de revisões, a Seção *Albimanus* foi estudada por FARAN (1980) e a Seção *Argyritarsis* por LINTHICUM (1988). Quanto a *Myzorhynchella*, suas espécies foram estudadas por GALVÃO (1941) e mais recentemente por NAGAKI et al. (2010; 2011). No entanto, quase não há relatos sobre seus vários estágios de desenvolvimento, sobretudo dos ovos.

## 1.1. SEÇÃO MYZORHYNCHELLA

### 1.1.1. História Taxonômica

CRUZ (1901) descreveu *Anopheles lutzii* a partir de espécimes coletados no Rio de Janeiro. Por considerar as escamas do occipício eretas e bifurcadas, BORROUL (1904) transferiu *Anopheles lutzii* Cruz para o gênero *Pyretophorus* Blanchard. Paralelamente, o autor redescreveu a espécie que passou a ser denominada *Pyretophorus lutzi*. Posteriormente, THEOBALD (1907) descreveu o gênero *Myzorhynchella* juntamente com a nova espécie *Myzorhynchella nigra* que por monotopia se tornou a espécie tipo do gênero.

Em 1907, CHAGAS considerou que *Pyretophorus lutzi* e *Myzorhynchella nigra* eram morfologicamente idênticas. Dessa maneira, o autor transferiu a última espécie para a sinonímia de *Pyretophorus lutzi*, e esta passou a ser designada como *Myzorhynchella lutzii*. Com o gênero bem estabelecido, duas novas espécies, simpátricas, foram descritas: *Myzorhynchella parva* Chagas e a *Myzorhynchella nigratarsis* Chagas.

HOWARD et al. (1917) consideraram congêneros todos os anofelinos e os colocaram no gênero *Anopheles*. Em seguida, CHRISTOPHERS (1924) com base nas estruturas da genitália masculina reconheceu cinco subgêneros distintos (*Chagasia*, *Bironella*, *Anopheles*, *Nyssorhynchus* e *Myzomyia* Blanchard) dentro do gênero *Anopheles* e incluiu as espécies de *Myzorhynchella* no subgênero *Nyssorhynchus* pertencentes ao grupo *Nyssorhynchus*. As espécies do grupo eram representadas por *An. argyritarsis* Robineau-Desvoidy 1827, *An. albimanus* Wiedemann, 1820, *An. tarsimaculatus* Goeldi, 1905, *An. lutzii*, *An. parvus*, *An. nigratarsis*, e *An. gilesi* (Neiva, 1908).

Em 1926, ROOT considerou que três grupos (*Nyssorhynchus*, *Myzorhynchella* e *Kerteszia*) deveriam ser incluídos dentro do subgênero *Nyssorhynchus* e neste trabalho, estudou o grupo *Nyssorhynchus*. Em seguida, o autor revisou espécies do grupo *Myzorhynchella* (*An. lutzii* e *An. parvus*) em comparação ao grupo *Nyssorhynchus* através de características da genitália masculina, larva e adulto (ROOT, 1927).

Shannon descreveu *Anopheles (Nyssorhynchus) guarani* em DYAR (1928). A espécie é considerada sinônimo júnior de *An. lutzii* no trabalho de EDWARDS (1932), no entanto não há registro de que autor a incluiu como sinônimo.

COSTA LIMA (1928) considerou que a classificação proposta por CHRISTOPHERS (1924) era a mais correta, porém em suas considerações demonstrou a necessidade de elevar a categoria grupo a subgênero e considerou as espécies do subgênero *Nyssorhynchus* como pertencentes ao gênero *Nyssorhynchus*, que foi dividido em dois subgêneros: *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. O grupo Myzorhynchella foi considerado com posição sistemática incerta. Todavia, no ano seguinte COSTA LIMA (1929) considerando a opinião de ROOT (1927) sobre o grupo Myzorhynchella, elevou este ao nível de subgênero, dividindo o gênero *Nyssorhynchus* em três subgêneros: *Nyssorhynchus*, *Myzorhynchella* e *Kerteszia*.

PINTO (1930) transferiu os táxons do gênero *Nyssorhynchus* para o gênero *Anopheles*.

EDWARDS (1932) seguiu classificação de ROOT (1927) e dividiu o subgênero *Nyssorhynchus* de *Anopheles* em três grupos: *Nyssorhynchus*, *Myzorhynchella* e *Kerteszia*. O Grupo Myzorhynchella era representado pelas espécies: *An. lutzii*, *An. nigratarsis*, *An. parvus* e *An. pictipennis* (Philippi, 1865).

LANE (1939) em seu catálogo adotou a classificação proposta por EDWARDS (1932), porém considerou *Kerteszia* como subgênero de *Anopheles* e não mais como grupo. Nesse contexto, o grupo Myzorhynchella inclui *An. gilesi* (Neiva, 1908), *An. lutzii*, *An. nigratarsis*, *An. parvus* e *An. pictipennis*.

GALVÃO & AMARAL (1940) descreveram *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi*.

GALVÃO (1941) julgou que *Nyssorhynchus*, *Myzorhynchella*, *Kerteszia* e *Arthuromyia* Galvão fossem considerados como subgêneros de *Anopheles* por formarem grupos homogêneos. Dessa maneira, *An. lutzii*, *An. parvus*, *An. nigratarsis* e *An. antunesi* foram agrupadas no subgênero *Myzorhynchella*.

O autor colocou *An. pictipennis* no subgênero *Nyssorhynchus* por apresentar caracteres como presença de escamas nos segmentos abdominais, assim como asas com manchas claras grandes, não presentes nas outras espécies de *Myzorhynchella*. *Anopheles gilesi* por apresentar características não presentes nos outros subgêneros, também foi colocado em um novo subgênero, *Arthuromyia*.

LANE (1953) adotou seis subgêneros de *Anopheles* (*Anopheles*, *Arribalzagia* Theobald, *Lophopodomyia*, *Myzorhynchella*, *Nyssorhynchus* e *Stethomyia*), sendo o subgênero *Myzorhynchella* para as espécies *An. antunesi*, *An. lutzii*, *An. parvus*. O autor não citou *An. nigratarsis* em nenhum outro agrupamento.

FARAN (1980) subdividiu o subgênero *Nyssorhynchus* em duas Seções, Albimanus e Argyratarsis. O grupo Myzorhynchella não foi incluído como Seção devido à escassez de material disponível e posição taxonômica incerta.

PEYTON et al. (1992) reconheceram Myzorhynchella como Seção do subgênero *Nyssorhynchus* na mesma condição das outras duas Seções, por possuírem características morfológicas distintas e que consideraram significativas para justificar a hipótese proposta. Nesta Seção foram incluídas quatro espécies: *An. antunesi*, *An. lutzii*, *An. nigratarsis* e *An. parvus*.

Recentemente, NAGAKI et al. (2010) descreveram uma nova espécie *Anopheles pristinus* Nagaki & Sallum e redescreveram *An. antunesi*. No ano seguinte, *Anopheles guarani* antes como sinônimo júnior de *An. lutzii*, foi validada e *An. lutzii* redescrita (NAGAKI et al., 2011). Dessa maneira, a Seção Myzorhynchella passou a incluir seis espécies válidas, a saber: *An. antunesi*, *An. guarani*, *An. lutzii*, *An. nigratarsis*, *An. parvus* e *An. pristinus*.

Atualmente a classificação defendida por PEYTON et al. (1992) é a que tem sido adotada (SALLUM et al., 2000; NAGAKI et al., 2010; 2011; BOURKE et al., 2010; 2011; FOSTER et al., 2013; HARBACH, 2015).

### 1.1.2. Espécies da Seção Myzorhynchella

Todas as espécies da Seção Myzorhynchella foram descritas a partir de espécimes coletados no Brasil (BELKIN et al., 1971; NAGAKI et al., 2011). Atualmente a Seção inclui seis táxons:

- *Anopheles lutzii* Cruz, 1901;  
Sinônimo: *Anopheles niger* (Theobald, 1907).
- *Anopheles parvus* (Chagas, 1907);
- *Anopheles nigratarsis* (Chagas, 1907);
- *Anopheles guarani* Shannon, 1928;
- *Anopheles antunesi* Galvão & Amaral, 1940;
- *Anopheles pristinus* Nagaki & Sallum, 2010.

As espécies da Seção Myzorhynchella podem ser diferenciadas das demais do subgênero *Nyssorhynchus*, pela ausência de escamas na superfície dorsal dos segmentos abdominais, as escamas estão presentes nos segmentos genitais (GALVÃO, 1941; FORATTINI, 1962); os tarsômeros posteriores 3 e 4 são completamente brancos, com exceção de *An. nigratarsis* que possui anéis formados de escamas escuras na base dos dois segmentos; e a superfície dorsal da veia alar 1A é predominantemente coberta por escamas escuras, com uma pequena área clara que ocupa a posição mediana (PEYTON et al., 1992). A genitália masculina apresenta caracteres como a presença de folíolos no edeago, e o claspete dorsal possui duas cerdas inseridas em posição apical e uma terceira, subapicalmente (GALVÃO, 1941). Nas larvas de quarto estágio, as cerdas 6 dos segmentos abdominais IV–VI apresentam-se ramificadas (GALVÃO, 1941; FORATTINI, 1962; PEYTON et al., 1992).

A biologia das espécies da Seção é pouco conhecida, por isso, a dificuldade em encontrar formas imaturas em campo. Nos poucos registros que foram publicados na literatura, as fases imaturas de desenvolvimento têm sido encontradas em pequenas coleções hídricas, como poças de água de chuva acumuladas em depressões no solo, pequenos charcos, riachos e buracos em rochas. Os criadouros são geralmente situados em ambientes florestais. São sombreados, com água límpida e vegetação escassa (FORATTINI, 1962).

São mosquitos zoofílicos. No entanto, ANTUNES & LANE (1933) observaram espécimes de *An. parvus* picando o homem na mata no período vespertino. Em São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, PINTO et al. (1940) observaram *An. lutzii* também sugando o

homem na mata e invadindo os domicílios quando estes localizavam-se dentro da floresta. Em Juíz de Fora, Minas Gerais, NEIVA (1909) encontrou *An. lutzii* e *An. parvus* predominando na região. Em registro recente, DUARTE et al. (2013) observaram que um espécime de *An. lutzii* coletado em região de Mata Atlântica estava infectado por *Plasmodium vivax*. Apesar deste registro, não há evidências epidemiológicas que confirmem o papel vetor de espécies da Seção Myzorhynchella na dinâmica de transmissão da malária humana.

Em relação aos estudos taxonômicos, FORATTINI et al. (1997) descreveram os ovos de *An. antunesi*, comparando-os com os de outras espécies de *Nyssorhynchus*. No entanto, NAGAKI et al. (2010) demonstraram que os ovos eram de *An. pristinus*, espécie naquela época ainda desconhecida da ciência.

FORATTINI et al. (1998) descreveram os ovos de *An. parvus*. No mesmo trabalho, os autores descreveram os ovos de *An. lutzii* a partir de espécimes coletados em dois municípios do estado de São Paulo, Dourado e Pariquera-Açu. Vale assinalar que os ovos das duas populações de *An. lutzii* estudadas diferiam em aspectos morfológicos, sugerindo que se tratavam de espécies distintas. Tal fato foi comprovado por NAGAKI et al. (2011) que compararam os ovos de *An. guarani* coletados em Foz do Iguaçu, localidade-tipo de *An. guarani*, com aqueles da população de Dourado e estes se mostraram idênticos.

Dessa maneira, evidenciou-se que a morfologia externa de ovos, observados em microscópio eletrônico de varredura, apresentam características que podem ser empregadas na delimitação e definição de espécies de *Anopheles*. Como exemplo, o estudo de LOUNIBOS et al. (1997) que indicou que *Anopheles trinkae* Faran é espécie válida, retirando-a da sinonímia de *Anopheles dunhami* Causey.

Além disso, os resultados das análises empregando sequências de DNA do gene mitocondrial *COI* e do nuclear *white*, além do segundo espaçador interno do DNA ribossômico (ITS2), indicaram que dois espécimes coletados em área de Mata Atlântica do norte do Estado do Rio Grande do Sul representam duas espécies simpátricas ainda não descritas, uma das quais é mais relacionada a *An. antunesi* e a outra pertence ao clado formado por *An. lutzii* (BOURKE et al. 2011). Esses dados foram corroborados por FOSTER et al. (2013) utilizando dois genes nucleares, *white* e *CAD* e o mitocondrial *COI*.

Apesar da escassez de estudos sobre espécies de Myzorhynchella, os últimos trabalhos como de BOURKE et al. (2011) e FOSTER et al. (2013) demonstraram que a Seção necessita de novas investigações, pois os resultados das análises morfológicas e moleculares indicaram

que possam existir espécies ainda desconhecidas da ciência, assim como a presença de complexos de espécies. Este parece ser o caso de *An. parvus*, que pode ser constituído por pelo menos duas espécies, como indicam as sequências do ITS2 e os resultados das análises das sequências concatenadas dos genes *COI*, *white* e do ITS2 (BOURKE et al., 2011).

A Seção *Myzorhynchella* é um grupo relativamente pouco conhecido e a identificação de suas espécies nem sempre é tarefa fácil. Para se obter identificação acurada, os exemplares devem estar em bom estado de conservação, especialmente quanto ao revestimento de escamas das pernas e das asas. Acresce considerar que no caso de espécies morfologicamente semelhantes, a distinção entre elas é difícil por meio de caracteres da morfologia externa de adultos. No entanto, a identificação é mais fácil pela comparação de caracteres da genitália masculina e dos ovos, que são obviamente mais difíceis para se obter do que adultos fêmeas.

As descrições das espécies, no início do século passado, eram muitas vezes insuficientes para as necessidades atuais, quando são conhecidos diversos complexos de espécies. Portanto, há a necessidade de levantar caracteres morfológicos através de descrições mais detalhadas, que poderão ser utilizados em estudos filogenéticos e outros para a elaboração de chaves de identificação de espécies.

## 1.2. TAXONOMIA INTEGRATIVA

Existe atualmente carência de especialistas que se dediquem à sistemática. Esta situação é preocupante para a ciência da culicidologia, pois a maioria dos mosquitos é pouco conhecida e os estudos filogenéticos restringem-se a grupos de maior importância médica (ZAVORTINK, 1994).

A taxonomia de anofelinos atingiu o auge com a aplicação de técnicas genéticas durante a última década do Século XX. O resultado foi a descoberta de vários complexos de espécies crípticas. Uma abordagem importante para o estudo de espécies crípticas é a integração da taxonomia morfológica com estudos moleculares, o que garante que os resultados do sequenciamento de DNA sejam conectados corretamente aos dados morfológicos. A integração destes métodos auxilia na delimitação de espécies. Dessa maneira,

possibilita a condução de estudos sobre sua bionomia, distribuição geográfica, ecologia e relações das espécies com a transmissão de parasitos. Estes últimos são essenciais para a definição da importância epidemiológica das espécies, e portanto, para a concepção e implementação de medidas para o controle dos vetores (HARBACH, 2007).

DAYRAT (2005) propôs que “a taxonomia integrativa é definida como a ciência que visa delimitar as unidades de diversidade da vida a partir de perspectivas múltiplas e complementares (filogeografia, morfologia, genética de populações, ecologia, desenvolvimento, comportamento, etc.)”. Essa abordagem integrativa tem sido empregada para alguns grupos de vertebrados e invertebrados. Como exemplo, vale citar o estudo de MELVILLE et al. (2014) que empregou informações morfológicas integradas a estudos genéticos e análises para a delimitação de espécies de répteis Agamidae. Dos protocolos utilizados, a taxonomia integrativa produziu os melhores resultados em relação à definição dos limites das espécies. Recentemente, KIRICHENKO et al. (2015) descreveram uma nova espécie de Lepidoptera a partir de abordagem integrada que combinou dados morfológicos e ecológicos com informações moleculares.

### 1.2.1. Marcadores Moleculares

Dentre os marcadores moleculares, o gene Citocromo Oxidase subunidade I (*COI*) do DNA mitocondrial e o Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) do DNA ribossômico têm sido muito utilizados na distinção de espécies do gênero *Anopheles*.

Um código de barras de DNA ideal deve conter significativa variabilidade genética e divergência em nível de espécie, possuir sites conservados para o desenvolvimento de primers de PCR universais e uma sequência curta de modo a facilitar a extração e amplificação (KRESS & ERICKSON, 2008).

O uso de um código de barras para organismos vivos utilizando fragmento de 658 pares de bases do gene mitocondrial *COI* foi proposto por HEBERT et al. (2003). Desde então traz algumas preocupações quanto ao uso da taxonomia tradicional, mas ao mesmo tempo ele possibilita a solução de dúvidas que a taxonomia morfológica não permitiria se

empregada como fonte única de informações. Mais recentemente, o marcador ITS2 foi utilizado como código de barras para plantas e animais (YAO et al., 2010).

Por esta razão eles têm sido utilizados como ferramentas para a identificação e delimitação de complexos de espécies de *Anopheles*. Como exemplos, vale citar o trabalho de RUIZ et al. (2010) que através de sequências de *COI* e ITS2 confirmaram a presença de *An. dunhami* pela primeira vez na Colômbia. SALLUM et al. (2008) empregando sequências do ITS2, apresentaram evidências de que o *An. benarrochi* Galbadon, Cova Garcia e Lopez, *An. oswaldoi* (Peryassu) e *An. konderi* Galvão e Damasceno do município de Acrelândia, estado do Acre, Brasil, representam complexos de espécies. Outro estudo utilizando ambos marcadores, revelou a presença de duas formas distintas de *An. barbirostris* van der Wulp na China (WANG et al., 2015).

De acordo com o estado de preservação de um espécime, que pode estar danificado, em estágio imaturo de desenvolvimento, ou pertencer a um complexo de espécies crípticas, mesmo um especialista pode ser incapaz de fazer a identificação específica. Nesses casos, essas sequências de DNA de genes específicos auxiliam na solução de problemas taxonômicos, a partir do sequenciamento do DNA obtido de pequenos fragmentos do espécime (GARROS & DUJARDIN, 2013).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

- Revisar taxonômicamente a Seção *Myzorhynchella* de maneira a contribuir para o conhecimento do subgênero *Nyssorhynchus* de *Anopheles*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Redescrever as espécies conhecidas atualmente na Seção;
- Descrever e nomear as espécies novas da Seção;
- Caracterizar morfológicamente os adultos e estágios imaturos das espécies da Seção;
- Desenvolver chaves de identificação para adultos, larvas de quarto estágio e genitália masculina das espécies da Seção;
- Desenvolver mapas de distribuição geográfica das espécies da Seção;
- Elaborar ilustrações à traço e microfotografias das diversas fases de vida das espécies da Seção;
- Estabelecer as relações filogenéticas através de marcadores moleculares dentro da Seção.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. COLETAS

As coletas foram realizadas no período de Novembro de 2011 a Abril de 2015. As áreas prioritizadas foram as localidades-tipo das espécies da Seção Myzorhynchella e também regiões que já haviam sido relatadas ocorrência das espécies de interesse. No entanto, em algumas localidades não coletamos espécies do estudo e estas incluem duas localidades-tipo. A Tabela I indica as localidades, datas e coordenadas das coletas.

Tabela I. Estados, municípios, localidades-tipo, datas e coordenadas geográficas das localidades onde foram realizadas coletas de espécimes da Seção Myzorhynchella de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*).

Estado	Município	Localidade-tipo	Data	Coordenadas (Lat/Long)
MG	Frutal		01/2013	-20,00045 -49,12912
			03/2013	
MG	*Oliveira	<i>An. parvus</i> / <i>An. nigratarsis</i>	07/2014	-20,78944 -44,83722
MG	União de Minas		04/2012	-19,51510 -50,35103
PR	São José dos Pinhais		11/2012	-25,64638 -49,38111
RJ	*Nova Iguaçu		08/2014	-22,78000 -43,45916
RS	Maquiné		01/2012	-29,58944 -50,26222
RS	São Francisco de Paula		01/2012	-29,44111 -50,35833
SC	Campo Alegre		11/2012	-26,11666 -49,04055
SP	Campos do Jordão	<i>An. antunesi</i>	04/2015	-22,69119 -45,50212
SP	*Pereira Barreto		04/2012	-20,55716 -51,01518
SP	Pindamonhangaba/ Campos do Jordão		12/2011	-22,98138 -45,59555
			04/2013	
			12/2013	
SP	*São Paulo	<i>An. niger</i>	07/2012	-23,44972 -46,63555
SP	Tapiraí		09/2014	-23,996667 -47,5125

\* indica locais onde não foram coletadas espécies da Seção Myzorhynchella

Para captura de espécimes adultos, foi utilizada a armadilha de Shannon (SHANNON, 1939) (Fig. 1A) durante os períodos crepuscular e noturno, próximo a criadouros e possíveis áreas de repouso. As fêmeas são atraídas pela luz e presença de humanos, assim pousando nas paredes da armadilha. Estas foram coletadas individualmente em tubos de vidro denominado “tubo Correa” (Fig. 1B) e acondicionadas vivas em caixa de isopor umidificada.



Figura 1. (A) Armadilha de Shannon; (B) Tubo Correa.

Formas imaturas foram coletadas em criadouros naturais com o auxílio de concha entomológica. Cada ponto de coleta foi caracterizado em ficha de campo (Anexo 1) quanto a presença/ausência de vegetação, tipo, sombreamento, turbidez da água, entre outras características para descrição do habitat.

### 3.2. MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO

A preparação dos espécimes para os estudos envolveu a criação em laboratório de progênes a partir de fêmeas obtidas na natureza e de larvas que foram mantidas até a emergência dos adultos. Dessa maneira foi possível obter espécimes para os estudos

morfológicos e moleculares, assim como material testemunho que foi depositado na Coleção Entomológica de Referência da Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (FSP-USP).

As fêmeas capturadas em campo foram alimentadas com sangue para maturação dos ovos e mantidas em uma caixa de isopor contendo algodão embebido em água para manter a umidade por um período de 48 a 60 horas. Após esse período as fêmeas foram anestesiadas individualmente com acetato de etila, identificadas e tiveram uma de suas asas arrancada para induzir a oviposição. Em seguida, a fêmea foi colocada em um recipiente pequeno (50 ml) contendo água mineral ou destilada, onde ocorreu a postura dos ovos (Fig. 2). Após cerca de 48 horas, tempo para formação do embrião, parte dos ovos foi recolhida com auxílio de papel filtro e colocada em solução de Bouin's para uso em microscopia eletrônica de varredura. O restante dos ovos foi mantido até a eclosão das larvas.



Figura 2. Oviposição após remoção de uma das asas da fêmea.

As larvas foram então transferidas para recipientes maiores com capacidade para cerca de 250 ml de água e 20 larvas cada. A alimentação foi feita com mistura de ração para peixes tropicais marca TetraMin® (Tetra Spectrum Brands, Blacksburg, VA), ração para peixe Beta em grânulos TetraMin® e pólen de plantas orgânicas que foram finamente triturados, misturados e homogeneizados. Uma pequena porção dessa mistura foi colocada na superfície da água. A limpeza dos recipientes e troca da água foi realizada diariamente. O mesmo processo foi empregado para imaturos coletados em habitats larvários no campo.

Ao atingirem o quarto estágio, as larvas foram individualizadas em copos plásticos (50 ml) para obtenção de suas respectivas exúvias e as pupas foram colocadas em recipientes plásticos com tampa até a emergência dos adultos. As exúvias de larva e pupa de cada adulto foram mantidas em microtubos, rotulados com código, contendo etanol 80%. Após 24 horas da emergência dos adultos, estes foram mortos com acetato de etila. Uma amostra dos espécimes foi montada em alfinetes entomológicos e o restante, foi armazenado em etanol absoluto em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  ou em sílica gel. Os espécimes preservados em álcool foram utilizados para caracterizar geneticamente as espécies e os espécimes secos para estudo morfológico.

### 3.3. MONTAGEM DO MATERIAL

#### 3.3.1. Adultos

Espécimes adultos foram conservados secos e montados em alfinetes entomológicos (Fig. 3A). Estes foram colados com esmalte incolor no vértice de pequenos triângulos de cartolina, cuja base foi transfixada pelo alfinete. Após montados, os mosquitos foram rotulados indicando procedência, coletor, data e identificação conforme etiqueta (Fig. 3B).

#### 3.3.2. Imaturos

As exúvias de larva de 4<sup>o</sup> estágio e pupa de cada espécime que estavam preservadas em álcool 80% foram submetidas a uma série alcoólica de concentrações crescente (90%, 95% e 100%) por 15 minutos cada. Após a retirada do álcool absoluto, eugenol foi acrescentado por 15 minutos. Cada amostra foi então transferida para uma lâmina com auxílio de pipeta de ponta grossa e uma gota de eugenol. As lâminas foram rotuladas com o código de cada espécime. Seguindo as técnicas de montagem para imaturos de Culicidae, as exúvias foram

então montadas entre lâmina e lamínula em Bálsamo do Canadá (Fig. 3C). Algumas larvas de 4º estágio também foram montadas para as ilustrações, seguindo o mesmo protocolo.

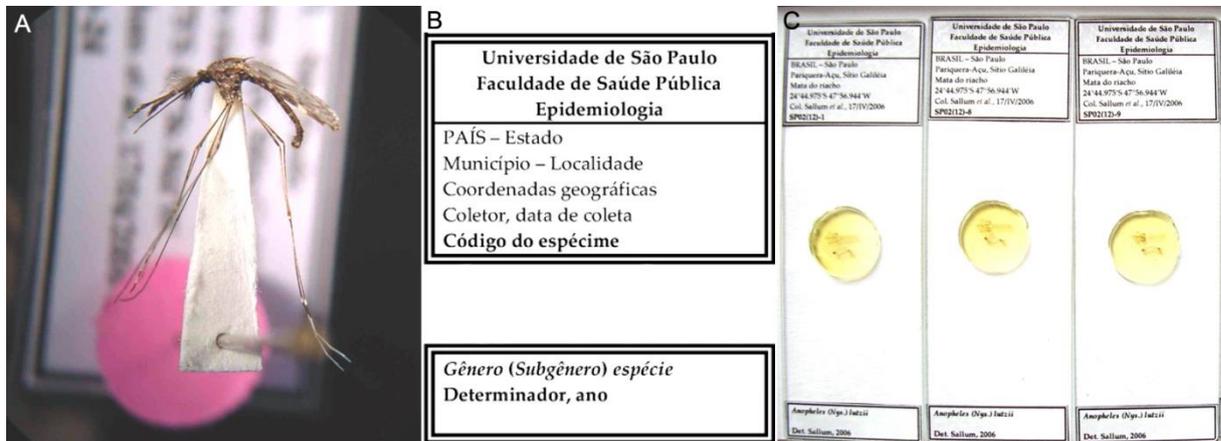


Figura 3. (A) Espécime adulto montado em alfinete; (B) Etiqueta de identificação; (C) Lâminas com exúvias de larvas de 4º estágio e pupas.

### 3.3.3. Genitálias masculinas

Os exemplares machos selecionados para estudo das genitálias tiveram a parte posterior do abdômen removida com auxílio de pinça. Estes foram colocados em solução de hidróxido de potássio (KOH) a 20% em temperatura ambiente por um período de cerca de 12 horas. Posteriormente o KOH 20% foi retirado e colocado álcool acético 20% por 15 minutos. O álcool acético 20% foi substituído por outro, adicionado a este 1 gota de corante (fucsina ácida) por 3 minutos. Em seguida, os abdomens foram submetidos a uma série alcoólica de concentrações crescente (80%, 90%, 95% e 100%) por 15 minutos cada e, por fim, eugenol por mais 15 minutos. As genitálias foram removidas dos abdomens, dissecadas com auxílio de microalfinetes e montadas em Bálsamo do Canadá na mesma lâmina das exúvias de larva e pupa do respectivo espécime.

### 3.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A preparação dos ovos para análise foi realizada na Faculdade de Saúde Pública, onde os mesmos foram quimicamente fixados e desidratados. Após esse processo, os ovos foram montados sobre toros especiais com fita adesiva dupla face em diferentes posições que permitiram a visualização de suas estruturas. Em seguida, os toros foram metalizados cobertos com carbono e ouro. O protocolo seguiu FORATTINI & MARUCCI (1993) e SALLUM et al. (2010). As imagens foram obtidas através de microscópio eletrônico de varredura JEOL 6460LV (JEOL Ltd., Akishima Tokyo, Japan) do Laboratório de Filmes Finos do Departamento de Física Experimental do Instituto de Física da USP. A tabela II mostra as amostras das espécies analisadas.

Tabela II. Espécie, amostra e localidade dos ovos analisados por MEV.

Espécie	Amostra	Localidade (UF)
<i>Anopheles lutzii</i> – Forma 1	RS49(1)	Maquiné (RS)
	RS49(2)	
	RS49(3)	
<i>Anopheles antunesi</i> – Forma 2	RS59(2)	São Francisco de Paula (RS)
	RS59(3)	

### 3.5. ILUSTRAÇÕES E IMAGENS

As ilustrações foram elaboradas com o auxílio de microscópio óptico Leitz Diaplan (Wetzlar, Germany) acoplado a câmara clara. Estes foram digitalizados e finalizados em mesa digitalizadora Wacom Bamboo™ Capture Pen & Touch CTH470 (Wacom Co., Ltd. Saitama, Japan) utilizando o programa Adobe® Photoshop® CS5 (Adobe Systems, Inc., California, EUA). As áreas tracejadas nas ilustrações representam as estruturas que estão sob as outras.

Imagens das asas foram obtidas com câmera digital Canon T2i (Canon inc. Tokyo, Japan) acoplada ao estereomicroscópio Zeiss Stemi SV6 (Jena, Germany). As imagens de

lâminas, genitália masculina e outras estruturas relevantes foram obtidas com câmera digital acoplada ao microscópio óptico Leitz Diaplan, digitalizadas por meio do programa de automontagem Helicon Focus 6.3.5, e posteriormente editadas no programa Adobe® Photoshop® CS5. Imagens do material-tipo foram obtidas através de equipamento da coleção visitada e/ou por câmera digital acoplada ao microscópio.

### 3.6. IDENTIFICAÇÃO

A identificação dos espécimes foi realizada através de chaves dicotômicas propostas por FORATTINI (2002), auxílio das descrições originais e/ou redescrições das espécies e quando possível, por comparação com material-tipo. Devido à dificuldade em separar as espécies da Seção utilizando apenas aspectos morfológicos e considerando os poucos dados na literatura, optou-se por considerar a forma mais semelhante à espécie, como exemplo *Anopheles antunesi* – Forma 1. A correta identificação só foi confirmada mediante estudo molecular.

As espécies foram estudadas com base em caracteres morfológicos de espécimes adultos macho e fêmea, genitália masculina, exúvias de larvas de quarto estágio e de pupa, além dos ovos. Foram também realizadas comparações moleculares, usando sequências da região ITS2 do gene ribossômico e da região “barcode” do gene mitocondrial *COI*, que normalmente são utilizados na identificação de anofelíneos.

### 3.7. ESTUDO MORFOLÓGICO

As coletas de dados morfológicos assim como as análises foram realizadas no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública (LESP/FSP).

### 3.7.1. Material Examinado

Neste estudo foram examinados exemplares de espécies da Seção Myzorhynchella, entre espécimes adultos e imaturos. Também foi analisado todo o material-tipo existente das espécies, com relato sobre seu estado de preservação. A tabela III indica as espécies, o material-tipo e coleções a que pertencem.

Tabela III. Material-tipo observado.

Espécie	Material-tipo	Instituição
<i>Anopheles lutzii</i> Cruz, 1901	3 Síntipos ♀	IOC
<i>Anopheles niger</i> (Theobald, 1907)	Lectótipo ♀	BMNH
<i>Anopheles nigratarsis</i> (Chagas, 1907)	1 Síntipo ♀	BMNH
<i>Anopheles parvus</i> (Chagas, 1907)	Tipo perdido	-
<i>Anopheles guarani</i> Shannon, 1928	Lectótipo ♀	USNM
<i>Anopheles antunesi</i> Galvão & Amaral, 1940	1 Parátipo ♀	FSP
<i>Anopheles pristinus</i> Nagaki & Sallum, 2010	Holótipo ♂	FSP

IOC (Instituto Oswaldo Cruz); BMNH (British Museum of Natural History); USNM (United States National Museum); FSP (Faculdade de Saúde Pública); - (Material não localizado).

### 3.7.2. Descrição e Redescrição

Para estudo dos caracteres morfológicos foram utilizados estereomicroscópio Zeiss Stemi SV6 e microscópio óptico Leitz Diaplan. As redescrições se basearam nos espécimes de diferentes localidades, da localidade-tipo e os em melhor estado de preservação, além do material-tipo. Foram analisados adultos machos e fêmeas, associados aos imaturos, genitália masculina, além de estruturas dos ovos e comparadas às diferenças intraespecíficas e interespecíficas.

Para as espécies mais similares, foi realizada a quetotaxia de larva e pupa apresentadas no Anexo 2 na tentativa de delimitar as espécies.

A terminologia morfológica utilizada neste trabalho para adultos seguiu HARBACH (2015), para as manchas das asas WILKERSON e PEYTON (1990), e para as veias alares, BELKIN (1962). Abreviações para os estágios de vida do mosquito: F, fêmea adulta; M, macho adulto; G, genitália masculina; L, larva; Le, exúvia de larva de quarto estágio; Pe, exúvia de pupa; e E, ovos.

### 3.7.3. Chave dicotômica de identificação

A chave dicotômica de identificação para espécies da Seção Myzorhynchella foi elaborada a partir dos principais caracteres que permitiram diferenciar as espécies nos diferentes estágios de desenvolvimento. No entanto, o caráter diagnóstico para algumas espécies ainda não foi definido devido a semelhança entre as mesmas.

## 3.8. ESTUDO MOLECULAR

Todos os processos de extração, amplificação, sequenciamento e análise das sequências foram realizados no Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública – FSP/USP

### 3.8.1. Extração de DNA

Os espécimes utilizados para extração de DNA estavam preservados em etanol absoluto congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  ou em sílica gel. A extração dos espécimes inteiros foi realizada com o kit QIAGEN DNeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Crawley, United Kingdom), seguindo o protocolo fornecido pela fabricante.

Também foi realizada extração de apenas uma das pernas do espécime com Chelex<sup>®</sup> 100 (Bio-Rad laboratories, Inc., California, USA) para espécies que não continham muitos

exemplares, a fim apenas de confirmar a identificação através do “barcode” e preservá-lo para o estudo morfológico. O protocolo seguiu LAURITO et al. (2013).

### 3.8.2. Amplificação de DNA

O processo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizado utilizando diferentes iniciadores (primers). A tabela IV mostra os óligos iniciadores utilizados no trabalho.

Tabela IV. Primers utilizados no estudo.

Gene	Primer	Sequência	Autor
<i>COI</i>	LCO1490	5' – GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G – 3'	FOLMER et al., (1994)
	HCO2198	5' – TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA – 3'	
<i>ITS2</i>	5.8S	5' – ATC ACT CGG CTC GTG GAT CG – 3'	DJADID et al., (2007)
	28S	5' – ATG CTT AAA TTT AGG GGG TAG TC – 3'	
<i>Catalase</i>	catF3	5' – GAA SGA RTT SGG RWA GTA GTT SG – 3'	REINDEINBACH et al., 2009)
	catR3	5' GRC GKC CRA ART CRG CAT CAA C – 3'	

Os produtos de PCR foram obtidos em reação com volume final de 25µl contendo 1µl de DNA; 2,5 µl tampão 10x PCR (New England Biolabs®); 200 µM de cada dNTPs; 0,5 µl de DMSO; 5 picomoles de cada primer; 2,5 U de Taq DNA Polimerase (New England Biolabs® Inc, Ipswich, MA).

O protocolo de amplificação por PCR consistiu de ciclos de desnaturação, extensão e anelamento conforme tabela V. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium) após a eletroforese.

Tabela V. Ciclos de desnaturação, anelamento e extensão.

Marcadores	Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final	
	1x	40 x			1x	
<i>COI</i>	94°C – 3'	94°C – 1'	55°C – 1'	72°C – 1'	72° C – 7'	10° - ∞
	1x	35 x			1x	
ITS2	94°C – 3'	94°C – 30''	60°C – 30''	72°C – 30''	72° C – 10'	10° - ∞
	1x	40 x			1x	
<i>Catalase</i>	94°C – 2'	94°C – 30''	59°C – 30''	72°C – 30''	72° C – 5'	10° - ∞

### 3.8.3. Purificação e Quantificação de DNA

O excesso de primers, dNTP e de sais presentes no DNA amplificado foram eliminados por precipitação com solução de PEG/NaCl (20% polietileno glicol 800/2.5 M NaCl). Para isso, adicionou-se aos tubos contendo os produtos amplificados igual volume de solução de PEG/NaCl, permanecendo a mistura em incubação por 15 minutos à 37° C. Ao final deste período o material foi centrifugado a 13.200 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente na microcebtrífuga Eppendorf 5415R, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes por centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos à 4° C, com etanol 80%. O etanol residual foi eliminado por evaporação no concentrador à vácuo Eppendorf 5301.

O DNA foi ressuscendido em 25µl de H<sub>2</sub>O ultrapura, deionizada, livre de nucleases e em seguida quantificado por análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium). Utilizou-se o marcador “Low mass DNA™ Ladder” (Invitrogen, Carsbad, CA).

### 3.8.4. Clonagem de ITS2

Após purificação, os produtos amplificados foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega BioSciences, LLC. CA, USA), segundo instruções do fabricante. Em seguida, o produto da ligação foi inserido em células competentes JM109 (Promega) por meio de choque térmico. Os produtos clonados foram amplificados e sequenciados com o mesmo par de primers.

### 3.8.5. Sequenciamento de DNA

As sequências de nucleotídeos de ITS2, *COI* e *Catalase* foram determinadas diretamente dos produtos amplificados, após purificação com PEG/NaCl. As reações de sequenciamento foram conduzidas em ambas as direções utilizando os mesmos primers empregados nas PCRs e kit “ABI Prism<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (PE Applied Biosystems, Warrington, England) com algumas modificações. O volume final foi de 10 µl, contendo 0,5 µl da mistura de enzima-terminadores fluorescentes (Terminator Ready Reaction mix); 2 µl de tampão de diluição 5X (Sequence Dilution-buffer) composto por 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM Tris-HCl, pH 9.0; 3,6 picomoles de cada primer e cerca de 10 ng de cada produto amplificado. As amostras foram colocadas no termociclador, seguindo o protocolo de 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, finalizando em 4°C por tempo indeterminado. Após o término da reação, as amostras foram armazenadas em geladeira ou imediatamente submetidas à etapa de purificação efetuada por cromatografia de gel filtração em colunas de Sephadex<sup>®</sup> G50(GE- Healthcare-Pharmacia, Buckinghamshire, UK).

### 3.8.6. Cromatografia de Gel Filtração

As microcolunas com Sephadex<sup>®</sup> G50 (medium size, GE-Healthcare-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) empregadas na purificação dos produtos pós-sequenciamento foram preparadas no laboratório. Para isto, 1g de Sephadex<sup>®</sup> G50 foi hidratada com 15 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura e mantida em repouso por 4 horas. Após este período o sobrenadante foi removido, adicionando-se novamente 15 ml de água deionizada, permanecendo a resina em repouso por, no mínimo 4 horas. Cerca de 800 µl de resina hidratada foram transferidos para as micro colunas apoiadas em tubos de 1,5 ml. A água intersticial foi eliminada por centrifugação por 2 minutos a 300 rpm.

A seguir, a reações de sequenciamento acrescida de 10 µl de H<sub>2</sub>O deionizada foram aplicadas no topo das colunas que foram novamente centrífugas a 300 rpm por 2 minutos. Os produtos eluídos foram secos em centrífuga a vácuo e armazenados a -20° C ao abrigo de luz, até serem submetidos à eletroforese capilar em um sequenciador ABI3130-XL da Life Technologies.

### 3.8.7. Edição e Alinhamento

As sequências foram editadas utilizando o programa Sequencher<sup>®</sup> versão 5.3 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA) e alinhados utilizando o programa CLUSTAL X versão 2.1. (LARKIN et al., 2007).

### 3.8.8. Análise molecular

Um total de 123 espécimes foram utilizados nas análises, consistindo de 48 sequências do Genbank e 75 do presente estudo (Anexo 3).

Para estimar a distância genética, utilizou-se o programa Mega versão 6 (TAMURA et al., 2013). Matrizes de distância intra e interespecífica foram geradas utilizando o modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980).

As relações filogenéticas do grupo foram reconstruídas utilizando-se a análise Bayesiana no programa Mr. Bayes v 3.1.2 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001). O melhor modelo de evolução para cada um dos genes utilizados foi determinado pelo Akaike Information Criterion (AIC), no programa JModeltest (POSADA, 2008). A análise concatenada dos genes *COI* e *Catalase* foi particionada por gene. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) foi feito em duas corridas simultâneas em análises independentes, partindo de duas diferentes topologias aleatórias, para determinar a melhor amostragem de probabilidade posterior. As topologias foram amostradas a cada 100 gerações. O desvio padrão médio foi utilizado para monitorar a convergência entre as duas corridas. *Anopheles (Nys.) aquasalis* Curry (KC354822) foi utilizado como grupo externo.

### 3.9. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Os mapas com os registros de ocorrência das espécies foram gerados a partir de dados do material observado e registros em literatura. Os dados de coordenadas geográficas foram retirados das etiquetas dos espécimes e citações nos artigos. Para os exemplares sem coordenadas, estas foram obtidas por meio do programa Google Earth (Google Inc., California, EUA). Os mapas foram produzidos com o programa QGIS versão 2.6.1. (QGIS Development Team, Open Source Geospatial Foundation OSGeo). A distribuição por espécie é dada pelo país (letras maiúsculas em negrito), estado (grifado) e seus municípios.

### 3.10. DEPÓSITO DO MATERIAL

Com exceção do material observado diretamente nas coleções BMNH, FSP, IOC e USNM (Tabela III), todo o material coletado e utilizado neste estudo foi depositado na Coleção Entomológica de Referência da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). O material constitui-se de espécimes secos montados em alfinete, machos e fêmeas, e suas respectivas lâminas de exúvias de larva, pupa e genitália masculina. Entre esses, as séries-tipo das novas espécies.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR

#### 4.1.1. Redescrições e Descrições

***Anopheles (Nyssorhynchus) lutzii* Cruz, 1901**

(Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9; Anexos 4, 5 e 6)

*Anopheles lutzii* Cruz, 1901: 423. Três sítipos fêmeas depositados no IOC. Galvão, 1941: 531 (revisão); Forattini, 1962: 430 (morfologia); Gorham et al., 1967: 12 (chave ilustrada de identificação); Belkin et al., 1971: 5 (informação do tipo); Forattini et al., 1998: 256 (descrição dos ovos de população do Vale do Ribeira); Forattini, 2002: 213 (chave de identificação); Nagaki et al., 2011: 374 (redescrição); Bourke et al., 2011: 705 (filogenia molecular); Foster et al., 2013 (filogenia molecular).

*Pyrethophorus lutzii*: Borroul, 1904: 19 (redescrição).

*Myzorhynchella lutzii*: Chagas, 1907: 3; Neiva, 1909: 71 (biologia).

*Myzorhynchella nigra* Theobald, 1907: 78; Chagas, 1907: 3 (sinônimo de *An. lutzii*); Belkin, 1968: 10 (designação lectótipo).

**Diagnose:** O adulto se assemelha as demais espécies da Seção, no entanto pode ser distinguido por marcações na perna anterior que apresenta conjunto conspicuo de escamas claras no ápice da superfície dorsal dos tarsômeros anteriores 1–3, sendo que os tarsômeros 2,3 apresentam escamas claras em mais de 50% do seu comprimento. Na larva de 4º estágio, a cerda 14P é curta, e a cerda 1-II–VII palmada apresenta o ápice dos filamentos hialinos.

**Fêmea:** Redescrição baseada em NAGAKI et al., (2011). Mosquito grande em relação a outras espécies de *Anopheles (Nyssorhynchus)*, de aspecto geral escuro. *Cabeça:* Espaço interocular com um tufo frontal de cerdas brancas e longas e escamas piliformes, claras e decumbentes; vértice com escamas claras espatuladas e decumbentes; pedicelo da antena nua; flagelômero 1 com escamas claras semi-eretas na base da superfície dorsolateral; probóscide coberta por escamas escuras; palpômero maxilar 1 com escamas escuras; palpômeros maxilares 2–4 escuros com escamas brancas no ápice da superfície dorsal; palpômero maxilar 5 com um conjunto de escamas brancas no ápice da superfície dorsal. *Tórax:* tegumento do escudo com coloração geral marrom escuro, com partes mais escuras entre a área dorsocentral e margem lateral; escamas claras, estreitas e decumbentes na região acrostical, dorsocentral e anteriormente a área pré-escutelar; área da fossa do escudo com escamas claras, decumbentes e espatuladas; escamas espatuladas longas na área antealar estendendo posteriormente em direção a área supra-alar; escudo nu anteriormente entre as áreas acrostical e dorsocentral, e

posteriormente à área pré-escutelar; mesoposnoto nu; escutelo com escamas claras espatuladas e longas cerdas na margem posterior; anteptronoto com um conjunto de escamas escuras espatuladas e poucas escamas claras; pleura com conjunto de escamas espatuladas claras e cerdas no mesanepímero superior, mesocatepisterno superior, borda posterior no meio do mesocatepisterno, área pré-espíracular e botão pré-alar. *Asa*: (Anexo 4) veias de escamas escuras com manchas de escamas claras como segue: costa sempre com basal clara, basal escura e pré-umeral escura, umeral clara, umeral escura e pré-setor escura, setor clara, setor proximal escura, setor acessório clara, setor escura distal, subcostal clara, pré-apical escura, pré-apical clara e apical escura; pré-setor clara ausente em 20% das asas examinadas. Veia R clara aproximadamente 0,5 proximal; veia R<sub>1</sub> com manchas setor acessório claro, subcostal claro e pré-apical claro; veia R<sub>2</sub> escura com algumas escamas claras na bifurcação com R<sub>3</sub>; veia R<sub>3</sub> com mancha clara no meio da veia; veia R<sub>s</sub> com algumas escamas claras na base e na junção com R<sub>4+5</sub>; veia R<sub>2+3</sub> escura com algumas escamas claras na base e ápice; veia R<sub>4+5</sub> variável, com escamas claras nas extremidades distal e proximal, conjunto pequeno de escamas escuras na 0,2 proximal e 0,8 distal e escamas claras sobre escamas escuras ao longo da veia, com aspecto geral claro; veia M variável, com manchas claras e escuras; veia M<sub>1+2</sub> escura com escamas claras na base e ápice e um conjunto de escamas claras no meio da veia; veia M<sub>3+4</sub> escura com escamas claras nas extremidades proximal e distal; CuA com escamas brancas em aproximadamente 0,5 proximal; veia CuA<sub>1</sub> com quatro manchas claras intercaladas com três manchas escuras; veia CuA<sub>2</sub> com escamas claras em aproximadamente 0,6 proximal e algumas escamas claras na extremidade distal; veia 1A escura com escamas claras nas extremidades distal e proximal, e um conjunto de escamas claras aproximadamente no meio da veia. *Halter*: escabelo com tegumento claro; pedicelo marrom claro com algumas escamas claras; capitulo coberto de escamas escuras. *Pernas*: coxa anterior com um conjunto de escamas espatuladas claras na parte lateral posterior e longas cerdas na parte anterior; coxa mediana com um conjunto de escamas espatuladas claras e cerdas no ápice e base da superfície lateral, e ápice da superfície posterior; superfície posterior da coxa posterior com duas longas cerdas na parte superior, e algumas escamas espatuladas claras no ápice da superfície lateral; trocânteres anterior, mediana e posterior com escamas claras; tarsômeros anteriores 1–3 com escamas claras apicais na região dorsal, tarsômero 1 com um pequeno conjunto de escamas claras no ápice, tarsômero 2 com 0,7 apical claro, e tarsômero 3 com 0,8 apical claro, tarsômero 4–5 escuro; tarso mediano escuro, tarsômeros 1–2 com poucas escamas claras no ápice; tarsômero posterior 1 com um anel apical de escamas claras, tarsômero 2 com aproximadamente 0,5 apical de escamas claras, tarsômeros 3–5

completamente brancos. *Abdome*: tegumento marrom escuro; segmentos I–VII sem escamas e cobertos de cerdas; esternito VIII com escamas espatuladas escuras no ápice. *Cerca*: coberta de escamas escuras.

**Macho:** Semelhante a fêmea, exceto pelos caracteres que seguem. *Cabeça*: antena plumosa; palpômeros maxilares escuros; escamas semi-eretas nos palpômeros 1 e 2; decumbentes nos palpômeros 3–5; com conjunto de escamas brancas no ápice dos palmômeros 2, 4 e 5. *Asa*: mancha subcostal clara geralmente maior que nas fêmeas; veia R<sub>4+5</sub> com mais escamas claras ao longo da veia. *Abdome*: esternito VIII com raras escamas no ápice; genitália com escamas espatuladas escuras e escamas claras no ápice.

**Genitália masculina:** (Figura 4; Anexo 5) *Segmento VIII*: tergito e esternito raramente com algumas escamas e com longas cerdas. *Segmento IX*: esternito retangular, margem anteromedial e posteromedial sem apodema. *Proctiger*: membranoso mesalmente, fortemente esclerotinado lateralmente, espiculoso dorsalmente; ápice estreito. *Gonocoxito*: superfície tergotalateral coberta com escamas largas e espatuladas; cerda tergomedia presente, duas cerdas apicolaterais e uma cerda apicomésal imediatamente abaixo da base do gonóstilo; cerda parabasal levemente retorcida em forma de gancho no ápice; cerda acessória moderadamente longa, larga, afinando no ápice, terminando em um ápice estreito e pontiagudo; cerda acessória dorsal levemente curvada posteriormente; cerda acessória ventral reta; cerda interna delgada, curvada anteriormente. Superfície externa coberta com escamas brancas. *Gonóstilo*: curvado mesalmente ao longo de todo o comprimento, largo na base, estreito no meio, largo em 0,3 apical; margem dorsal com 9–12 cerdas diminutas; cerda b moderadamente longa; garra do gonóstilo curta, moderadamente esclerotizada, fina. *Claspete ventral*: aproximadamente 0,3 do comprimento do gonocoxito, com formato trapezoidal, sem espículas, ápice estreito, com dois pequenos lobos subapicais surgindo mesalmente; superfície ventral com distintos lobos projetando-se ventralmente, basalmente desenvolvido como um par de grandes lóbulos basais, margem mesal dos lobos basais aproximados, bordeando a fenda medial; fenda medial longa, estendendo ventralmente do ápice à base do claspete ventral, mais esclerotinado no terço posterior. *Claspete dorsal*: um par, curto; pedicelo moderadamente largo, arredondado na base, largo e esclerotinado no ápice. Ápice com duas cerdas ventrais no ápice curvas mesalmente e uma cerda dorsal subapicalmente, sem projeção basomesal, cerda ventral lateral com projeção basomesal fracamente desenvolvida. *Falósoma*: estendendo posteriormente além do claspete ventral, composto de um edeago

central, um par de parâmetros laterais e um par de peças basais; edeago longo, estreito, fortemente esclerotizado lateralmente; folíolos do edeago, subapicais, bem desenvolvidos, formando um ângulo de 45° com o eixo longitudinal, fortemente esclerotizado, com projeções finas semieretas ao longo da superfície lateral; ápice do edeago mais comprido que largo, moderadamente esclerotizada, margem exterior do ápice hialino na altura da inserção dos folíolos; projeção ventromesal média em posição.

**Pupa.** *Cefalotórax:* Tegumento levemente pigmentado, amarelo pálido, com áreas mais escuras nas pernas; probóscide, e palpos maxilares; pina moderada a fortemente pigmentada, de claro a marrom escuro; trompa curta, truncada e dilatada apicalmente em vista lateral (Anexo 6); meato curto; cerdas 1–3-CT curtas; cerda 10-CT geralmente simples (1–3), aciculada, mais longa que 11-CT; cerda 12-CT geralmente simples. *Abdome:* tegumento levemente pigmentado, amarelo pálido; cerda 0-II-VIII diminuta; cerda 1-II, III com ramos médios; cerda 1-IV-VII geralmente simples, longa; cerda 2-I com 1–4 ramos; cerda 3—geralmente dupla (1–3 ramos); cerda 5-IV-VII geralmente simples e tão longa quanto a cerda 1; cerda 6-I geralmente simples, raramente dupla ou tripla; cerda 6-II simples; cerda 7-I com 1–3 ramos, cerda 7-III–V curta, com quatro ou menos ramos; cerda 7-VI, VII simples, longa; cerda 14-IV–VIII diminuta; cerda 9-II–IV sem pigmentação; cerda 9-V–VIII longa e fortemente pigmentada. *Paleta:* mais longa do que larga; cerda 1-P simples; cerda 2-P geralmente simples.

**Larva de 4º estágio.** *Cabeça:* tegumento levemente esclerotizado, com pontos escuros na região posterior do apódema dorsal; dorsomento fortemente esclerotizado, escuro, dente médio largo, pontiagudo, mais forte que os dentes laterais. Cerda 2-C simples, com diminutas acículas; cerda 4-C simples ou com dois ramos, curtos; cerda 7-C menor que 6-C, 6-C menor que 5-C. Colar fortemente pigmentado. *Antena:* com espículas na margem medial, superfície ventral com espículas mais longas; cerda 1-A com 2–4 ramos curtos. *Tórax:* cerdas 1,2-P não estão em tubérculo comum, cerda 1-P com 6–11 folíolos estreitos e pontiagudos, cerda 2-P com 7–15 ramos; cerda 14-P com 2–4 ramos curtos (Fig. 5A ); cerda 1-M plumosa, 17–27 ramos; cerda 3-T com folíolos hialinos; cerdas 9,10-T simples, aciculadas. *Abdome:* tegumento com espículas diminutas na superfície ventral dos segmentos II–VIII; cerda 12-I presente em 20% dos espécimes examinados; cerda 0-II–VII diminuta; cerda 1-I geralmente simples; cerda 1-II–VII palmada, com folíolos pontiagudos e lanceolados, e ápice dos folíolos

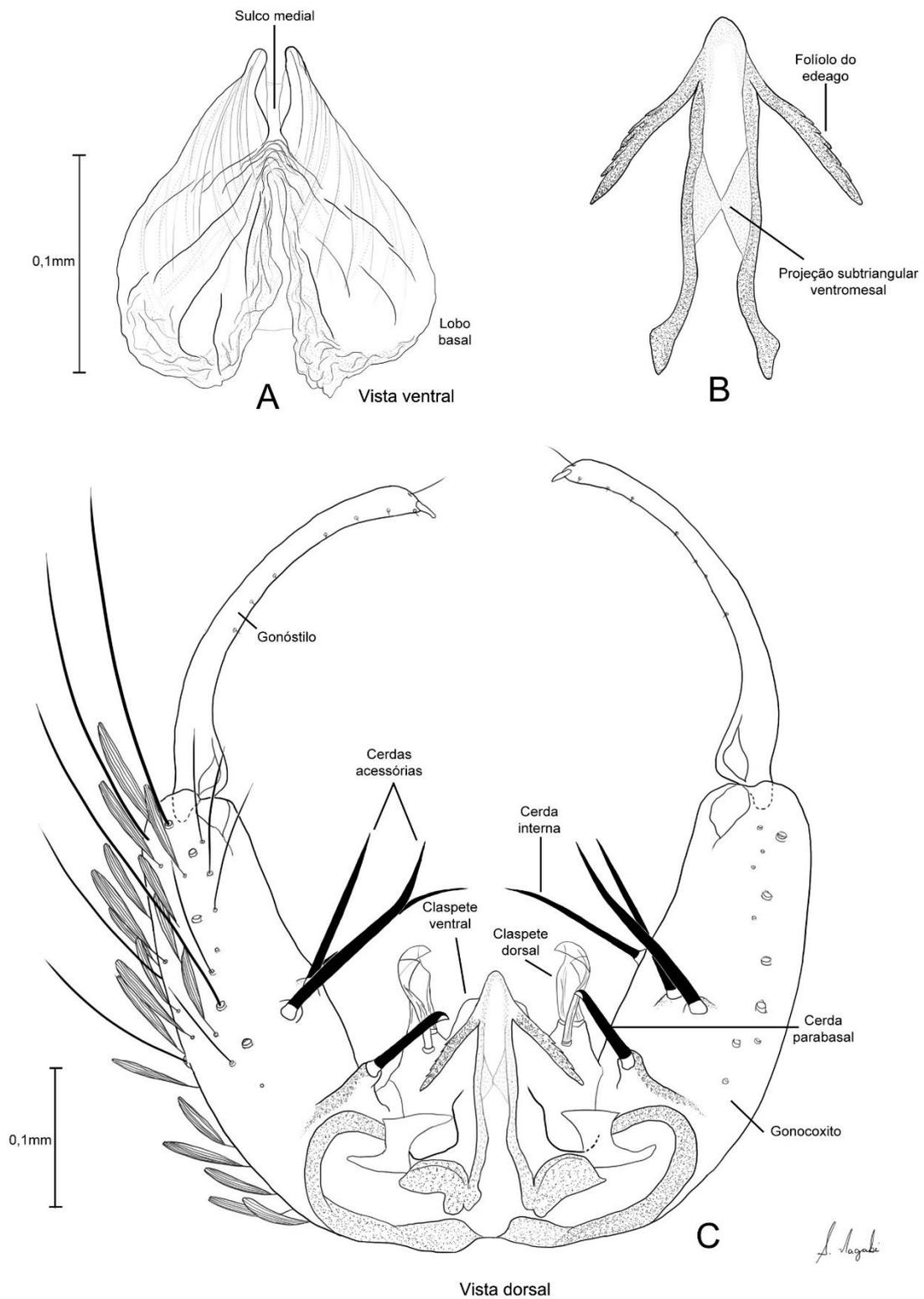


Figura. 4. *Anopheles lutzii*, espécime do município de Pariqueira-Açu, SP. (A) Claspete ventral, vista ventral; (B) Edeago; (C) Genitália masculina, vista dorsal.

mais hialinos (Fig. 5B); cerdas 2-II com 3–5 e 2-III com 2–5 ramos longos; cerda 2-IV simples ou dupla; cerda 5-I com 2–5 ramos, inserido na margem lateral do segmento; cerda 13-IV com 2–5 ramos longos; cerda 13-V maior que 13-IV, com 2–5 ramos; cerda 6-IV dupla, cerda 6-V–VI, simples ou dupla (Fig. 5C); cerda 6-VII geralmente com quatro ramos. Aparelho espiracular largo, abertura espiracular larga (Fig. 5D); pente do pécten com 8–10 longos espinhos, 5–7 espinhos curtos. *Segmento X*: tegumento com finas e pequenas espículas, maiores na margem caudal, cerda 1-X tão longa quanto a sela, inserida próximo a margem ventral da sela.

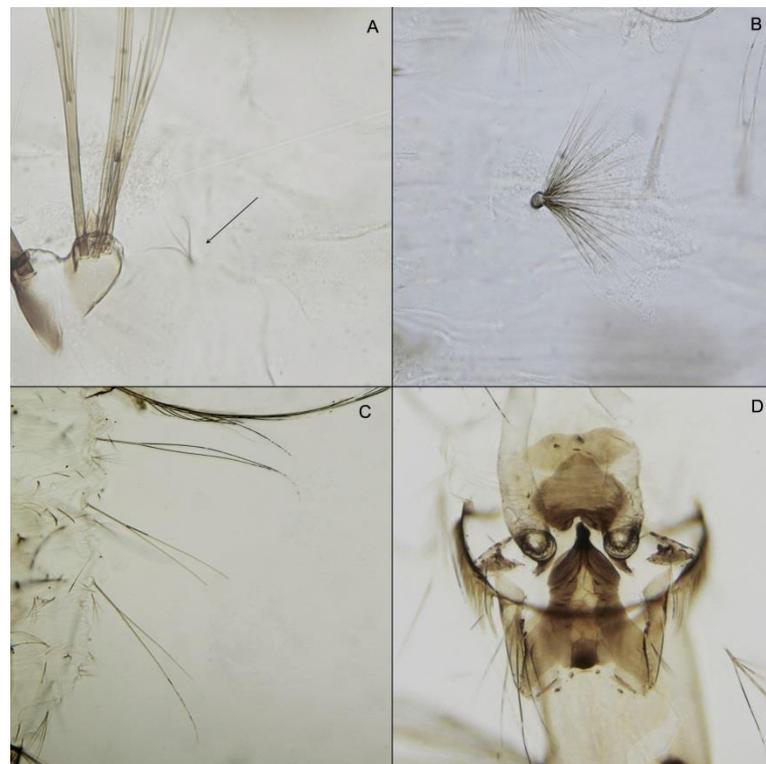


Figura 5. *Anopheles lutzii* do município de Pariqueira-Açu. (A) cerda 14-P; (B) cerda 1-II–VII; (C) cerda 6-IV–VI; (D) placa espiracular.

**Bionomia:** A bionomia de *An. lutzii* é pouco conhecida porque a espécie tem sido identificada ou como *An. guarani* ou outras espécies da Seção Myzorhynchella. Na região do Vale do Ribeira, Mata Atlântica, adultos de *An. lutzii* foram coletados em floresta secundária, em armadilha de Shannon, usando tanto luz quanto atrativo humano, das 18:00 às 21h00 (FORATTINI et al., 1998). A armadilha de Shannon foi colocada na margem da floresta, perto de um córrego rochoso situado no interior da mata. NEIVA (1909) observou que as larvas de tanto *An. lutzii* quanto *An. parvus* foram frequentemente encontrados em pequenos brejos, e os adultos foram capturados alimentando-se em cavalos. PINTO (1930), encontrou a

espécie às 18h00 sugando o homem no interior das matas e às 17h30min à beira de charcos, se alimentando em cavalo. De acordo com o mesmo autor, as casas próximas aos criadouros não eram invadidas pelo mosquito, mesmo durante a noite, o que indicaria ser espécie de hábito exofágico.

**Importância médica:** A importância médica de *An. lutzii* é desconhecida. Pelo fato de *An. lutzii* ter sido encontrado em grande número em Piáu, próximo à Juiz de Fora, Minas Gerais, NEIVA (1909) levantou a hipótese de que a espécie poderia estar envolvida na transmissão de malária. Assim, a importância de *An. lutzii* como um vetor de *Plasmodium* spp. que podem infectar humanos requer estudos adicionais, principalmente porque tem sido identificado erroneamente como outras espécies do subgênero *Nyssorhynchus*.

**Caracterização molecular:** O comprimento da sequência de ITS2 foi constante em 617 pb (sem a região dos primers). As sequências revelaram um único haplótipo que consiste de 20,6% T, 22% A, 26,6% C e 30,8% G. Utilizando o algoritmo BLAST, uma busca FASTA no bando de dados: nucleotide collection – otimizado para: Somewhat Similar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) revelou que sequências de ITS2 de *An. lutzii* compartilham 94% de similaridade com a espécie mais próxima *An. antunesi* dentro de uma cobertura de 88% (Fig. 6)

```

An lutzii   | 150 160 170 180 190 200 210 220 23
An lutzii   | TAGCGAAGC---GCGCGGGTCTCC--GGACCCGGC-GGGCCGAGCTGCGTACTGATGATTTGATTGACGC-----CGTAAAACGCGI
An antunesi | .....CTC.....C..CG.....C.....GCCCCGC..GCGGG..T..
An antunesi | .....CTC.....C..CG.....C.....GCCCCGC..GCGGG..T..

```

Figura 6. Fragmento de alinhamento de sequências de ITS2 mostrando diferenças entre *Anopheles lutzii* e a espécie mais próxima.

**Distribuição geográfica:** (Fig. 7). **BRASIL**, Espírito Santo (MENEGUZZI et al., 2009; CERUTTI Jr et al., 2007); Santa Leopoldina (DEANE et al., 1971); Santa Tereza (REZENDE et al., 2009); Goiás, Goiânia (CARVALHO et al., 1992; NAVES et al., 1998); Cavalcante, Miracema do Norte e Porto Nacional (LUSTOSA et al., 1989); Iporá e Ivolândia (NUNES et al., 2008); Mato Grosso, Chapada dos Guimarães (RIBEIRO et al., 2013); Minas Gerais, Juiz de Fora (NEIVA, 1909); Água Limpa (ROOT, 1927); Paraná, Cambé (LOPES & LOZOVEI, 1996); Guaíra e Santa Helena (FALAVIGNA-GUILHERME et al., 2005); Foz do Iguaçu (CONSOLIM et al., 1993; FALAVIGNA-GUILHERME et al., 2005; GUIMARÃES et al.,

2003; RACHOU & RICCIARDI, 1951); Morretes (SANTOS-NETO & LOZOVEI, 2008); São Miguel do Iguçu (ARAUJO et al., 2014; FALAVIGNA-GUILHERME et al., 2005); Andirá, Araiporanga, Araucária, Bandeirantes, Bocaiuva do Sal, Campo Largo, Carlópolis, Castro, Cerro Azul, Clevelândia, Congoinhas, Curiuva, Guarapuava, Ibatí, Imbituva, Ipiranga, Jacarezinho, Jaguariaiva, Joaquim Távora, Lapa, Laranjeiras do Sul, Londrina, Madaguari, Mangueirinha, Morretes, Palmas, Palmeira, Tiraí do Sul, Ponta Grossa, Precatu, Prudentópolis, Quatiguá, Reserva, Ribeirão Claro, Ribeirão do Pinhal, Rio Branco do Sul Rio Negro, Santa Mariana, Santo Antonio do Platina, São José dos Pinhais, São Mateus do Sul, Sengês, Sertanópolis, Siqueira Campos, Teixeira Soares, Tibagi, Timoneira, Tomazina, União da Vitória, Uraí, Wenceslau Braz; (RACHOU & RICCIARDI, 1951); Pernambuco, Recife (ARAGÃO et al., 2010); Rio de Janeiro, Derrubadas (CARDOSO et al., 2004); Itaguaí (GUIMARÃES et al., 1989); Nova Iguaçu (ALENCAR et al., 2011); Rio de Janeiro; (CRUZ, 1901; NEIVA, 1909); Teresópolis (GUIMARÃES & ARLÉ, 1984); Rio Grande do Sul, Maquiné (CARDOSO et al., 2011); São Francisco de Paula (PINTO et al., 1940); Taquara (PINTO, 1932); Santa Catarina (FAVRETTO et al., 2013); Florianópolis (ARAGÃO et al., 1973; PORTES et al., 2010; RACHOU & FERRAZ, 1951); Palhoça (COUTINHO et al., 1944; RACHOU & FERRAZ, 1951); Joinvile (DEANE et al., 1971; RACHOU & FERRAZ, 1951); São Domingos (MARCONDES et al., 2006); Biguaçu, Capinzal, José Boiteux e Peritiba (PORTES et al., 2010); São José (PORTES et al., 2010; RACHOU & FERRAZ, 1951); Blumenal, Brusque, Imaruí, Indaial, Itaiópolis, Itajaí, Jaraguá do Sul, Mafra, Nova Trento, Orleães, São Franciso do Sul, Tubarão (RACHOU & FERRAZ, 1951); São Paulo (GUIMARÃES et al., 2001; TUBAKI et al., 1999); Avaré, Cerqueira Cesar (LANE, 1936); Jucitiba (KIRCHGATTER et al., 2014); Pariquera-Açu (FSP); (FORATTINI et al., 1995; 1998; NAGAKI et al., 2011); Perú (BASSERES, 1943); Rifaina (LANE, 1935); São Paulo (DEANE, 1967; 1971; DUARTE et al., 2013); São José do Barreiro (GUIMARÃES et al., 2000); Salesópolis (FORATTINI et al., 1968); Sertãozinho e Araraquara (PINTO, 1930); Tocantins, Palmas (PARISE, 2014); Porto Nacional (ANDRADE et al., 2006); **ARGENTINA**, Corrientes, San Miguel Loreto (ROSSI et al., 2006); Misiones, Montecarlo, Eldorado, Arroyo Piray-Guazú, Puerto Piray, Los Helechos (BEJARANO & DURET, 1949); Cataratas (DURET, 1948); **BOLIVIA**, Guayaramerin (QUISPE, 2009); La paz (LARDEUX et al., 2009); **PERU**, Puno (CALDERÓN et al., 1995). *Anopheles niger*: **BRASIL**, São Paulo, Cantareira (BMNH); **GUIANA INGLESA**, Yupukari (AIKEN, 1909)

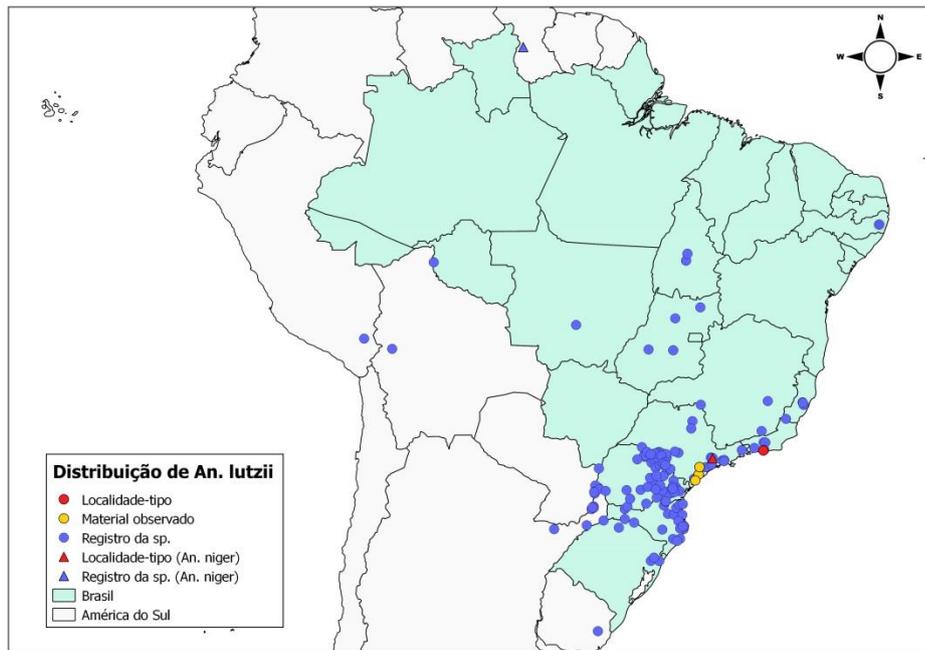


Figura 7. Mapa da distribuição geográfica de *Anopheles lutzii* na América do Sul. O mapa foi construído com dados obtidos na literatura e material observado.

**Material examinado:** *Material-tipo.* BRASIL, Rio de Janeiro, Lagoa Rodrigo de Freitas. Síntipos: 3 fêmeas e uma lâmina de asa removida de uma das fêmeas (IOC). *Outro material.* BRASIL, São Paulo, Pariquera-Açu, Sítio Galiléia (24°44.975'S 47°56.944'W), Sallum et al. coll., 17-IV-2006, Sallum det., 2006, progênie de fêmeas coletadas em armadilha de Shannon (FSP): SP02(9)-1 [LePe], SP02(9)-5 [MLePeG], SP02(9)-8 [FLePe], SP02(9)-9 [MLePe], SP02(9)-11 [F], SP02(9)-12 [M], SP02(9)-14 [M], SP02(9)-15 [LePe], SP02(9)-16 [F], SP02(9)-17 [F], SP02(9)-19 [M], SP02(9)-101 [M], SP02(9)-102 [F], SP02(10)-2 [MLePeG], SP02(10)-6 [MLePeG], SP02(10)-10 [MLePe], SP02(10)-11 [FLePe], SP02(10)-13 [MLePe], SP02(10)-20 [M], SP02(10)-21 [F], SP02(10)-24 [M], SP02(10)-25 [M], SP02(10)-101 [M], SP02(11)-2 [MLePeG], SP02(11)-4 [MLePe], SP02(11)-6 [LePe], SP02(11)-7 [M], SP02(11)-11 [MLePe], SP02(11)-12 [M], SP02(11)-13 [M], SP02(11)-14 [F], SP02(11)-15 [M], SP02(11)-16 [MLePe], SP02(11)-19 [M], SP02(11)-20 [F], SP02(11)-22 [F], SP02(11)-26 [M], SP02(11)-107 [M], SP02(11)-108 [M], SP02(12)-4 [MLePeG], SP02(12)-6 [MLePe], SP02(12)-7 [MLePe], SP02(12)-8 [LePe], SP02(12)-10 [LePe], SP02(12)-11 [F], SP02(12)-12 [F], SP02(12)-13 [M], SP02(12)-17 [F], SP02(13)-1 [MLePeG], SP02(13)-2 [M], SP02(13)-4 [M], SP02(13)-5 [F], SP02(13)-6 [M], SP02(13)-7 [LePe], SP02(13)-8 [M], SP02(13)-11 [LePe], SP02(13)-12 [LePe], SP02(13)-13 [LePe], SP02(14)-1 [M], SP02(14)-2 [F], SP02(14)-4 [F], SP02(14)-7 [M], SP02(14)-9 [LePe], SP02(14)-10 [LePe], SP02(14)-12,

SP02(14)-101 [F], SP02(14)-102 [M], SP02(15)-2 [M], SP02(15)-6 [LePe], SP02(15)-8 [LePe], E-13197 [LePeG], E-13198 [LePeG], E-13199 [LePeG], E-13200 [LePeG], E-13201 [LePeG], E-13202 [LePeG], E-13203 [LePeG], E-13216 [LePe], E-13217 [LePeG], E-13218 [LePe], E-13219 [LePe], E-13220 [LePe], E-13221 [LePe], E-13222 [LePe], E-13223 [LePe], E-13224 [LePe], E-13225 [LePeG], E-13226 [LePeG], E-13227 [LePe], E-13228 [LePe], E-13229 [LePe], E-13230 [LePe], E-13231 [LePe], E-13232 [LePeG].

*Material-tipo Anopheles niger*: BRASIL, São Paulo, Cantareira, 9-XI-04, lectótipo [F]; Brasil, paralectótipo [M]; MÉXICO, paralectótipos [2F].

### **Material-tipo – Estado de conservação**

#### ***Anopheles lutzii***

Coleção do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – Rio de Janeiro, Brasil.

Coleção Costa Lima

Procedência: Lagoa Rodrigo de Freitas – Rio de Janeiro

Exemplares: Três sítipos representados por adultos fêmeas com número de registro 1965, guardadas no frasco de vidro, número 993. Uma Lâmina com a asa direita, depositada sob o número 2111.

A observação dos três exemplares revelou que eles estão em estado imperfeito de conservação com algumas estruturas danificadas. Os espécimes adultos não foram rotulados, estão montados em alfinetes entomológicos que foram inseridos na porção ventral do tórax, entre as pernas do inseto (Fig. 8B). Na parte externa do frasco de vidro existe um rótulo escrito à mão, com tinta nanquim, do qual constam os dados de depósito na coleção (Fig. 8C). Vale assinalar que existe uma data assinalada tanto no frasco com os adultos como na lâmina que é VII de 1934. No entanto, não existe informação sobre a mesma, ou seja, não é possível saber se seria a data de depósito na Coleção.



Figura 8. Síntipos de *An. lutzii*. (A) Lâmina da asa direita, corada com fucsina ácida, que foi removida do exemplar 1; (B) Exemplares montados em alfinete entomológico; (C) Rótulo no frasco de vidro onde se encontram os espécimes adultos.

*Síntipo 1*: Este exemplar não tem a asa direita que foi removida, corada com fucsina ácida e montada entre lâmina e lamínula. Faltam as duas pernas anteriores e as antenas. As escamas do escudo e da pleura foram perdidas, a asa esquerda está danificada entre os setores radial e mediano e proximal à veia 1A.

*Síntipo 2*: Ausência da antena esquerda, perna anterior esquerda, pernas medianas direita e esquerda, e perna posterior esquerda. Não possui escamas no escudo e na pleura. Restam nas asas algumas escamas, o que torna difícil o reconhecimento das características específicas.

*Síntipo 3*: O espécime possui poucos segmentos na antena esquerda, ausência do abdome, perna anterior direita, pernas mediana e posterior esquerda. Da perna posterior direita restam apenas o fêmur e a tíbia. A asa esquerda está muito danificada. Não possui escamas no escudo e pleura, e na asa direita restam poucas escamas.

*Lâmina*: Asa direita foi corada com fucsina ácida e montada entre lâmina e lamínula (Fig. 8A). Na lâmina foram colados dois rótulos contendo informações sobre a procedência do espécime, data de coleta ou do depósito na coleção e de identificação. O rótulo foi escrito à mão, pela mesma pessoa que escreveu aquele colado no tubo de vidro com os adultos. Não constam dados sobre os coletores e quem identificou os exemplares.

***Anopheles niger***

Coleção: Natural History Museum (BMNH) – Londres, Inglaterra.

Procedência: Cantareira – Brasil (Lectótipo), Brasil (1 Paralectótipo), México (2 paralectótipos)

Exemplares: Lectótipo representado por adulto fêmea, e três paralectótipos representados por dois adultos fêmeas e um macho.

Duas lâminas: uma com a asa direita, e outra com a cabeça e o abdômen do exemplar macho em alfinete.

A observação dos quatro exemplares revelou que estão em estado imperfeito de conservação com muitas estruturas danificadas.

*Lectótipo*: (Fig. 9A). Exemplar fêmea, montado em alfinete entomológico inserido na porção ventral do tórax. Espécime não possui asa direita, perna mediana direita, perna posterior esquerda, tarsos da perna mediana esquerda e 4° e 5° tarsômeros da perna posterior direita. As escamas do centro do escudo foram perdidas. Dados dos rótulos:

*Paralectótipo 1*: (Fig. 9B). Exemplar fêmea, montado em alfinete entomológico inserido na porção ventral do tórax. Espécime sem antena esquerda e palpos maxilares, ausência das pernas anterior e mediana esquerdas, e tarsômeros 4 e 5 da perna anterior direita. Abdome solto colado à base.

*Paralectótipo 2*: (Fig. 9C). Exemplar macho, montado em alfinete entomológico inserido na porção ventral do tórax. Espécime sem cabeça, abdômen e asa direita, possui escudo quebrado, não possui perna mediana direita. Lâmina 1: asa direita do lectótipo. Lâmina 2: cabeça e abdômen do paralectótipo 3.

*Paralectótipo 3*: (Fig. 9D). Exemplar fêmea, montado em alfinete entomológico inserido na porção lateral do tórax. Espécime sem antena direita, asas, abdômen, escudo quebrado na região dorsal, ausência da perna anterior direita, perna mediana direita e pernas posterior direita e esquerda, tarsômeros da perna mediana esquerda e perna anterior esquerda possui apenas o fêmur.

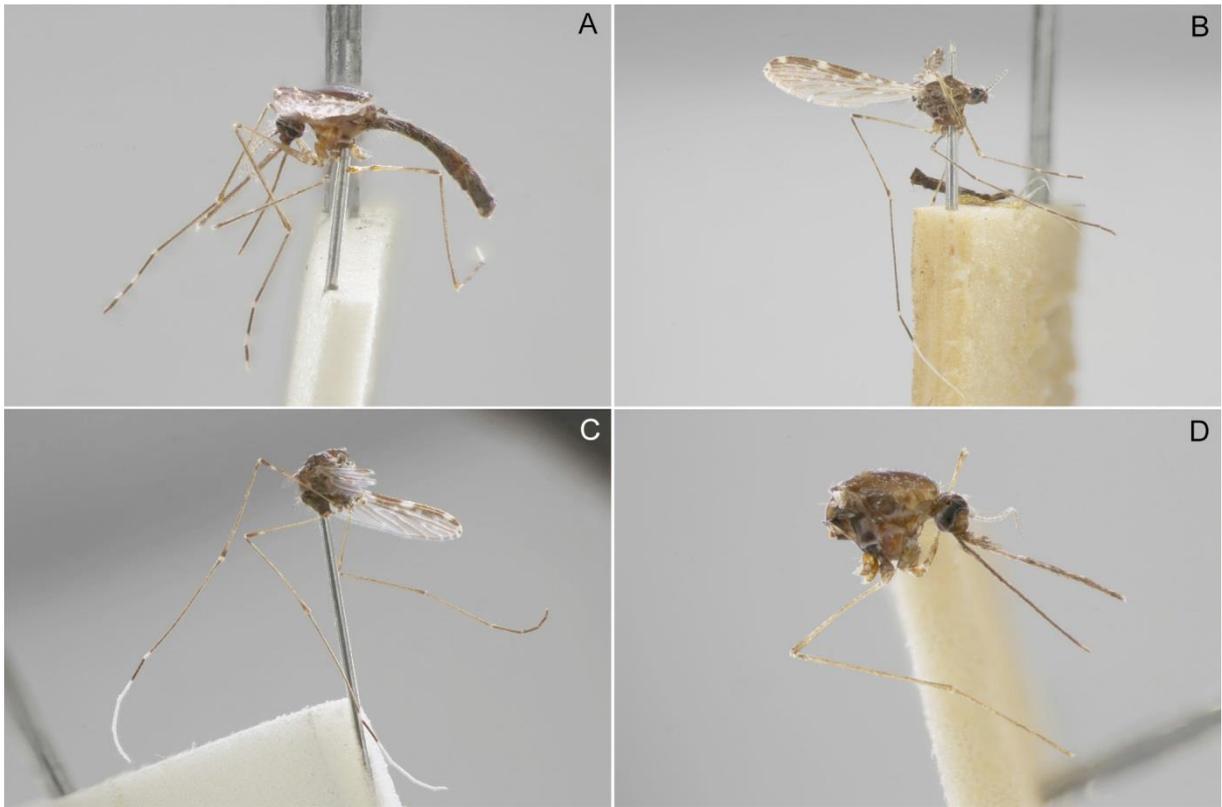


Figura 9. Material-tipo de *Anopheles niger*. (A) Lectótipo; (B) Paralectótipo 1; (C) Paralectótipo 2; (D) Paralectótipo 3.

***Anopheles (Nyssorhynchus) nigratarsis* (Chagas, 1907)**

(Figuras 10 e 11; Anexos 4)

*Myzorhynchella nigratarsis* Chagas, 1907: 12. Sítipo fêmea depositado no BMNH.

*Anopheles nigratarsis*: Belkin et al., 1971: 6 (informações do tipo); Forattini, 2002: 213 (chave).

**Diagnose:** É a única espécie da Seção *Myzorhynchella* que possui o tarso posterior com anel basal de escamas escuras nos tarsômeros 3 e 4.

**Fêmea:** *Asa* (Anexo 5): veias de escamas escuras com pequenas manchas de escamas claras, aspecto geral bem escuro; veia costa sem setor claro; veia R<sub>4+5</sub> com escamas claras nas extremidades distal e proximal, conjunto pequeno de escamas escuras na 0,2 proximal e 0,8, com duas manchas pequenas de escamas claras em 0,3 proximal e 0,7; veia CuA<sub>2</sub> com escamas claras em aproximadamente 0,3 proximal e algumas escamas claras na extremidade distal. *Pernas*: tarsômeros anteriores 1–2 com pequena marcação apical de escamas claras na superfície dorsal; tarsômero posterior 1 com um anel apical de escamas claras, tarsômero 2 com aproximadamente 0,3 apical de escamas claras, tarsômeros 3 claro com anel basal de escamas escuras, tarsômero 4 claro com anel basal de escamas escuras, tarsômero 5 completamente branco. *Abdome*: segmentos abdominais cobertos de cerdas e sem escamas. *Cerca*: coberta de escamas.

Observações: os caracteres observados podem variar, pois apenas 2 espécimes foram observados.

**Macho:** Desconhecido

**Pupa:** Desconhecida

**Larva:** Desconhecida

**Ovo:** Desconhecido

**Bionomia:** Desconhecida

**Importância médica:** Desconhecida

**Distribuição geográfica:** (Fig. 10.) **BRASIL**, Mato Grosso, Sinop (MISAWA et al., 2011); Minas Gerais (NEIVA, 1909); Paraná, Carlópolis (RACHOU & RICCIARDI, 1951); Tocantins, Palmas (PARISE, 2014); **ARGENTINA**, Misiones, Eldorado (BEJARANO & DURET, 1949).

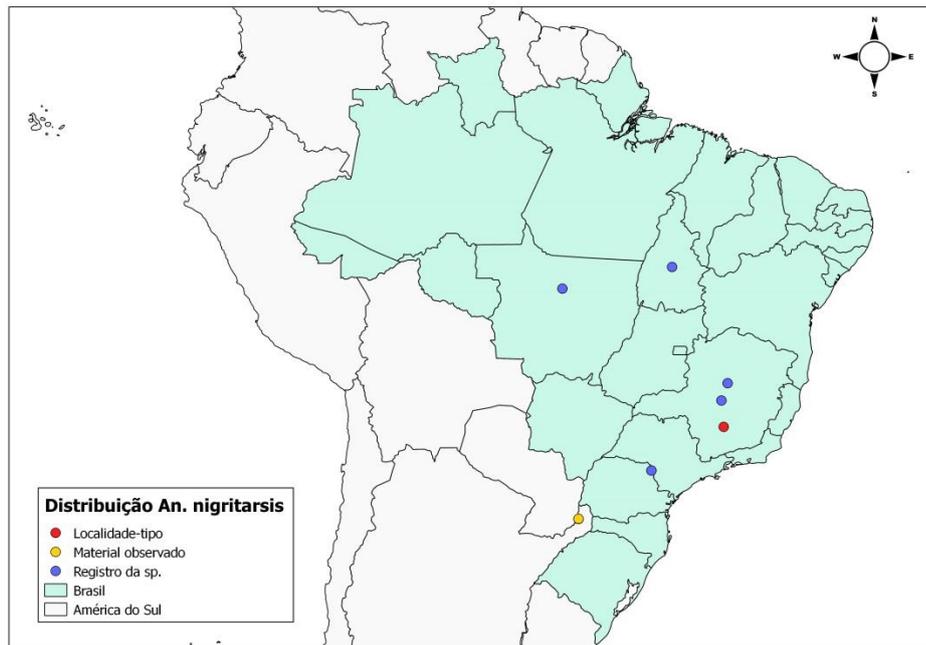


Figura 10. Mapa da distribuição geográfica de *Anopheles nigritarsis* na América do Sul. O mapa foi construído com dados obtidos na literatura e material observado.

**Material examinado.** *Material-tipo:* BRASIL, Síntipo, 20-XI-1906, (BMNH), [F]. *Outro material:* ARGENTINA, Província de Misiones, município de Eldorado, Duret coll., 1-X-1948, Duret det, 1968, (USNM), [F].

#### **Material-tipo – Estado de conservação**

Coleção: Natural History Museum (BMNH) – Londres, Inglaterra.

Procedência: Brasil

Exemplar: Síntipo representado por um adulto fêmea, montado em quatro lâminas: abdome (Fig. 11A), asa (Fig. 11B), perna anterior (Fig. 11C) e perna posterior (Fig. 11D).

A observação das estruturas é de difícil visualização dos detalhes por se encontrar montados entre lâmina e lamínula.

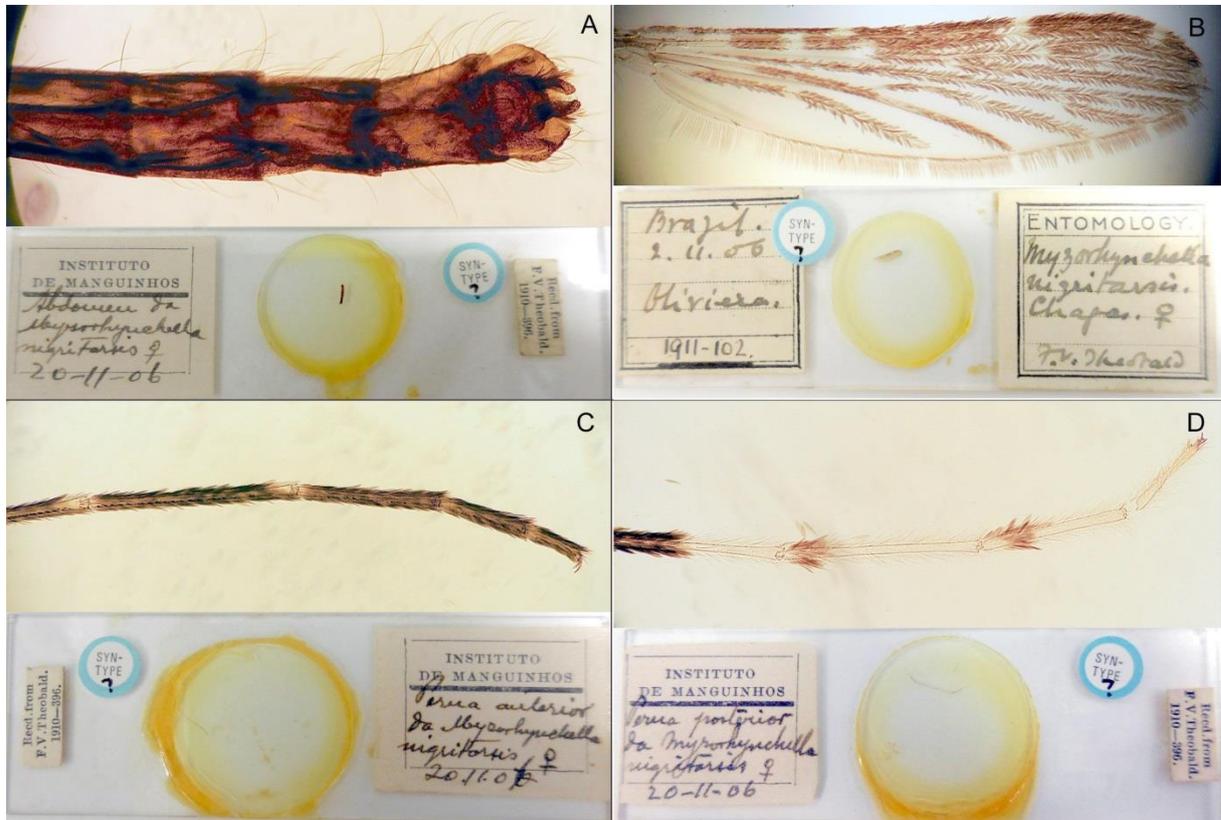


Figura 11. Síntipo de *Anopheles nigritarsis*. Todas as estruturas estão montadas sob lâmina e lamínula. (A) Abdome; (B) Asa; (C) Perna anterior; (D) Perna posterior.

***Anopheles (Nyssorhynchus) parvus* (Chagas, 1907)**

(Figuras 12, 13,14 e 15; Anexos 4, 5 e 6)

*Myzorhynchella parva* Chagas, 1907: 4. Material-tipo desconhecido. Peryassú, 1908: 331 (descrição larva); Neiva, 1909: 71 (biologia).

*Anopheles parvus*: Root, 1927: 599 (morfologia); Galvão, 1941: 541 (redescrição); Forattini, 1962: 428 (morfologia); Gorham et al., 1967: 12 (chave ilustrada); Belkin et al., 1971: 6 (informações do tipo); Forattini et al., 1998: 260 (descrição dos ovos); Forattini, 2002: 213 (chave); Bourke et al., 2011: 705 (filogenia); Foster et al., 2013 (filogenia).

**Diagnose.** O adulto pode ser facilmente diferenciado por características das manchas da asa, na veia R<sub>4+5</sub>, que apresenta três manchas escuras, uma sub-basal, outra mediana e a terceira, sub-apical bem delimitadas e a veia CuA<sub>1</sub> com duas manchas escuras além de apresentar escamas no VIII segmento abdominal. Na genitália masculina, o proctiger é bastante espiculoso, a porção apical do edeago se apresenta em forma de gancho e as cerdas acessórias possuem ápice curvado. Na pupa, a trompa é estreita e a cerda 1-P é bastante longa em relação as outras espécies.

**Fêmea.** Mosquito de tamanho pequeno e de coloração acinzentada. *Tórax*: tegumento do escudo com coloração cinza, com partes mais escuras, de coloração negra em formato de pequenos círculos entre a área dorsocentral e margem lateral; escamas claras, estreitas e decumbentes na região acrostical, dorsocentral e anteriormente a área pré-escutelar; escutelo mais escuro na área central. *Asa*: (Anexo 4), veia R clara aproximadamente 0,4 proximal; veia R<sub>3</sub> com mancha escamas claras nas extremidades; veia R<sub>4+5</sub>, com escamas claras nas extremidades distal e proximal, conjunto pequeno de escamas escuras na 0,2 proximal e 0,8 distal, e com duas manchas de escamas claras bem definidas em 0,3 proximal e 0,7; veia M<sub>1+2</sub> escura com escamas claras nas extremidades; CuA com escamas brancas em aproximadamente 0,8 proximal; veia CuA<sub>1</sub> com três manchas claras intercaladas com duas manchas escuras. *Pernas*: tarsômeros anteriores 1–3 com pequena marcação apical de escamas claras na região dorsal, tarsômero 4–5 escuro; tarso mediano escuro, tarsômeros 1–2 com poucas escamas claras no ápice; tarsômero posterior 1 com um anel apical de escamas claras, tarsômero 2 com aproximadamente 0,6 apical de escamas claras, tarsômeros 3–5

completamente brancos. *Abdome*: tegumento escuro; segmentos I–VII sem escamas e cobertos de cerdas; tergito e esternito VIII com escamas espatuladas claras. *Cerca*: coberta de escamas escuras e escamas claras no ápice.

**Genitália masculina.** (Fig. 12; Anexo 5). *Segmento VIII*: tergito e esternito com escamas estreitas espatuladas e com cerdas. *Proctiger*: membranoso medialmente, com muitas espículas em toda a superfície na metade apical. *Gonocoxito*: cerda interna muito fina, quase tão fina quanto a cerda apicalesal, levemente curvada em 0,3 apical; cerdas acessórias longas, largas, ápice curvado; cerda parabasal reta, terminando em um ápice estreito e pontiagudo. *Gonóstilo*: curvado mesalmente ao longo de todo o comprimento, largo na base, estreito no meio, largo em 0,3 apical; margem dorsal com aproximadamente 12 cerdas diminutas; garra do gonóstilo curta, moderadamente esclerotizada. *Claspete ventral*: ápice arredondado e estriado. *Claspete dorsal*: três cerdas surgindo apicalmente, cerdas largas, curvadas no ápice. *Falósoma*: edeago longo, esclerotizado, porção apical hialina, afinando em direção ao ápice, terminando em um ápice muito estreito, esclerotizado e curvado em forma de gancho, com um par de folíolos subapicais, folíolos bem desenvolvidos e de margens lisos, quase paralelos ao edeago.

**Pupa.** *Cefalotórax*: trompa longa e estreita, moderada a fortemente pigmentada; pina aproximadamente 0,8 do comprimento da trompa (Anexo 6). *Abdome*: cerda 5-I simples e muito longa; cerda 1-II–III ramificada, 1-III geralmente com 3 longos ramos; cerda 1-IV–VII geralmente simples, pigmentadas, muito longas, alcançando o segmento seguinte; cerda 5-III ramificada, curta; cerda 5-IV geralmente com 2 ramos; cerda 5-V–VII simples, pigmentada, longas, não tanto quanto a cerda 1 do mesmo segmento; cerda 14-IV–VIII diminuta; cerda 9-II–III sem pigmentação, diminutas; cerda 9-IV curta e pigmentada; cerda 9-V–VIII longas e fortemente pigmentadas. *Paleta*: fracamente pigmentada, mais longa do que larga, cerda 1-P simples, fortemente pigmentada, e muito longa; cerda 2-P simples e fina.

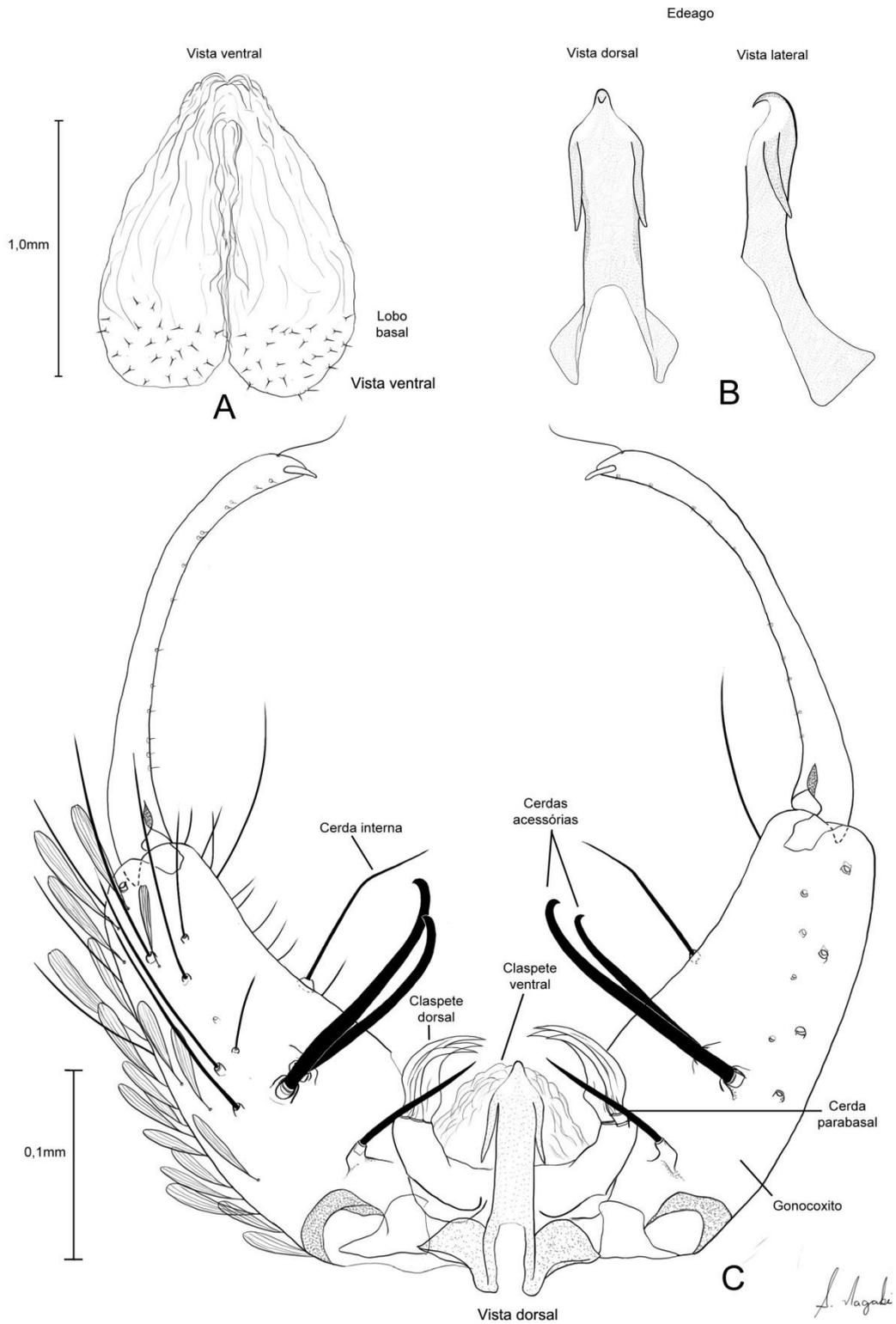


Figura 12. *Anopheles parvus*, espécime do município de Campo Belo, MG. (A) Claspete ventral, vista ventral; (B) Edeago, vistas dorsal e lateral; (C) Genitália masculina, vista dorsal.

**Larva de 4º estágio.** *Cabeça:* tegumento moderadamente esclerotizado; cerda 4-C simples ou com dois ramos, longa, alcançando a base de 2-C; cerda 8-C simples; colar fortemente pigmentado. *Antena:* com espículas, superfície ventral com espículas mais longas; cerda 1-A com ramos longos. *Tórax:* cerda 1,2-P não estão em tubérculo comum; cerda 14-P geralmente com 4–5 ramos longos (Fig. 13A); cerda 3-T com folíolos bem hialinos; cerdas 9, 10-T simples, lisas. *Abdome:* cerda 0-II–VII diminuta; cerda 1-I geralmente com mais de 5 ramos; cerda 1-II–VII palmada, com folíolos pontiagudos, bem quitinizada (Fig. 13B); cerda 2-II–III geralmente com mais de 5 ramos longos; cerda 2-IV geralmente simples; cerda 6-IV–V com 3 ramos, 6-VI com mais de 4 ramos (Fig. 13C). Aparelho espiracular largo, abertura espiracular larga (Fig. 13D). *Segmento X:* tegumento com finas e pequenas espículas, maiores na margem basal, cerda 1-X tão longa quanto a sela, inserida próximo a margem ventral da sela.



Figura 13. *Anopheles parvus*. (A) cerda 14-P; (B) cerda 1-II–VII; (C) cerda 6-IV–VI; (D) placa espiracular.

**Ovos.** Segundo Forattini et al. (1998). *Aparência geral.* Cor preto; em forma de barco em vista ventral, lateral e dorsal; extremidade anterior 0,3 mais larga que a extremidade posterior com notável estrutura em forma de coroa em torno da micrópila e estrutura em forma de dedo, que é ventral a micrópila. *Superfície Ventral.* Flutuadores amplos em vista ventral, convés completamente cercado pelos flutuadores. Convés um tanto elíptico no contorno, levemente

mais largo na parte do meio do ovo, e uniformemente coberto com tubérculos. *Superfícies lateral e dorsal*. Células coriônicas externas do plastrão dorsal indistinta, superfície dorsal uniformemente coberta com pequenos tubérculos um tanto arredondados geralmente conectados por pequenas pontes e separados por lacunas. Flutuadores posicionados na direção do lado ventral, flutuadores mal visíveis em vista dorsal; em vista lateral, flutuadores longos e estreitos, estendendo de 0,25 anterior a 0,9 posterior, e amplamente unidos ambos anteriormente e posteriormente em superfície ventral, gomos dos flutuadores não contável, gomos fracamente divididos em lobos, parede interior fortemente estriada.

**Bionomia.** NEIVA (1909), encontrou larvas em pequenos brejos, e os adultos foram capturados alimentando-se em cavalo. ANTUNES & LANE (1933), coletaram três adultos na mata à tarde picando o homem, junto à margem de um riacho pouco volumoso. De acordo com GORHAM et al. (1967) as larvas se criam em água limpa, com sombra e pouca vegetação aquática, em buracos em rochas e córregos em matas nas montanhas. Adultos são zoofílicos, raros nas habitações, mas picam humanos quando fora das casas.

**Importância médica.** A espécie não é conhecida como sendo de importância médica. No entanto, NEIVA (1909) julga a espécie suspeita de transmitir malária, devido seu predomínio em Juiz de Fora, Minas Gerais. Além disso é suspeito como vetor secundário de malária na Bolívia de acordo com GORHAM et al. (1967).

**Caracterização molecular:** O comprimento da sequência de ITS2 foi de 600 pb (sem a região dos primers). As sequências revelaram haplótipo que consiste de 22,2% T, 22,5% A, 28% C e 27,3% G. Utilizando o algoritmo BLAST, uma busca FASTA no bando de dados: nucleotide collection – otimizado para: Somewhat Similar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) revelou que sequências de ITS2 de *An. parvus* compartilham 97% de similaridade com a espécie mais próxima *An. atacamensis* dentro de uma cobertura de 23% (Fig. 14).

```

      140      150      160      170      180      190      200      210      220
An parvus  GCAAACCCCACTGGTAGCTGGTCCCCATCTACCGTGTACTGATGATGATGGTGGCCCGTCTCACGTCTCCCTTTGCTGGGTGTGGGT
An parvus  .....
An atacamensis ...T.T.G...A.CGA...G.....G..C..C.CCC.TCG.ACCCG...AGCTG...ACTGA.GCAT..AT..ACGCC..
An atacamensis ...T.T.G...A.CGA...G.....G..C..C.CCC.TCG.ACCCG...AGCTG...ACTGA.GCAT..AT..ACGCC..

```

Figura 14. Fragmento de alinhamento de sequências de ITS2 mostrando diferenças entre *Anopheles parvus* e a espécie mais próxima.

**Distribuição geográfica.** (Fig. 15). **BRASIL**, Ceará (DEANE et al., 1947); Ubajara e Viçosa (DEANE et al., 1948); Distrito Federal, Brasília (LIRA-VIEIRA, 2013); Espirito Santo (CERUTTI Jr et al., 2007; MENEGUZZI et al., 2009); Santa Leopoldina (DEANE et al., 1971); Santa Tereza (REZENDE et al., 2009); Goiás, Goiânia (CARVALHO et al., 1992; NAVES et al., 1996; 1998); Catalão, Dianópolis e Porto Nacional (LUSTOSA et al., 1989); Ipoá, Ivoândia e Caiapônia (NUNES et al., 2008); Colinas do Sul, Iaciara, Minaçu, Mundo Novo, Trindade e Porangatu (MANOEL et al., 2010); Mato Grosso, Nova Xavantina (IANELLI et al., 1998); Mato Grosso do Sul, Bataguassu (GOMES et al., 2010); Minas Gerais, Juiz de Fora (NEIVA, 1909); Água Limpa (ROOT, 1927); Prata e Monte Alegre (LIMONGI et al., 2008); Paraná, São Miguel do Iguaçu (ARAUJO et al., 2014; FALAVIGNA-GUILHERME et al., 2005); Cambé (LOPES & LOZOVEI, 1996); Foz do Iguaçu (CONSOLIM et al., 1993; FALAVIGNA-GUILHERME et al., 2005; RACHOU & RICCIARDI, 1951); Guaíra (FALAVIGNA-GUILHERME et al., 2005); Morretes (SANTOS-NETO & LOZOVEI, 2008); Andirá, Arapongas, Bandeirantes, Bocaiuva do Sal, Cambé, Campo Largo, Carlópolis, Castro, Congoinhas, Curitiba, Guarapuava, Imbituva, Ipiranga, Jacarezinho, Jaguapitã, Jaguariaiva, Joaquim Távora, Londrina, Mandaguarí, Mangueirinha, Palmeira, Ponta Grossa, Porto Amazonas, Reserva, Ribeirão Claro, Ribeirão do Pinhal, Rio Negro, Rolândia, Santa Mariana, Santo Antonio do Platina, Sengês, Sertanópolis, Siqueira Campos, Tibagi e Tomazinha (RACHOU & RICCIARDI, 1951); Pernambuco, Recife (ARAGÃO et al., 2010); Rio de Janeiro, Teresópolis (GUIMARÃES et al., 1985; GUIMARÃES & VITÓRIO, 1986), Itaguaí (GUIMARÃES et al., 1989); Rio de Janeiro (NEIVA, 1909); Rio Grande do Sul, Derrubadas (CARDOSO et al., 2004); Santa Catarina (FAVRETTO et al., 2013), Ipuaçú (MARCONDES et al., 2006); Biguaçu, Florianópolis, Guabiruba, Itajaí e Zortéia (PORTES et al., 2010); Florianópolis, Indaial, Itajaí, Mafra (RACHOU & FERRAZ, 1951); São Paulo, Avaré e Cerqueira Cesar (LANE, 1936); Botucatu (ANTUNES & LANE, 1933); Cordeirópolis (BARGHINI et al., 2004); Dourado (FORATTINI et al., 1998); Pariquera-Açu (FORATTINI et al., 1995); São José do Rio Preto (DIBO et al., 2011); São Paulo (DEANE, 1967; DEANE et al., 1971); Tocantins, Palmas (PARISE, 2014); Porto Nacional (ANDRADE et al., 2006); **ARGENTINA**, Corrientes (USNM); Misiones, Puerto Iguazú (DURET, 1948); **BOLÍVIA**, Cochabamba (LARDEUX et al., 2009); Coripata (USNM) **COLOMBIA**, Merey III (ELIOT, 1967); Santander, Betulia e Los Santos (PARRA-HENAO et al., 2012); **PARAGUAY**, Amambay (USNM); **PERU**, (USNM); Ayacucho (MORALES-AYALA, 1971; CALDERÓN et al., 1995); Junin

(CALDERÓN et al., 1995); **VENEZUELA**, Barinas, Cruz Paredes, Guárico, Calabozo (GABALDON & COVA-GARCIA, 1946).

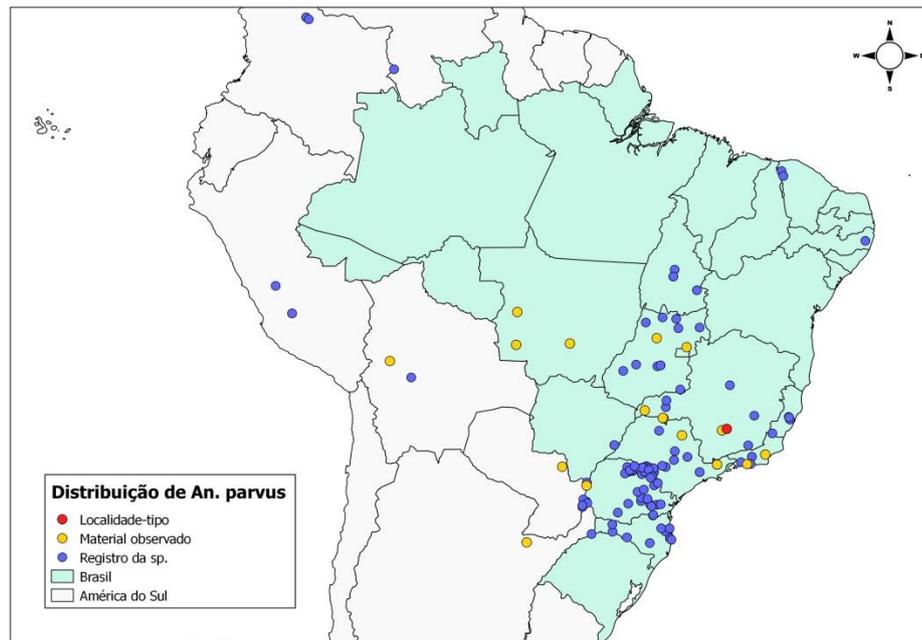


Figura 15. Mapa da distribuição geográfica de *Anopheles parvus* na América do Sul. O mapa foi construído com dados obtidos na literatura e material observado.

**Material Examinado.** BRASIL, São Paulo, Pindamonhangaba, Instituto Agrônomo (22°57'37,7"S 45°27'07,5"W), Sallum et al. coll., 27-X-2010, Sallum det., 2010, (FSP), SP104(10)-1 [LePeG], SP104(10)-2 [LePe], SP104(10)-3 [LePe], SP104(10)-4 [LePe], SP104(10)-5 [LePe], SP104(10)-6 [LePe], SP104(10)-7 [LePe], SP104(10)-8 [LePe], SP104(10)-10 [LePe], SP104(10)-11 [LePe], SP104(10)-12 [LePe], SP104(10)-13 [LePe], SP104(10)-15 [LePe], SP104(10)-100 [Pe]; município de Ribeirão Preto, Duret coll., VI-1953, Duret det., 1969, (USNM), [2F]; Minas Gerais, Campo Belo (23K 0487328S 7700518W), Bergo et al. coll., 14-IV-2010, Sallum det., 2010, (FSP), MG57-18 [LePe], MG57-107 [Pe]; Frutal (20°01'31,0"S 49°04'35,4"W), Bergo et al. coll., 21-XI-2006, Sallum det., 2007, (FSP), MG07(9)-2 [M], MG07(9)-4 [M], MG07(9)-6 [F], MG07(9)-9 [F], MG07(9)-12 [F], MG07(9)-15 [M], MG07(9)-16 [M], MG07(9)-18 [F], MG07(9)-19 [M], MG07(9)-109 [M]; Paraná, Guaíra (24°16'17,4"S 54°17'26,0"W), Silva et al. coll., 04-V-2007, Sallum det., 2007, (FSP), PR28(5)-3 [M], PR28(5)-7 [M], PR28(5)-8 [M], PR28(5)-9 [F], PR28(5)-11 [M], PR28(5)-12 [F], PR28(5)-13 [F], PR28(5)-14 [F], PR28(5)-15 [M],

PR28(5)-16 [M], PR28(18)-2 [M], PR28(18)-3 [F], PR28(18)-6 [F], PR28(18)-7 [M], PR28(18)-10 [M], PR28(18)-12 [F], PR28(18)-13 [M], PR28(18)-14 [F], PR28(18)-15 [M], PR28(18)-16 [F], PR28(18)-17 [M], PR28(18)-18 [M], PR28(18)-19 [F], PR28(18)-20 [M], PR28(65)-1 [M], PR28(65)-2 [M], PR28(65)-4 [F], PR28(65)-7 [F], PR28(65)-8 [F], PR28(65)-10 [F], PR28(65)-14 [F], PR28(65)-17 [F], PR28(65)-18 [F], PR28(65)-19 [F], PR28(65)-20 [M], PR28(65)-21 [M], PR28(71)-1 [M], PR28(71)-3 [M], PR28(71)-4 [F], PR28(71)-7 [M], PR28(71)-8 [M], PR28(71)-23 [M], PR28(71)-24 [F], PR28(71)-25 [F], PR28(71)-26 [M], PR28(71)-28 [F], PR28(71)-31 [M], PR28(75)-1 [M], PR28(75)-3 [M], PR28(75)-5 [F], PR28(75)-7 [F], PR28(75)-9 [F], PR28(75)-10 [F], PR28(75)-11 [F], PR28(75)-12 [F], PR28(75)-13 [M], PR28(75)-14 [F]; Rio de Janeiro, Macaé, Sana, col. Par: 637, 12-IX-2012, Teresa Fernandes det., 2013, (FSP), Sana-3 [F]; Rio de Janeiro, Kumm coll., 1927, Edwards det., (USNM), [2F]; Mato Grosso, Chapada, Ponce & Lane colls., Lane det., 1953, (USNM), [2F]; Maracaju, XII-1937, (USNM), [1M], [3F]; PARAGUAY, Amambay, Duret coll., 22-XI-1961, Duret det., 1969, (USNM) [4F]; ARGENTINA, Corrientes, Mercedes coll., XII-1966, Duret det., 1969, (USNM), [2F]; BOLIVIA, Coripata, XII-1946, (USNM), [4F]; PERU, Harrison & Savage coll., 1985, BA Harrison det., 1985, (USNM), [F].

### **Material-tipo – Estado de conservação**

De acordo com BELKIN et al. (1971), o material pode encontrar-se depositado na Coleção do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – Rio de Janeiro, Brasil. No entanto, este não está relacionado no trabalho de MARCHON-SILVA et al. (1996) que lista os espécimes-tipo depositados na Coleção. O material-tipo de *Anopheles parvus* não foi localizado.

***Anopheles (Nyssorhynchus) guarani* (Shannon, 1928)**

(Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21; Anexos 4, 5 e 6)

*Anopheles (Nys.) guarani* de Shannon, 1928: 444. Lectótipo fêmea depositado no USNM. Belkin et al., 1971: 6 (informações do tipo); Forattini et al., 1998: 261 (descrição dos ovos de Dourado); Nagaki et al., 2011: 380 (validação de *An. guarani*); Bourke et al., 2011: 705 (filogenia molecular); Foster et al., 2013 (filogenia molecular).

**Diagnose.** O adulto de ambos os sexos não apresentam na veia costa, mancha basal clara e a veia R<sub>4+5</sub> possui duas manchas de escamas claras bem definidas em 0,3 proximal e 0,7, manchas menores que em *An. parvus*, tarsômeros medianos 1–3 apresentam anéis de escamas claras apicais. A genitália masculina apresenta ápice do claspete ventral em forma trapezoidal e os folíolos do edeago são fortemente serrilhados. Nas pupas, a cerda 9-V é curta e pigmentada e as larvas apresentam abertura espiracular muito estreita.

**Fêmea.** Redescrição segundo NAGAKI et al. (2011). Semelhante aos demais membros da Seção Myzorhynchella. Mosquito de tamanho médio de aspecto geral escuro, tegumento mais escuro que *Anopheles lutzii*. **Cabeça:** Vértice com escamas espatuladas claras, sendo as do centro mais truncadas. **Tórax:** tegumento do escudo com coloração geral muito escura; escamas estreitas claras e decumbentes na região acrostical, dorso-central e anteriormente a área pré-escutelar; escutelo com marcação mais escura na área central. **Asa:** (Anexo 4), veias de escamas escuras com manchas de escamas claras como segue: costa sem basal clara, apresenta basal escura e pré-umeral escura, umeral clara, umeral escura e pré-setor escura, setor escura proximal, setor acessório clara, setor escura distal, subcostal clara, pré-apical escura, pré-apical clara e apical escura; veia R<sub>4+5</sub> com escamas claras nas extremidades distal e proximal, conjunto pequeno de escamas escuras na 0,2 proximal e 0,8 distal; com duas manchas de escamas claras bem definidas em 0,3 proximal e 0,7; veia M variável. **Pernas:** tarsômeros anteriores 1–3 com escamas claras apicais tanto dorsal como apical, tarsômero 1 com anel apical de escamas claras, tarsômero 2 com 0,4 apical claro, e tarsômero 3 com 0,5 apical claro, tarsômero 4–5 escuros; tarsômeros medianos 1–3 com escamas claras apicais, tarsômero 1 com pequena mancha clara, tarsômero 2 com 0,4 apical claro e tarsômero 3 com poucas escamas claras no ápice, tarsômero 4–5 escuros. **Abdome:** esternito VIII com escamas claras espatuladas.

**Genitália masculina.** (Fig. 16; Anexo 5 ) *Segmento VIII:* Tergito e esternito estreitos, sem escamas e com cerdas longas e curtas. *Proctiger:* membranoso medialmente, com espículas lateralmente. *Gonocoxito:* cerda acessória moderadamente longa, larga, afinando no ápice, terminando em um ápice estreito e pontiagudo; cerda acessória dorsal levemente curvada posteriormente; cerda acessória ventral reta; cerda interna delgada, curvada anteriormente; cerda parabasal afilada e curvada no ápice. *Gonóstilo:* margem dorsal com 13–14 cerdas diminutas. *Claspete ventral:* trapezoidal, ápice estreito, reto; lóbulo basal pequeno; fenda medial fortemente esclerotizada ao longo de 0,3 apical da margem mesal; sulco mediano em forma de V, fortemente esclerotizado na margem mesal. *Claspete dorsal:* com três longas cerdas, cerda dorsal estreita, surgindo subapicalmente, duas largas, contorcidas, cerdas ventrais achatadas surgindo apicalmente. *Falósoma:* edeago fortemente esclerotizado lateralmente, folíolos subapicais do edeago bem desenvolvidos, margem exterior côncava, margem interna reta, folíolos paralelos ao eixo longitudinal do edeago, fortemente esclerotizado, fortemente serrilhado ao longo da superfície exterior; porção apical do edeago curta e moderadamente esclerotizada; projeção subtriangular ventromesal unido mesalmente adjacente ao meio do comprimento dos folíolos.

**Pupa.** *Cefalotórax:* trompa longa, moderada a fortemente pigmentada, de claro a marrom escuro, pina aproximadamente 0,8 do comprimento da trompa, fortemente curvada no ápice do meato (Anexo 6); meato curto; cerda 12-CT geralmente dupla. *Abdome:* cerda 1-II–IV geralmente com mais de 3 ramos, cerda 1-II com 2–5 ramos, cerda 1-III com 3–7 ramos, cerda 1-IV com 3–7 ramos; cerda 1-VI, VII geralmente simples, longa; cerda 5-III com 3–7 ramos; cerda 5-VI, VII geralmente simples, tão longa quanto a cerda 1 do mesmo segmento; cerda 6-I–VII geralmente simples; cerda 7-I com 1–4 ramos; cerda 7-III–V curta, geralmente dupla; cerda 7-VI, VII simples e longa; cerda 14-IV–VIII diminuta; cerda 9-II–IV sem pigmentação, diminutas; cerda 9-V curta e pigmentada; cerda 9-VI–VIII longas e fortemente pigmentadas. *Paleta:* fracamente pigmentada, mais longa do que larga, cerda 1-P simples, fortemente pigmentada; cerda 2-P simples e fina.

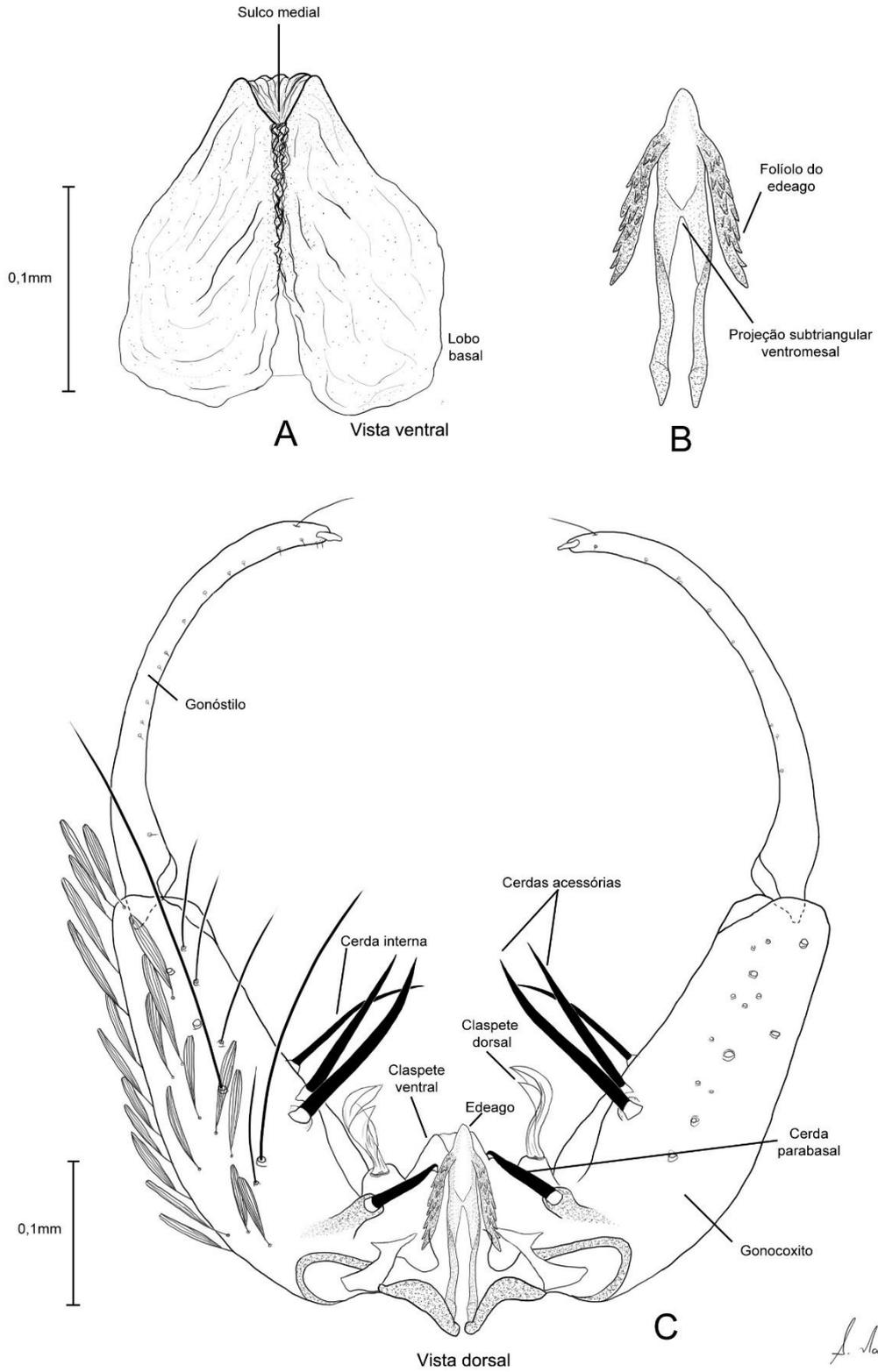


Figura 16. *Anopheles guarani*, espécime do município de São José dos Pinhais, PR. (A) Claspete ventral, vista ventral; (B) Edeago; (C) Genitália masculina, vista dorsal.

**Larva de 4º estágio.** *Cabeça:* tegumento moderadamente esclerotizado; cerda 2-C simples; cerda 4-C com 2–4 ramos, curtos; colar fortemente pigmentado. *Antena:* com finas espículas, superfície ventral medial com espículas longas; cerda 1-A com 4–6 longos ramos. *Tórax:* cerdas 1, 2-P não estão em tubérculo comum; cerda 14-P com 4–7 longos ramos (Fig. 17A); cerda 3-T com folíolos muito hialinos; cerdas 9,10-T simples, aciculadas até a metade basal, metade apical com ramos mais longos. *Abdome:* cerda 0-II–VII diminuta; cerda 1-I–II ramificada, não palmada; cerda 1-III–V com folíolos estreitos e muito hialinos (Fig. 17B); cerda 2-II com 7–11 longos ramos; cerda 5-I com 3–5 ramos, inserido na margem lateral do segmento; cerda 6-IV–VI com mais de 4 ramos (Fig. 17C). Abertura espiracular muito estreita (Fig. 17D). *Segmento X:* tegumento com finas e pequenas espículas, cerda 1-X tão longa quanto a sela.

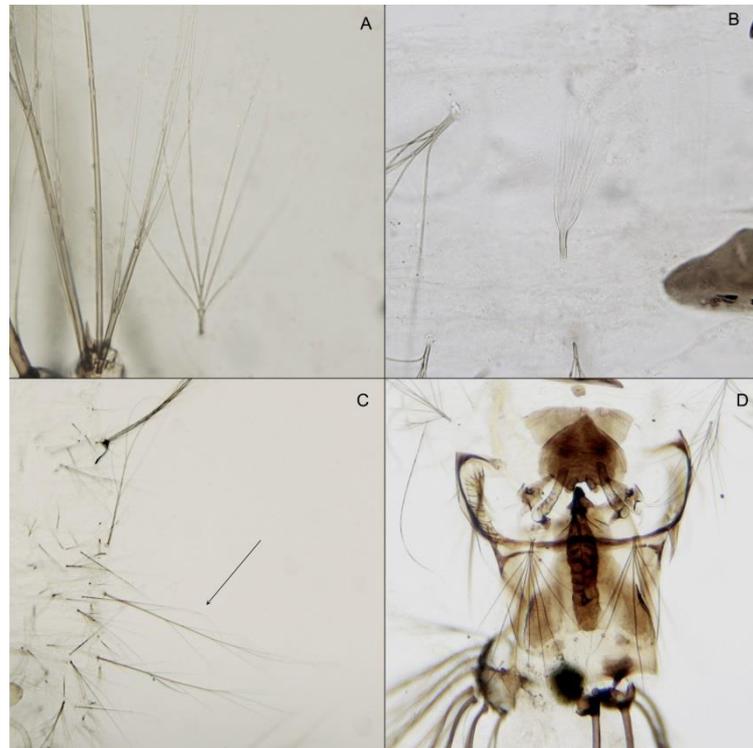


Figura 17. *Anopheles guarani*. (A) cerda 14-P; (B) cerda 1-II–VII; (C) cerda 6-IV–VI; (D) placa espiracular.

**Ovo.** Segundo Forattini et al. (1998). *Aparência geral.* Cor preto; largamente em forma de barco em vista ventral, lateral e dorsal, superfície ventral quase plana, superfície dorsal curvada em vista lateral; flutuadores em posição lateral, mais próximo à superfície ventral do que dorsal, bem desenvolvido; franja presente apenas na parte posterior do ovo. *Superfície Dorsal.* (Fig. 18A-C). Convés na região do meio do ovo largo, afinando em direção as partes

anterior e posterior do ovo; franja reduzida, presente somente na extremidade posterior do ovo, em torno de uma pequena área posterior do convés; flutuadores amplamente unidos na extremidade anterior e na parte posterior do ovo anteriormente a franja; tubérculos lobados ausentes. Convés coberto uniformemente com tubérculos quase globosos intercalados com tubérculos menores. *Superfícies ventral e lateral.* (Fig. 18B) Células coriônicas externas do plastrão dorsal com margem indistinta, plastrão formado por nódulos pequenos, planos, amplamente unidos espaçado com áreas abertas de formato irregular, áreas adjacentes aos flutuadores na extremidade posterior do ovo com poucos poros pequenos. Flutuadores bem desenvolvidos, estendendo da extremidade anterior para posterior 0,2 e ambos amplamente unidos anteriormente e posteriormente na superfície ventral, extremidade anterior não visível além da margem anterior dos flutuadores. Margem do flutuador posterior unido a borda anterior da coroa posterior; gomos em torno de um número de 27–30, gomos fracamente divididos em lobos.

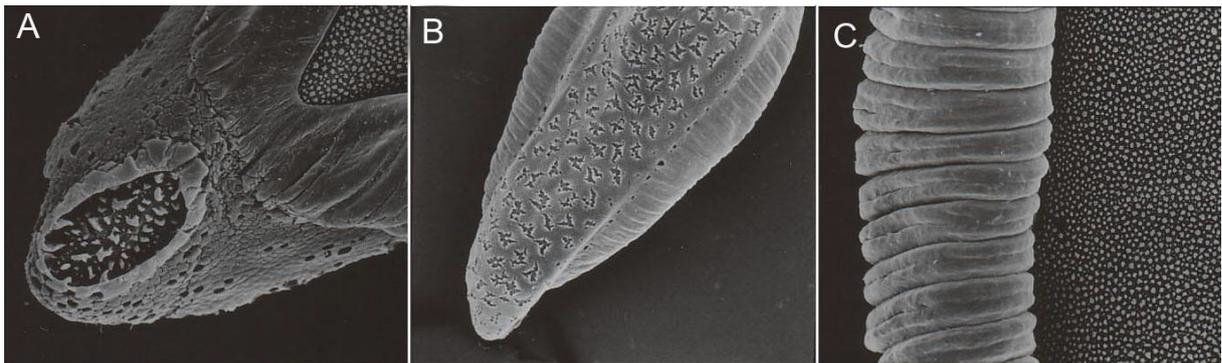


Figura 18. *Anopheles guarani*. (A) Extremidade anterior, vista dorsal; (B) Plastrão, vista ventral (C) tubérculos do convés e flutuador.

**Bionomia.** Em Foz do Iguaçu, estado do Paraná, os indivíduos de *An. guarani* foram coletados em armadilha de Shannon, em abril, das 18:00 as 20h00 em temperatura de 25°C, próximo ao rio Almada, em floresta secundária a 185m de altitude. Muitos espécimes de *Anopheles* foram coletados, no entanto pouquíssimos espécimes de *An. guarani*. Em Puerto Iguazu, Misiones, Argentina, DURET (1948) encontrou uma fêmea em setembro ao anoitecer, enquanto tentava picá-lo. FORATTINI et al. (1998) coletaram espécimes de *An. guarani* com isca humana. Em 2013, no município de Campo Alegre, estado de Santa Catarina, poucas larvas foram encontradas em poço no solo fundo e cerca de 1 metro de diâmetro, água límpida, com vegetação ao redor em ambiente próximo a mata. ROSSI & LESTANI (2014), coletaram *An. guarani* em armadilha luminosa do tipo CDC em área recentemente desmatada

em maio de 2007 e pupas também foram coletadas em córrego na província de Misiones, Argentina.

**Importância Médica.** A espécie não é conhecida como sendo de importância médica. No entanto, DEANE et al. (1971), estudando a dinâmica da malária simiana na Mata Atlântica, coletaram 46 espécimes de *An. guarani* (identificado como *An. lutzii*) no Horto Florestal, município de São Paulo. Nenhum dos espécimes foi encontrado infectado com *Plasmodium*. No entanto, vale ressaltar, que no estudo de DUARTE et al. (2013), um único exemplar de *An. guarani* (identificado como *An. lutzii*) foi coletado em região de mata em Parelheiros, município de São Paulo e este estava infectado por *Plasmodium vivax*.

**Caracterização molecular:** O comprimento da sequência de ITS2 foi de 588 pb (sem a região dos primers). As sequências revelaram haplótipo que consiste de 19% T, 19,9% A, 29,4% C e 31,6% G. Utilizando o algoritmo BLAST, uma busca FASTA no bando de dados: nucleotide collection – otimizado para: Somewhat Similar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) revelou que sequências de ITS2 de *An. guarani* compartilham 83% de similaridade com a espécie mais próxima *An. antunesi* dentro de uma cobertura de 60% (Fig. 19).

```

An guarani | .....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200.....210
An guarani | CATTCAACCGCAGAGCGAACTAGCGAGGGC-CCGCGCCACACCCACTGGTGTGTGCTGCGTGCCGAGCTGCGTACTGATGATTGGTTTGCT
An guarani | .....
An antunesi | .....T.....T.T.....A..C-T.....GGGGT.C.CC.G.ACCCGGC..G.....T.A.....
An antunesi | .....T.....T.T.....A..C-T.....GGGGT.C.CC.G.ACCCGGC..G.....T.A.....

```

Figura 19. Fragmento de alinhamento de sequências de ITS2 mostrando diferenças entre *Anopheles guarani* e a espécie mais próxima.

**Distribuição Geográfica.** (Fig. 20). **BRASIL**, Paraná, Foz do Iguaçu (NAGAKI et al., 2011); São José dos Pinhais (FSP); Santa Catarina, Campo Alegre (FSP); São Paulo, Dourado (FORATTINI et al., 1998); Rio de Janeiro (BMNH.); Distrito Federal, Brasília (Andrade coll.); **ARGENTINA**, Misiones (ROSSI & LESTANI, 2014).

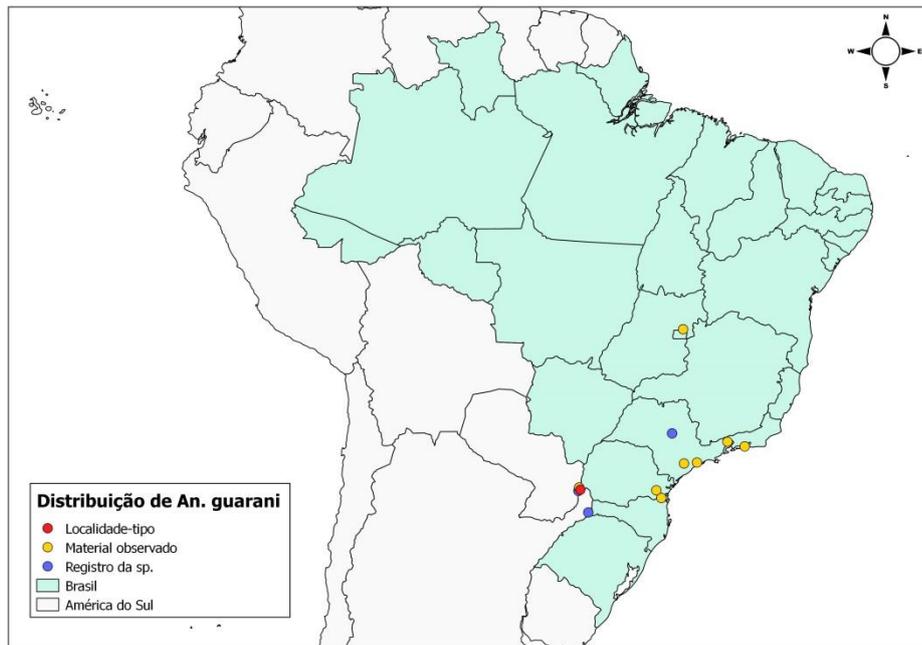


Figura 20. Mapa da distribuição geográfica de *Anopheles guarani* na América do Sul. O mapa foi construído com dados obtidos na literatura e material observado.

**Material Examinado.** *Material-tipo:* BRASIL, Paraná, Foz do Iguaçu, RC & EM Shannon coll., 5-X-1927, (USNM), [F]. *Outro material:* BRASIL, Paraná, São José dos Pinhais (25°35'227"S 49°07'952"W), Demari-Silva coll., 04-III-2012, Nagaki, det., 2012, (FSP), PR30-1 [LePeG], PR30-8 [FLePe]; Foz do Iguaçu (25°28'50"S 54°35'12"W), Nagaki et al. coll., 28-IV-2008, Sallum & Nagaki det., 2008, (FSP), PR29(8)-10 [F], PR29(9)-1 [F], PR29(9)-14 [F], PR29(9)-15 [F], PR29(9)-19 [F], PR29(9)-20 [F], PR29(9)-29 [F], PR29(9)-28 [F], PR29(9)-30 [F]; Santa Catarina, Campo Alegre (26°07'00,1"S 49°00'14,6"W), Nagaki et al. coll., 19-XI-2012, Nagaki det., 2013, (FSP), SC14-2 [FLePe], SC14-3 [FLePe], SC14-100 [Le], SC14-101 [Le]; Rio de Janeiro, Kumm coll., 1927, Edwards det., (BMNH) [2F] (identificado como *An. parvus*); Distrito Federal, Parque Nacional de Brasília, Andrade coll., IV-2014, [5F]; [5MG].

#### **Material-tipo – Estado de conservação**

Coleção: Smithsonian National Museum of Natural History (USNM) – Washington D.C., EUA.

Procedência: Brasil

Exemplares: Lectótipo representado por um adulto fêmea

*Lectótipo*: (Fig. 21). Exemplar fêmea, montado em alfinete entomológico colado a triângulo de papel na porção ventral do tórax. Espécime com asa esquerda quebrada, escudo com poucas escamas, perna anterior direita possui fêmur apenas.

Dados dos rótulos: *Anopheles guarani* snn. / House Iguazu, Brazil 5.X.27 / Type No U.S.N.M. / RC & EM Shannon Colls

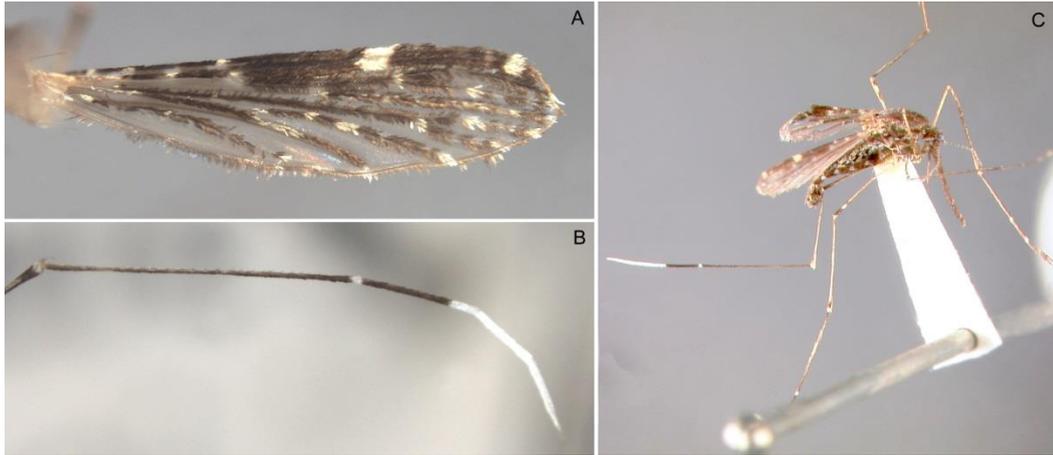


Figura 21. Lectótipo de *Anopheles guarani*. (A) Asa; (B) Perna posterior; (C) Adulto, vista lateral.

***Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* Galvão & Amaral, 1940**

(Figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27; Anexos 4, 5 e 6)

*Anopheles (Nys.) antunesi* Galvão & Amaral, 1940: 150. Parátipo fêmea depositado na FSP. Galvão, 1941: 560 (bionomia, morfologia); Gorham et al., 1967: 12 (chave ilustrada); Forattini, 1962: 432 (morfologia); Belkin et al., 1971: 6 (informações do tipo); Forattini, 2002: 213 (chave); Nagaki et al., 2011: 278 (redescrição); Bourke et al., 2011: 705 (filogenia); Foster et al., 2013 (filogenia).

**Diagnose.** Os adultos macho e fêmea se assemelham muito a *An. lutzii*, a veia  $R_{4+5}$  é geralmente de aspecto mais claro, no entanto pode variar. Outra característica é a marcação nos tarsômeros anteriores que diferente de *An. lutzii*, possui poucas escamas brancas na superfície dorsal do ápice. Na larva, a cerda 6 dos segmentos IV-VI é bífida e a genitália masculina apresenta proctiger glabro.

**Fêmea.** Mosquito de aspecto geral escuro. *Asa*: (Anexo 4), veias de escamas escuras com manchas de escamas claras como segue: costa sempre com basal clara, basal escura e pré-umeral escura, umeral clara, umeral escura e pré-setor escura, setor escura proximal, setor acessório clara, setor escura distal, subcostal clara, pré-apical escura, pré-apical clara e apical escura; veia  $R_{4+5}$  de aspecto geral claro, com escamas claras nas extremidades distal e proximal, conjunto pequeno de escamas escuras na 0,2 proximal e 0,8 distal e escamas claras entre as manchas escuras; veia M variável. *Pernas*: tarsômeros anteriores 1–3 com pequena marcação apical de escamas claras na superfície dorsal, tarsômero 4–5 escuro; tarso mediano escuro, tarsômeros 1–2 com poucas escamas claras no ápice; tarsômero posterior 1 com um anel apical de escamas claras, tarsômero 2 com aproximadamente 0,5 apical de escamas claras, tarsômeros 3–5 completamente brancos. *Abdome*: tegumento marrom escuro; segmentos I–VII sem escamas e cobertos de cerdas; esternito VIII com poucas escamas espatuladas claras no ápice.

**Genitália masculina:** (Fig. 22; Anexo 5) *Segmento VIII*: tergito e esternito estreitos, com raras escamas e com cerdas. *Proctiger*: membranoso, sem espículas. *Gonocoxito*: cerda acessória moderadamente longa, larga, afinando no ápice, terminando em um ápice estreito e

pontiagudo; cerda acessória dorsal levemente curvada posteriormente; cerda acessória ventral reta; cerda interna delgada, curvada anteriormente; cerda parabasal larga, levemente curvada no ápice em forma de colher. *Claspete ventral*: sem espículas, ápice estreito, superfície ventral com, lobos estriados evidentemente dilatados. *Claspete dorsal*: com três longas cerdas, cerda dorsal estreita, surgindo subapicalmente, duas largas, contorcidas, cerdas ventrais achatadas surgindo apicalmente. *Falósoma*: edeago longo, delgado, fortemente esclerotizado lateralmente, com um par de folíolos subapicais, folíolos bem desenvolvidos, retos, paralelos ao eixo longitudinal, fortemente esclerotizado, serrilhado nas superfícies dorsal e lateral; ápice do edeago um tanto arredondado.

**Pupa.** *Cefalotórax*: Tegumento levemente pigmentado, com áreas mais escuras nas pernas e probóscide; trompa longa e moderadamente pigmentada, de claro a marrom escuro no ápice, trompa truncada e dilatada apicalmente em vista lateral; pina aproximadamente 0,7 do comprimento da trompa (Anexo 6). *Abdome*: tegumento levemente pigmentado; cerda 0-II-VIII diminuta; cerda 1-II, III com ramos longos; cerda 3-I com 2–6 ramos; cerda 7-II com 2–5 ramos; cerda 9-II–IV sem pigmentação, diminutas; cerda 9-V–VIII longas e fortemente pigmentadas. *Paleta*: fracamente pigmentada, mais longa do que larga, cerda 1-P simples, fortemente pigmentada; cerda 2-P simples e fina.

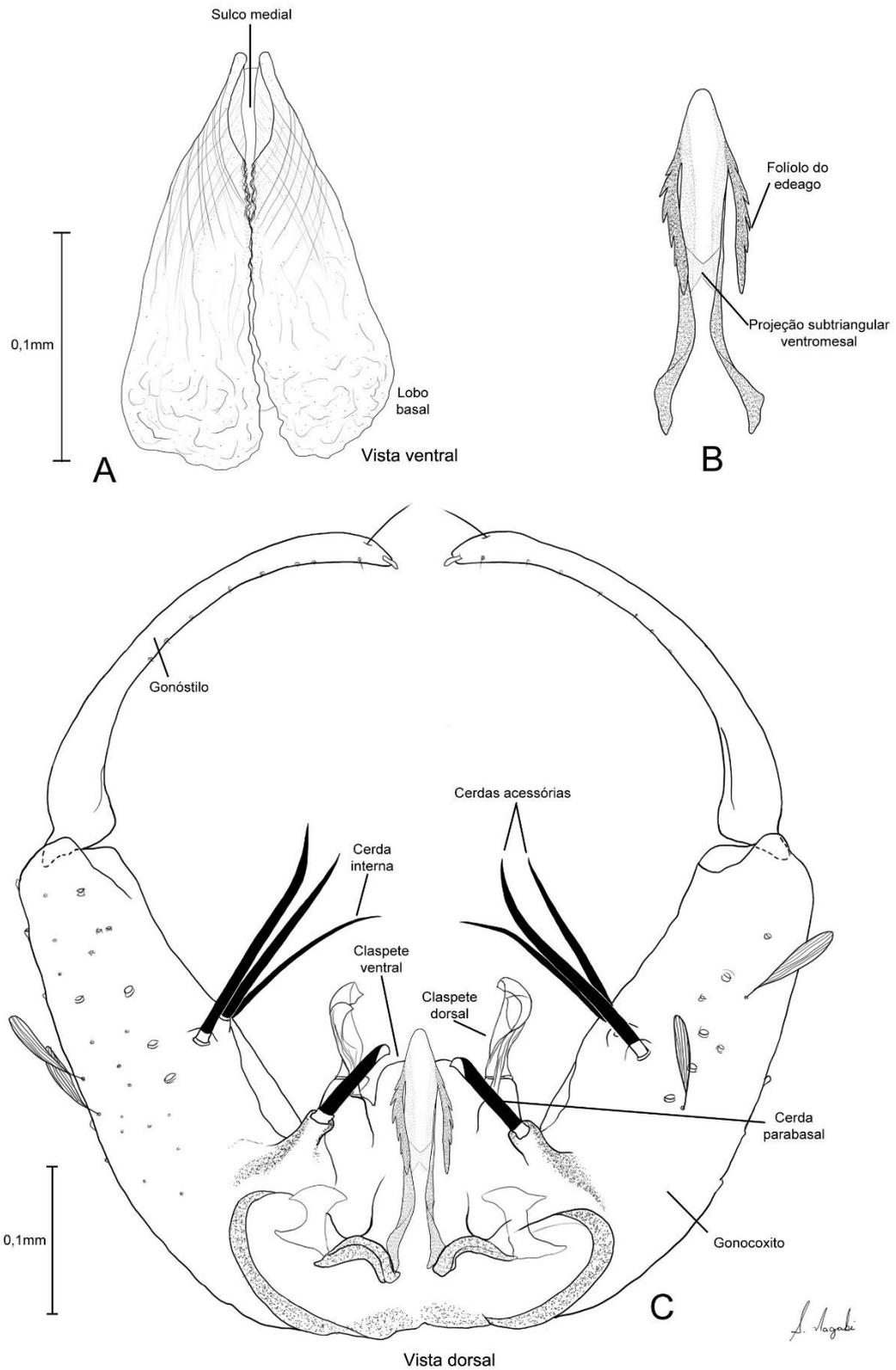


Figura 22. *Anopheles antunesi*, espécime da região entre os municípios de Pindamonhangaba e Campos do Jordão, SP. (A) Claspete ventral, vista ventral; (B) Edeago; (C) Genitália masculina, vista dorsal.

**Larva.** *Cabeça:* tegumento levemente esclerotinado; cerda 2-C simples, levemente aciculada; cerda 4-C simples, aciculada, longa, alcançando a base de 2-C; cerda 8-C com 2–6 ramos; colar fortemente pigmentado. *Antena:* com pequenas espículas, superfície medial ventral com espículas mais longas; cerda 1-A com 3–5 ramos. *Tórax:* cerdas 1,2-P não estão em tubérculo comum, 1-P com 4–9 ramos; cerda 14-P com 3–4 ramos longos (Fig. 23A); cerdas 9 e 10-T simples, aciculadas. *Abdome:* cerda 0-II–VII diminuta; cerda 1-I ramificada, curta; cerda 1-II–VII palmada, com folíolos pontiagudos (Fig. 23B); cerda 2-II com 3–5 ramos longos; cerda 6-IV–VI geralmente bífida (Fig. 23C); abertura espiracular larga (Fig. 23D). *Segmento X:* tegumento com finas e pequenas espículas, cerda 1-X mais longa que a sela, inserida próximo a margem ventral da sela.

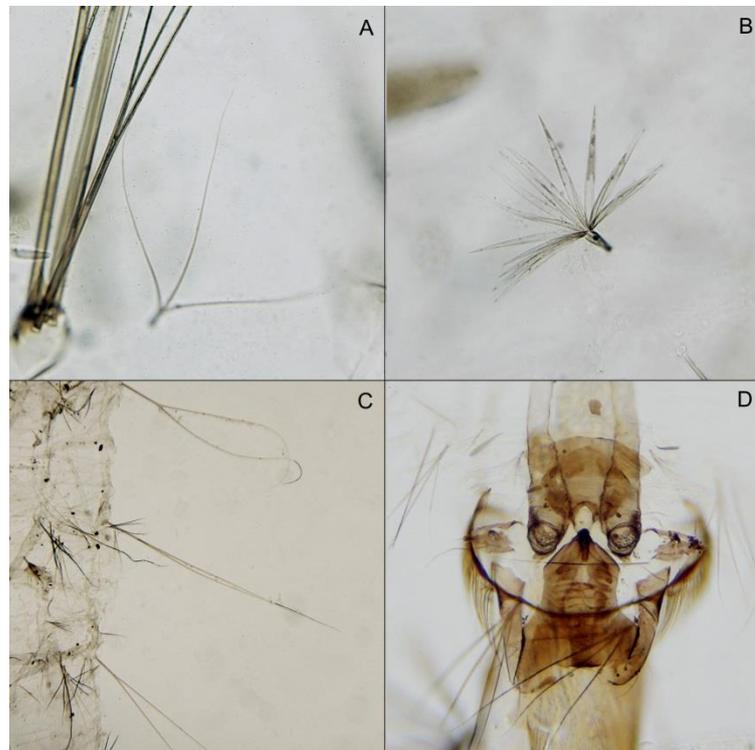


Figura 23. *Anopheles antunesi*. (A) cerda 14-P; (B) cerda 1-II–VII; (C) cerda 6-IV–VI; (D) placa espiracular.

**Ovo.** (Fig. 24). De cor preta, com flutuadores em posição lateral, cobrindo parte da superfície dorsal, gomos fracamente divididos em lobos; convés estreito, uniformemente coberto por tubérculos de formato irregular; plastrão ventral e lateral com poros um tanto circulares.



**Distribuição Geográfica.** (Fig. 26). **BRASIL**, Goiás, Formoso do Araguaia (LUSTOSA et al., 1989); Maranhão, Nina Rodrigues e Paço do Lumiar (REBÊLO et al., 2007); Paraná, Foz do Iguaçu (CONSOLIM et al., 1993; RACHOU & RICCIARDI, 1951); Carlópolis, Castro, Cerro Azul, Clevelândia, Cornélio Procopio, Curitiba, Guarapuava, Ipiranga, Iratí, Jacarezinho, Jaguariaiva, Lapa, Laranjeiras do Sul, Mangueirinha, Palmas, Palmeira, Paranaguá, Piraquara, Pitanga, Ponta Grossa, Prudentópolis, Reserva, Ribeirão Claro, Santa Mariana, São José dos Pinhais, São Mateus do Sul, Sengês, Teixeira Soares, Tibagi e Tomazina (RACHOU & RICCIARDI, 1951); São Miguel do Iguaçu (ARAUJO et al., 2014); Rio de Janeiro, Itatiaia (NAGAKI et al., 2010); Rio Grande do Sul, Guaíba (DEANE & NETO, 1969); Santa Catarina, Blumenau (ARAGÃO et al., 1973); Campo Alegre (DEANE et al., 1971); Florianópolis (ARAGÃO et al., 1973; RACHOU & FERRAZ, 1951); Joinville (DEANE et al., 1971; RACHOU & FERRAZ, 1951); Palhoça (COUTINHO et al., 1944; RACHOU & FERRAZ, 1951); Araranguá, Biguaçu, Blumenau, Brusque, Camboriú, Florianópolis, Guaramirim, Imaruí, Indaial, Itaiópolis, Itajaí, Jaraguá do Sul, Mafra, Porto Belo, Porto União, São Bento do Sul, São José, Tubarão e Turvo (RACHOU & FERRAZ, 1951); São Paulo, Campos do Jordão (GALVÃO & AMARAL, 1940; NAGAKI et al., 2010); São Paulo (DEANE, 1967; DEANE et al., 1971); Tocantins, Palmas (PARISE, 2014); **ARGENTINA**, Misiones, Deseado, Monteagudo e Alba Pose (BEJARANO & DURET, 1949); **URUGUAY**, Maldonado, Piriópolis (FRANCA-RODRIGUES & VARELA, 1962).

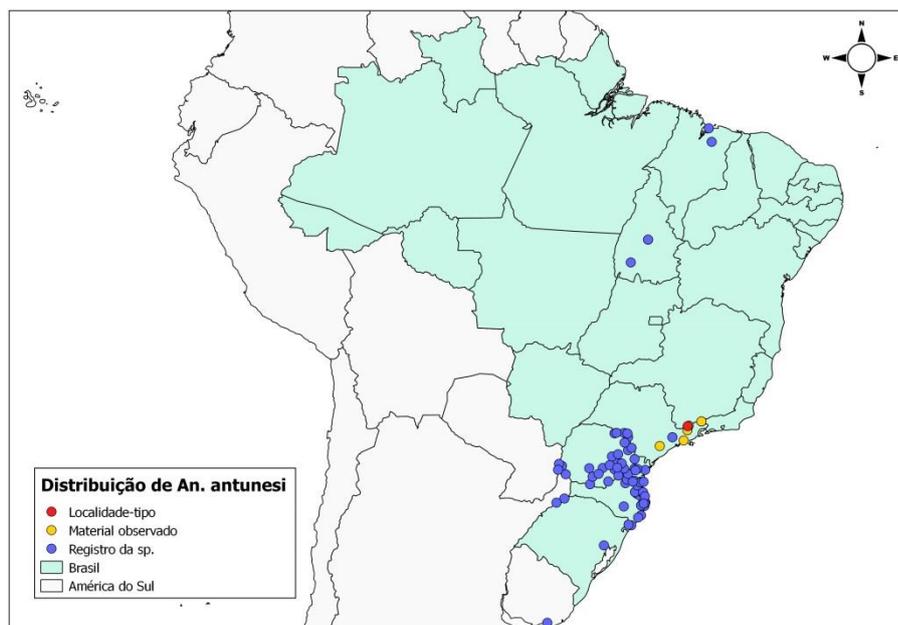


Figura 26. Mapa da distribuição geográfica de *Anopheles antunesi* na América do Sul. O mapa foi construído com dados obtidos na literatura e material observado.

**Material examinado.** *Material-tipo.* BRASIL, São Paulo, Campos do Jordão, Galvão & Amaral coll., 1940, Galvão & Amaral det., 1940, (FSP), Parátipo: 1 fêmea e uma lâmina da asa direita E-2034 [F]. *Outro material.* BRASIL, São Paulo, Campos do Jordão (22°45.435'S 45°30.71'W), Sallum & Wilkerson coll., 20-XI-2001, Sallum det., 2002, (FSP), E-12438 [LePe], E-12449 [LePe], E-12461 [LePe], E-12462 [LePe], E-12463 [LePe], E-12464 [LePe]; Galvão & Amaral coll., 1940, Galvão & Amaral det., 1940, (FSP), E-2038 [G], E-2042 [LePe], E-2044 [LePe], E-2048 [Le], E-2049 [G]; Ramos det, (FSP), [G] (identificado como *An. lutzii*); Pindamonhangaba (22°45'31,7"S 45°30'55,8"W), Sallum et al. coll., 27-X-2006, Sallum det., 2006, (FSP), E-13180 [LePeG]; Pindamonhangaba, Faz. St. Clair (22°44'87,5"S 45°30'37,1"W) Nagaki et al. coll, 08-XII-2011, Nagaki det., 2013, (FSP), SP131-8 [FLePe]; (22°44'89,3"S 45°30'34,4"W) Nagaki et al. coll, 08-XII-2011, Nagaki det., 2013, (FSP), SP132-105 [Pe], SP132-26 [MLePeG]; Nagaki et al. coll, 14-I-2014, Nagaki det., 2014, (FSP), SP150-6 [FLePe]; Salesópolis, Casa Grande, Galvão coll., 1940, Galvão det., 1940, (FSP), E-2050 [G], E-2037 [G], E-2039 [Le], E-2041 [G], E-2047 [G], E-2051 [G]; Tapiraí (23°59'48"S 47°30'45"W) Oliveira et al. coll., 23-IX-2014, Nagaki det., 2014, (FSP), SP159(1)-100 [LeG], SP159(1)-101 [LeG], SP159(1)-102 [LeG], SP159(1)-103 [LeG], SP159(1)-104 [LeG]; Boracéia, Forattini coll., 7-VI-61, Forattini det., 1965, (FSP), [2F]; Rio de Janeiro, Itatiaia (22°24'58.7"S 44°37'19.7"W), Motta coll., VII-2007, Sallum & Nagaki det, 2009, (FSP), E-13181 [Pe]; Nagaki & Motta coll., 25-III-2008, Sallum & Nagaki det., 2008, (FSP), E-13182 [Asa], E-13183 [Asa], E-13184 [Asa]; Alto Itatiaia, Gomes coll., 15-III-1941, (USNM) [M], [F], [G]; Gomes coll., 20-III-1941, (USNM) [F].

### **Material-tipo – Estado de conservação**

Coleção: Faculdade de Saúde Pública (FSP) – São Paulo, Brasil.

Procedência: Brasil

Exemplar: Parátipo representado por um adulto fêmea com número de registro E-2034, armazenada em frasco de vidro.

Lâmina com a asa direita, depositada sob o mesmo número de registro.

*Parátipo:* (Fig.27). Exemplar fêmea, montado em alfinete entomológico colado à triangulo de papel na porção ventral do tórax. Espécime com asa esquerda apenas, perna mediana e posterior esquerda possuem até o 1º tarsômero, e perna posterior direita não apresenta o último tarsômero.

Lâmina: Asa direita montada entre lâmina e lamínula (Fig. 27B).



Figura 27. Parátipo de *Anopheles antunesi*. (A) Exemplar montado em alfinete entomológico; (B) Lâmina da asa direita; (C) Frasco de vidro onde o espécime é armazenado.

***Anopheles (Nyssorhynchus) pristinus* Nagaki & Sallum, 2010**

(Figuras 28, 29, 30, 31, 32 e 33; Anexos 4, 5 e 6)

*Anopheles (Nys.) pristinus* Nagaki et al., 2010: 278. Holótipo macho depositado na FSP. Bourke et al., 2011: 705 (filogenia molecular); Foster et al., 2013 (filogenia molecular).

**Diagnose.** O adulto é facilmente diferenciado pela veia CuA<sub>2</sub> que possui duas manchas escuras. Na genitália masculina, a cerda acessória dorsal é muito larga em comparação a ventral e a projeção subtriangular ventromesal do edeago se localiza aproximadamente na metade do tamanho do folíolo. A pupa possui a cerda 9-VI–VIII longa e fortemente pigmentada e as larvas possuem a cerda 6-IV–VI bem ramificada.

**Fêmea.** Mosquito de aspecto geral bem escuro. *Tórax:* tegumento do escudo com coloração geral negra; escutelo com marcação mais escura no centro. *Asa:* (Anexo 4), veias de escamas escuras com manchas de escamas claras como segue: costa sempre com basal clara, basal escura e pré-umeral escura, umeral clara, umeral escura e pré-setor escura, setor escura proximal, setor acessório clara, setor escura distal, subcostal clara, pré-apical escura, pré-apical clara e apical escura; veia R<sub>2</sub> com pré-apical clara; veia R<sub>2+3</sub> coberto de escamas claras, e escamas escuras na 0,9 distal; veia R<sub>4+5</sub> de aspecto geral claro, com conjunto pequeno de escamas escuras na 0,2 proximal e 0,8 distal; veia M com escamas claras em 0,5 proximal; veia CuA<sub>2</sub> com duas manchas escuras. *Pernas:* superfície posterior da coxa posterior com três longas cerdas na parte superior; tarsômeros anteriores 1–3 com pequena marcação apical de escamas brancas na superfície dorsal, tarsômero 4–5 escuro; tarso mediano escuro, tarsômeros 1–2 com poucas escamas claras no ápice; tarsômero posterior 1 com um anel apical de escamas claras, tarsômero 2 com aproximadamente 0,5 apical de escamas claras, tarsômeros 3–5 completamente brancos. *Abdome:* tegumento negro; tergitos I–VII sem escamas e cobertos de cerdas; esternito VIII com poucas escamas espatuladas claras no ápice.

**Genitália masculina.** (Fig. 28; Anexo 5) *Segmento VIII:* com cerdas longas e curtas; tergito sem escamas, esternito com raras escamas estreitas. *Proctiger:* membranoso mesalmente, com espículas diminutas mesal e lateralmente, fortemente esclerotinado lateralmente e na base. *Gonocoxito:* cerda acessória dorsal larga, quase o dobro da ventral, levemente curvada

posteriormente; cerda acessória ventral reta e delgada; cerda interna delgada, curvada anteriormente; cerda parabasal larga, levemente curvada no ápice em forma de colher. *Claspete ventral*: sem espículas, ápice com forma um tanto arredondada, superfície ventral com lobos distintos, sulco medial em forma de V. *Claspete dorsal*: com uma cerda estreita surgindo subapicalmente, duas largas, contorcidas, cerda ventral achatada surgindo do ápice. *Falósoma*: edeago longo, delgado, fortemente esclerotizado lateralmente, com um par de folíolos subapicais, folíolos bem desenvolvidos, fortemente esclerotizados, serrilhados, seus ápices se afastam levemente do edeago com o qual formam um ângulo de 25°. Projeção ventromesal subtriangular aproximadamente na metade do tamanho do folíolo.

**Pupa.** *Cefalotórax*: Tegumento moderadamente pigmentado; trompa de moderada a fortemente pigmentada, de claro a marrom escuro; trompa grande, longa; meato curto; pina aproximadamente 0,8 do comprimento da trompa (Anexo 6). *Abdome*: tegumento moderadamente pigmentado; cerda 0-II-VIII diminuta; cerda 1-II, III simples, curta e fina; cerda 1-IV-VII geralmente simples, média, fina; cerda 5-IV-VII geralmente simples e tão longa quanto a cerda 1; cerda 14-IV-VIII diminuta; cerda 9-II-V diminutas e sem pigmentação; cerda 9-VI-VIII longa e fortemente pigmentada. *Paleta*: mais longa do que larga, cerda 1-P simples, fortemente pigmentada; cerda 2-P simples e fina.

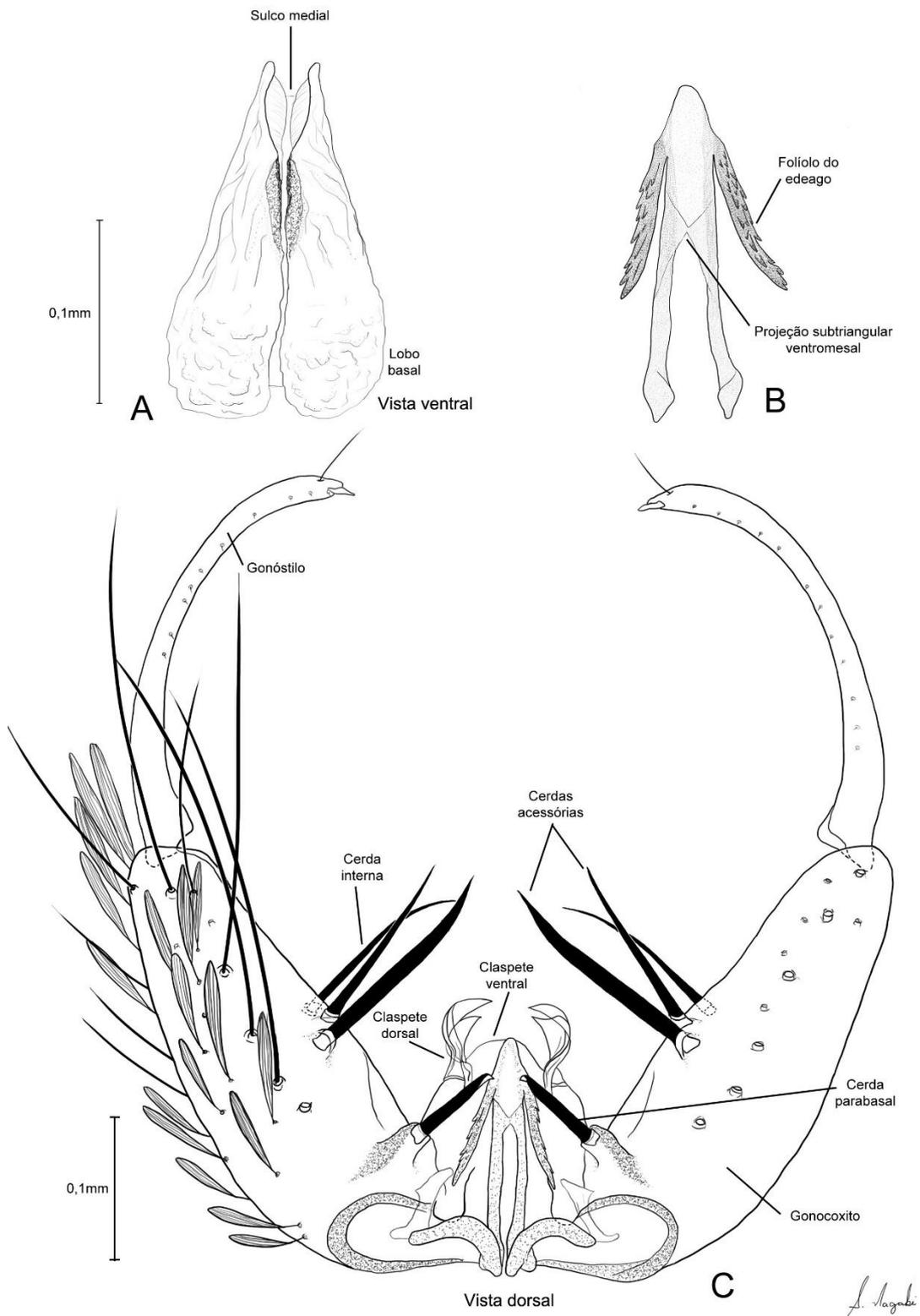


Figura 28. *Anopheles pristinus*, espécime da região entre os municípios de Pindamonhangaba e Campos do Jordão, SP. (A) Claspete ventral e dorsal, vista ventral; (B) Edeago; (C) Genitália masculina, vista dorsal.

**Larva de 4º estágio.** *Cabeça:* tegumento moderadamente esclerotizado; cerda 2-C simples, levemente aciculada; cerda 4-C simples, geralmente aciculada, longa, alcançando a base de 2-C; cerda 8-C geralmente com mais de 5 ramos. *Antena:* cerda 1-A com ramos longos. *Tórax:* cerda 14-P geralmente com mais de 5 ramos longos (Fig. 29A); cerda 3-T com longos folíolos hialinos; cerdas 9,10-T simples, aciculadas. *Abdome:* cerda 1-I geralmente simples; 1-II–VII com folíolos muito hialinos, pedúnculo estreito e alongado (Fig. 29B); cerda 3-I com haste longa e mais de 4 ramos; cerda 6-IV–VI geralmente com mais de 4 ramos (Fig. 29C). Aparelho espiracular com abertura mediana (Fig. 29D). *Segmento X:* tegumento com finas e pequenas espículas, maiores na margem caudal, cerda 1-X tão longa quanto a sela.

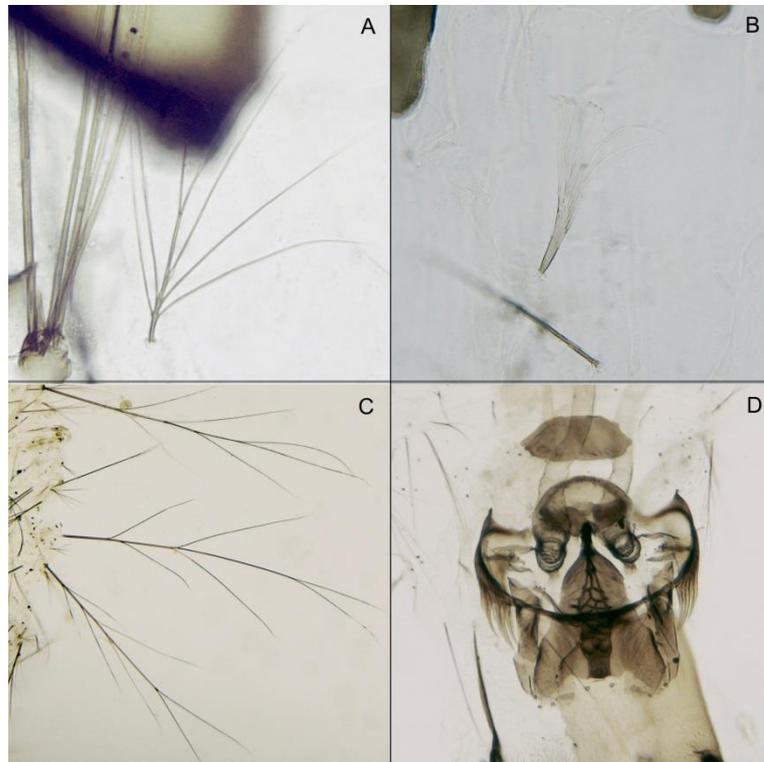


Figura 29. *Anopheles pristinus*. (A) cerda 14-P; (B) cerda 1-II–VII; (C) cerda 6-IV–VI; (D) placa espiracular.

**Ovo.** (Fig. 30). De cor preta, com flutuadores em posição lateral, longos, cobrindo parte da superfície dorsal, gomos fracamente divididos em lobos; convés estreito, uniformemente coberto com finos tubérculos; plastrão ventral e lateral com áreas rachadas não uniformes.

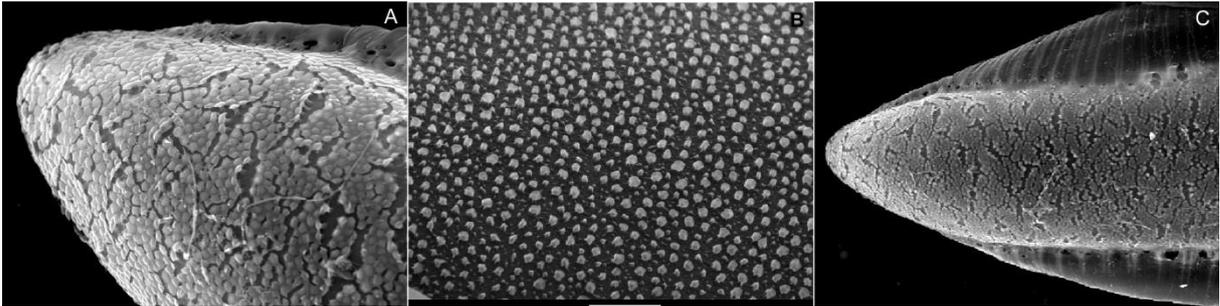


Figura 30. *Anopheles pristinus*. (A) áreas rachadas da superfície ventral; (B) tubérculos do convés; (C) extremidade posterior do ovo, vista ventral.

**Bionomia.** *An. pristinus* é uma espécie silvestre que ocorre em altitudes elevadas em mata sombreada na Serra da Mantiqueira, sul do Brasil. Coletas foram realizadas na Fazenda Saint Clair, Pico do Itapeva, na fronteira entre os municípios de Pindamonhangaba e Campos do Jordão, em uma altitude de aproximadamente 1.781 metros. Larvas e pupas foram coletadas em pequenos criadouros no solo coberto por gramíneas em área aberta fora da mata. A água de um pequeno córrego era lenta, fria e bem oxigenada (NAGAKI et al., 2010). Espécimes imaturos também foram coletados em ambiente muito sombreado dentro da mata, em criadouros no solo de água estagnada, límpida e fria.

**Importância Médica.** A espécie não é conhecida como sendo de importância médica.

**Caracterização molecular:** O comprimento da sequência de ITS2 foi constante em 607 pb (sem a região dos primers). As sequências revelaram um único haplótipo que consiste de 20,6% T, 21,6% A, 26,7% C e 31,1% G. Utilizando o algoritmo BLAST, uma busca FASTA no bando de dados: nucleotide collection – otimizado para: Somewhat Similar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) revelou que sequências de ITS2 de *An. pristinus* compartilham 90% de similaridade com a espécie mais próxima *An. lutzii* dentro de uma cobertura de 100% (Fig. 31).

```

An pristinus | 130 140 150 160 170 180 190 200 210 2
CACATATCGAACTAGCGA---CGCGGGGTCTCCGGACCCG---GCCGAGCTGCGTACTGATGATTTGATTGACGCCGGTAACACGCGCG
An pristinus | .....
An lutzii    | .G.....AGCG.....GCGG.....TA---A....
An lutzii    | .G.....AGCG.....GCGG.....TA---A....

```

Figura 31. Fragmento de alinhamento de sequências de ITS2 mostrando diferenças entre *Anopheles pristinus* e a espécie mais próxima.

**Distribuição geográfica.** (Fig. 32) **BRASIL**, São Paulo, Pindamonhangaba/Campos do Jordão, Pico do Itapeva (NAGAKI et al., 2010).

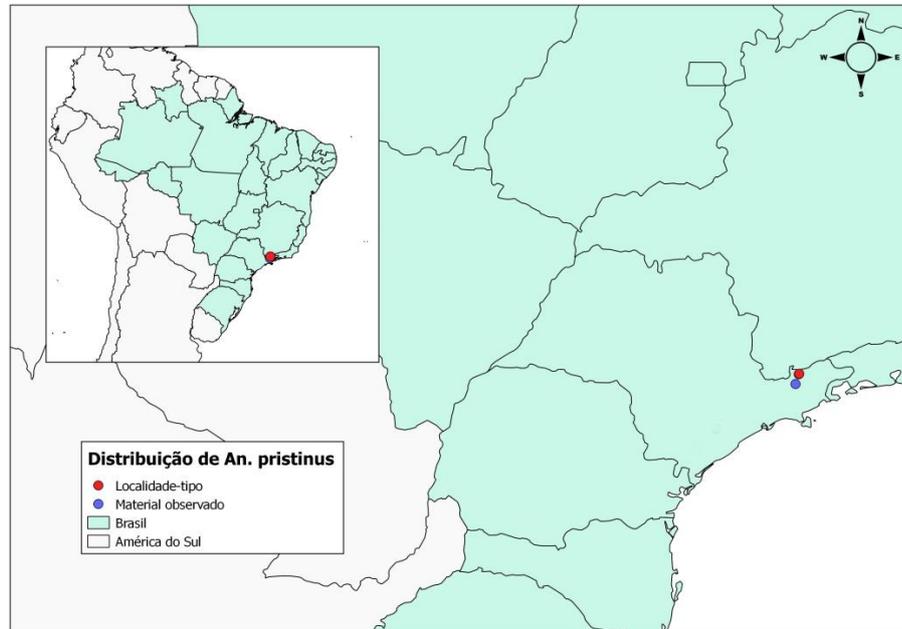


Figura 32. Mapa da distribuição geográfica de *Anopheles pristinus* no Brasil. O mapa foi construído com dados obtidos na literatura e material observado.

**Material examinado.** *Material-tipo.* Brasil, São Paulo, Pindamonhangaba/Campos do Jordão, Pico do Itapeva, Fazenda Saint Clair, (-22,75847222S, -45,51527778W, SAD 69), Nagaki et al. coll., 27-I-2009, Nagaki & Sallum det., 2009, (FSP), holótipo E-13162 [MLPeG], parátipos: SP53-1 [FLPe], SP53-3 [FLPe], SP55(1) [F, asa em lâmina], SP55(3) [F, asa em lâmina], SP55a [F], SP55b [F]. *Outro Material.* Brasil, São Paulo, Campos do Jordão, Pico do Itapeva (22°45.435'S 45°30.71'W), Sallum & Wilkerson coll., 20-XI-2001, Sallum det., 2001, (identificado como *An. antunesi*) Nagaki det., 2014, (identificado como *An. pristinus*), (FSP), E-12370 [LePe]; Pindamonhangaba, Pico do Itapeva (22°45'31,7"S 45°30'55,8"W), Sallum et al. coll., 27-X-2006, Sallum det., 2007, (identificado como *An. antunesi*), Nagaki det., 2015, (identificado como *An. pristinus*), (FSP), VP11 (4F); Fazenda Saint Clair, (-22,75847222S, -45,51527778W, SAD 69), Nagaki et al. coll., 27-I-2009, Nagaki & Sallum det., 2009, (FSP), SP151-100 [Pe], SP53-4 [Le], SP53-5 [Le], SP53-100 [MPeG], SP53-101 [FPe, asa em lâmina]; Fazenda Sain Clair (22°44'89,3"S 45°30'34,4"W), Nagaki et al. coll., 25-IV-2013, Nagaki det., 2013, (FSP), SP147-1 [FLPe], SP147-2 [FLPe], SP147-3 [FLPe], SP147-4 [MLPe], SP147-6 [MLPe], SP147-100 [MPe], SP147-

101 [Le], SP147-102 [Le], SP147-103 [LeG]; Nagaki et al., coll., 08-XII-2013, Nagaki det., 2013, (FSP), SP149-1 [FLePe], SP149-4 [FLePe], SP149-100 [FPe], SP149-101 [MPeG], SP149-102 [MPe], SP149-103 [FPe], SP149-104 [FPe], SP149-105 [FPe], SP149-106 [Le], SP149-107 [Le], SP149-111 [Le]; Nagaki et al. coll., 14-I-2014, Nagaki det., 2014, (FSP), SP150-102 [LeG].

### Material-tipo – Estado de conservação

Coleção: Faculdade de Saúde Pública (FSP) – São Paulo, Brasil.

Procedência: Brasil

Exemplar: Holótipo representado por um adulto macho com número de registro E-13162 armazenado em frasco de vidro e respectiva lâmina de exúvias de larva de 4º estágio e pupa e genitália.

*Holótipo*: (Fig.33). Exemplar macho, montado em alfinete entomológico colado à triângulo de papel na porção ventral do tórax. Espécime em bom estado de conservação, ausência das pernas anteriores e perna mediana esquerda, além dos últimos segmentos abdominais (retirado para montagem da genitália).

*Lâmina*: Exúvias de larva de 4º estágio e pupa e genitália masculina montada entre lâmina e lamínula (Fig. 33B).

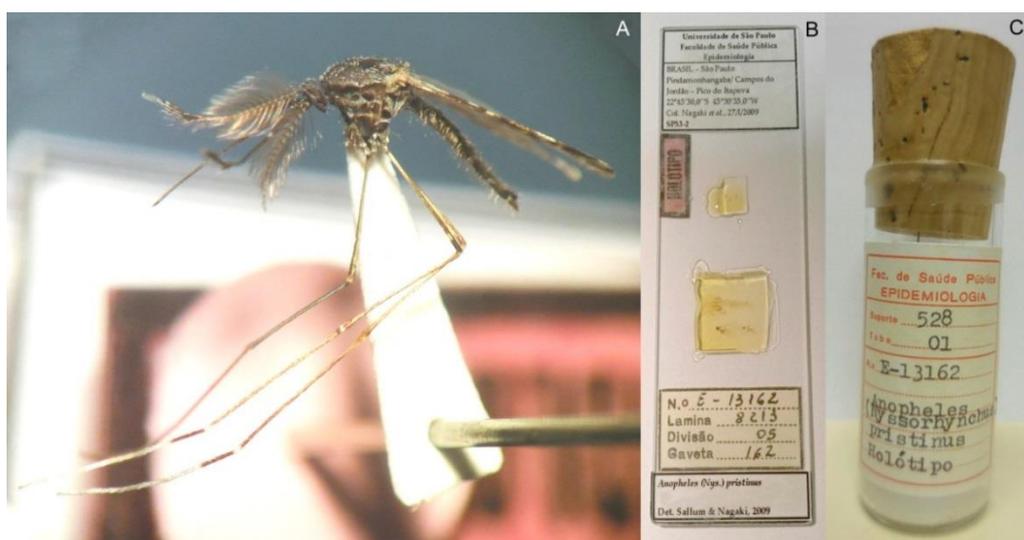


Figura 33. Holótipo de *Anopheles pristinus*. (A) Exemplar montado em alfinete entomológico; (B) Lâmina com exúvias de larva de 4º estágio e pupa, e genitália masculina; (C) Frasco de vidro onde o espécime é armazenado.

***Anopheles (Nyssorhynchus) lutzii* – Forma 1 n. sp. Nagaki & Sallum**

(Figuras 34, 35, 36, 37 e 38; Anexos 4, 5 e 6)

*Anopheles (Nys.) lutzii*: Bourke et al., 2011: 705 (filogenia molecular); Foster et al., 2013 (filogenia molocular).

**Diagnose.** O espécime adulto é muito semelhante a *An. lutzii*, a veia R<sub>4+5</sub> é no seu aspecto geral ligeiramente mais escura, sobretudo por ser variável muitas vezes não é possível distinguí-la. Na genitália masculina, o ápice do claspete ventral possui a forma levemente arredondada. A trompa da pupa é fortemente pigmentada, assim como a cabeça da larva. A cerda 14-P possui ramos curtos e as cerdas 6-IV–VI são simples.

**Fêmea.** Mosquito de aspecto geral escuro. *Cabeça*: Espaço interocular com um tufo frontal de cerdas brancas e longas e escamas piliformes, claras e decumbentes; vértice com escamas claras espatuladas e decumbentes. *Asa*: (Anexo 4) Veia R clara aproximadamente 0,5 proximal; veia R<sub>4+5</sub> variável, sobretudo escura, com escamas claras nas extremidades distal e proximal, conjunto pequeno de escamas escuras na 0,2 proximal e 0,8 distal e algumas escamas claras ao longo da veia; veia M variável, com manchas claras e escuras; veia CuA<sub>1</sub> com quatro manchas claras intercaladas com três manchas escuras. *Pernas*: tarsômeros anteriores 1–3 com pequena marcação apical de escamas claras na superfície dorsal, tarsômero 4–5 escuro; tarso mediano escuro, tarsômeros 1–2 com poucas escamas claras no ápice; tarsômero posterior 1 com um anel apical de escamas claras, tarsômero 2 com aproximadamente 0,5 apical de escamas claras, tarsômeros 3–5 completamente brancos. *Abdome*: tegumento marrom escuro; tergitos I–VII sem escamas e cobertos de cerdas; esternito VII com escamas espatuladas escuras no ápice. *Cerca*: coberta de escamas escuras.

**Genitália masculina.** (Fig. 34; Anexo 5) *Segmento VIII*: tergito e esternito sem escamas e com cerdas. *Proctiger*: membranoso mesalmente, glabro, fortemente esclerotinado lateralmente. *Gonocoxito*: cerda acessória moderadamente longa, larga, afinando no ápice, terminando em um ápice estreito e pontiagudo; cerda acessória dorsal levemente curvada posteriormente; cerda acessória ventral reta; cerda interna delgada, curvada anteriormente; cerda parabasal larga, levemente curvada no ápice em forma de colher. *Claspete ventral*: ápice pouco rugoso, com forma levemente arredondada, superfície ventral com dois lobos

distintos, sulco mediano em forma de oval. *Claspete dorsal*: com uma cerda estreita surgindo subapicalmente, duas largas, contorcidas, surgindo do ápice. *Falósoma*: edeago longo, delgado, fortemente esclerotizado lateralmente, com um par de folíolos subapicais; folíolos bem desenvolvidos, fortemente esclerotizado, serrilhado, paralelo ao edeago; projeção ventromesal subtriangular aproximadamente 0,3 apical do comprimento do folíolo.

**Pupa.** *Cefalotórax*: Tegumento levemente pigmentado, com áreas mais escuras nas pernas e probóscide; trompa curta e fortemente pigmentada, de claro a marrom escuro no ápice, trompa truncada e dilatada apicalmente em vista lateral; pina aproximadamente 0,6 comprimento da trompa, base da abertura estreita (Anexo 6); cerdas 1–3-CT curtas, geralmente simples; cerda 10-CT geralmente simples (1–2). *Abdome*: tegumento levemente pigmentado, amarelo pálido; cerda 0-II-VIII diminuta; cerda 1-II, III com ramos longos; cerda 1-IV-VII geralmente simples, longa; cerda 14-IV–VIII diminuta; cerda 9-II–IV sem pigmentação, diminutas; cerda 9-V–VIII longas e fortemente pigmentadas. *Paleta*: fracamente pigmentada, mais longa do que larga, cerda 1-P simples, fortemente pigmentada; cerda 2-P simples e fina.

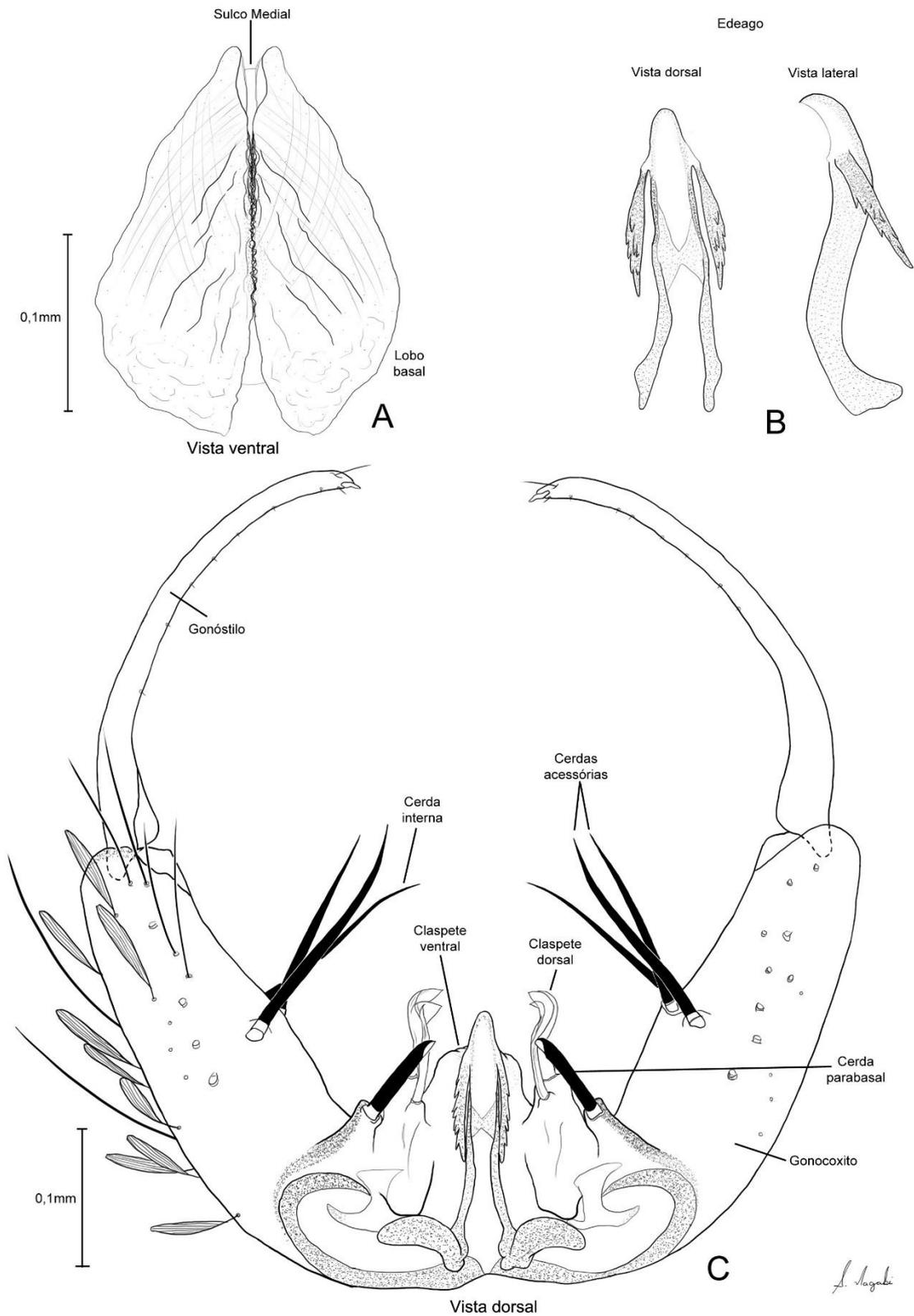


Figura 34. *Anopheles lutzii* – Forma 1 n.sp, espécime do município de Maquiné, RS. (A) Claspete ventral, vista ventral; (B) Edeago, vistas dorsal e lateral; (C) Genitália masculina, vista dorsal.

**Larva de 4º estágio.** *Cabeça:* tegumento na região do ápótema dorsal muito esclerotizado; cerda 2-C simples; cerda 4-C simples ou com dois ramos, longa, quase alcançando a base de 2-C; cerda 8-C geralmente bífida. *Antena:* com pequenas e finas espículas, superfície ventral com espículas mais longas; 1-A com 2–3 ramos curtos. *Tórax:* cerda 14-P com 2–4 ramos curtos (Fig. 35A); cerda 3-T com folíolos hialinos; cerdas 9 e 10-T simples, aciculadas. *Abdome:* cerda 1-I geralmente bífida; cerda 1-II–VII palmada, com folíolos pontiagudos (Fig. 35B); cerda 6-IV–VI simples, 6-IV pode apresentar 2 ou 3 ramos (Fig. 35C); aparelho espiracular com abertura larga (Fig. 35D). *Segmento X:* tegumento com finas e pequenas espículas, cerda 1-X tão longa quanto a sela.

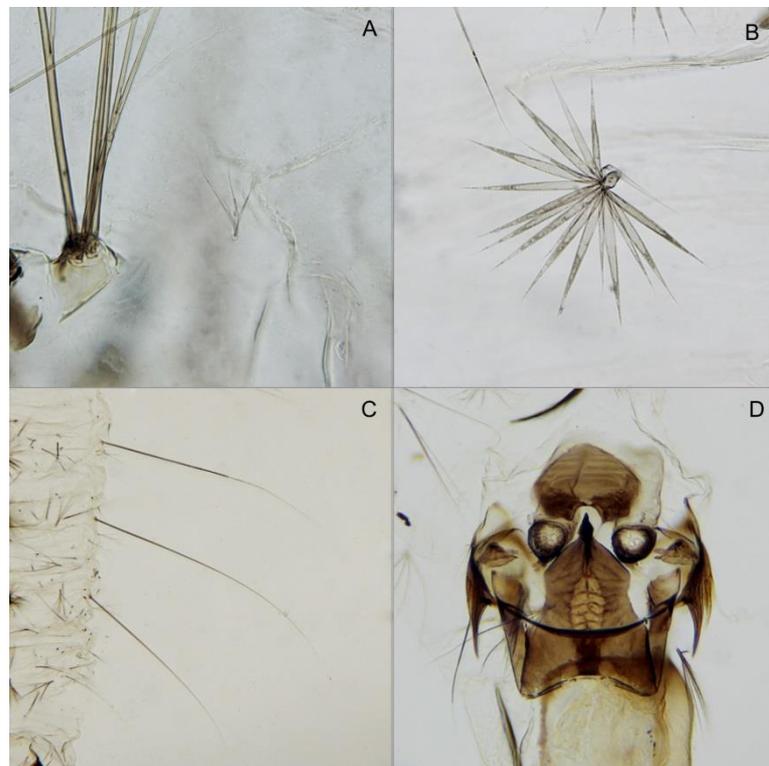


Figura 35. *Anopheles lutzii* – Forma 1 n.sp. (A) cerda 14-P; (B) cerda 1-II–VII; (C) cerda 6-IV–VI; (D) placa espiracular.

**Ovo.** (Fig. 36). De cor preta, com flutuadores em posição lateral, cobrindo parte da superfície dorsal, gomos fracamente divididos em lobos; convés estreito, uniformemente coberto por tubérculos de formato irregular; plastrão ventral e lateral com poros um tanto circulares.

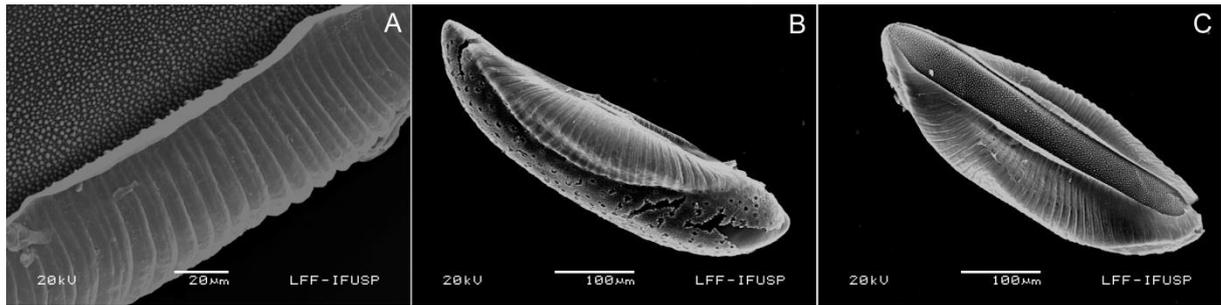


Figura 36. *Anopheles lutzii* – Forma 1 n.sp. (A) tubérculos do convés e flutuador; (B) vista lateral; (C) vista ventral.

**Bionomia.** Larvas e pupas foram encontradas em água limpa e fresca, com pH 6, em remansos de riachos em área sombreada no meio da mata, a uma altitude de 80 metros. A água que desce da colina é canalizada perto da residência em uma fazenda para uso doméstico. Imaturos de *An. lutzii* – Forma 1 n.sp foram abundantes e nenhuma larva de outras espécies de *Anopheles* foram encontradas no local, apenas alguns espécimes do gênero *Culex*. Os adultos foram coletados em armadilha de Shannon com pico de atividade no crepúsculo, onde muitos espécimes de *An. (Kerteszia) cruzii* também ocorreram.

**Importância Médica.** A espécie não é conhecida como sendo de importância médica.

**Caracterização molecular:** O comprimento da sequência de ITS2 foi constante em 615 pb (sem a região dos primers). As sequências revelaram um único haplótipo que consiste de 20% T, 19,5% A, 29,4% C e 31,1% G. Utilizando o algoritmo BLAST, uma busca FASTA no bando de dados: nucleotide collection – otimizado para: Somewhat Similar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) revelou que sequências de ITS2 de *An. lutzii*- Forma 1 compartilham 84% de similaridade com a espécie mais próxima *An. antunesi* dentro de uma cobertura de 100% (Fig. 37).

```

An_lutzii-Forma 1 | .....150.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....
An_lutzii-Forma 1 | AAGCGCGCGCGCACGGTGGTCCCGGACCCCGGGCCGAGCTGCGTACTGATGATTTGATTGACGCCGCCCC--GTGGCGGTGT
An_antunesi      | .....T...G...G.TC.....GA.....GC..G..CG.C..GC.....
An_antunesi      | .....T...G...G.TC.....GA.....GC..G..CG.C..GC.....

```

Figura 37. Fragmento de alinhamento de sequências de ITS2 mostrando diferenças entre *Anopheles lutzii* – Forma 1 e a espécie mais próxima.

**Distribuição Geográfica.** (Fig. 38). **BRASIL**, Rio Grande do Sul, Maquiné, (FSP).

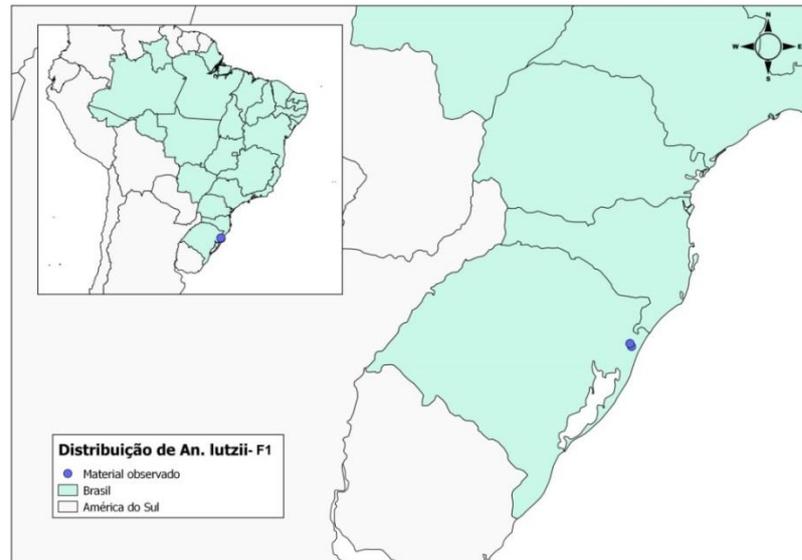


Figura 38. Mapa da distribuição geográfica de *Anopheles lutzii* - Forma 1 n.sp. no Brasil. O mapa foi construído com dados obtidos na literatura e material observado.

**Material Examinado.** *Material-tipo.* BRASIL, Rio Grande do Sul, Maquiné, Barra do Ouro (29°35'22''S 50°15'44''W), Sallum et al. coll., 11-I-2012, Nagaki det., 2013, (FSP), RS49-1 [MLePe], RS49-3 [FLePe], RS49-20 [FLePe], RS49-23 [MLePe], RS49-24 [FLePe], RS49-33 [FLePe], RS49-39 [FLePe], RS49-45 [FLePe], RS49-46 [FLePe], RS49-47 [MLePe], RS49-52 [F], RS49-53 [MPe], RS49-60 [MLePe], RS49-118 [MPe], RS52-7 [MLePe]. *Outro material.* Rio Grande do Sul, Maquiné, Barra do Ouro (29°35'22''S 50°15'44''W), Sallum et al. coll., 11-I-2012, Nagaki det., 2013, (FSP), RS49-4 [LePe], RS49-5 [LePe], RS49-6 [LePeG], RS49-7 [LePeG], RS49-8 [LePe], RS49-10 [LePe], RS49-11 [LePe], RS49-13 [LePeG], RS49-14 [LePeG], RS49-15 [LePe], RS49-16 [LePe], RS49-18 [LePe], RS49-21 [LePe], RS49-22 [LePeG], RS49-25 [LePeG], RS49-27 [LePe], RS49-28 [LePe], RS49-29 [LePeG], RS49-30 [LePe], RS49-32 [LePe], RS49-34 [LePe], RS49-35 [LePe], RS49-36 [LePe], RS49-37 [LePe], RS49-40 [LePe], RS49-42 [LePe], RS49-43 [LePe], RS49-44 [LePe], RS49-48 [Pe], RS49-50 [LePe], RS49-51 [Le], RS49-54 [Pe], RS49-55 [Pe], RS49-57 [LePe], RS49-59 [LePe], RS49-61 [LePe], RS49-62 [LePe], RS49-63 [LePe], RS49-64 [LePeG], RS49-68 [LePe], RS49-101 [Pe], RS49-102 [Pe], RS49-103 [Pe], RS49-104 [Pe], RS49-105 [Pe], RS49-106 [Pe], RS49-107 [Pe], RS49-108 [Pe], RS49-109 [Pe], RS49-110 [Pe], RS49-111 [Pe], RS49-113 [Pe], RS49-114 [PeG], RS49-115 [Pe], RS49-116 [Pe], RS49-117 [Pe], RS52-3 [LePe], RS52-6 [LePe], RS52-8 [LePe], RS52-10 [LePe], RS52-13 [LePe], RS52-16 [LePe], RS52-18 [LePe], RS52-102 [Pe], RS52-104 [Pe]; FEPAGRO (29°39'42,7''S 50°13'10,0''W), Cardoso et al. coll., 18-III-2008, Sallum det., 2008, (identificado como *An. lutzii*) Nagaki det., 2015, (FSP), E-13340 [asas].

***Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* -Forma 1 n. sp. Nagaki & Sallum**

(Figuras 39, 40, 41 e 42; Anexos 4, 5 e 6)

*An. (Nys.) antunesi* de Nagaki et al., 2010: 282 (caracterização molecular); Bourke et al., 2011: 705 (filogenia molecular)

**Diagnose.** O adulto se assemelha muito a *An. antunesi*, no entanto possui no tarsômero posterior 2 aproximadamente 0,3 basal de escamas escuras. A larva também é similar a *An. antunesi*, porém apresenta cerda 6-IV-VI simples.

**Fêmea.** Mosquito de aspecto geral escuro. Se assemelha muito a *Anopheles lutzii*. *Asa:* (Anexo 4), veias de escamas escuras com manchas de escamas claras; veia R<sub>3</sub> escura; veia R<sub>4+5</sub> escura, com poucas escamas claras nas extremidades distal e proximal. *Pernas:* tarsômeros anteriores 1-3 com pequena marcação apical de escamas claras na superfície dorsal, tarsômero 4-5 escuro; tarso mediano escuro, tarsômeros 1-2 com poucas escamas claras no ápice; tarsômero posterior 1 com um anel apical de escamas claras, tarsômero 2 com aproximadamente 0,2 apical de escamas claras, tarsômeros 3-5 completamente brancos.

**Genitália masculina.** (Fig. 39; Anexo 5) *Segmento VIII:* tergito sem escamas, esternito com raras escamas muito estreitas, segmento com cerdas. *Proctiger:* membranoso mesalmente, glabro, fortemente esclerotinado lateralmente. *Gonocoxito:* cerda acessória moderadamente longa, larga, afinando no ápice, terminando em um ápice estreito e pontiagudo; cerda acessória dorsal levemente curvada posteriormente; cerda acessória ventral reta; cerda interna delgada, curvada anteriormente; cerda parabasal larga, levemente mais delgada e curvada no ápice em forma de colher. *Claspete ventral:* superfície ventral com dois lobos distintos. *Claspete dorsal:* com uma cerda estreita surgindo subapicalmente, duas largas, contorcidas, surgindo do ápice. *Falósoma:* edeago longo, delgado, fortemente esclerotinado lateralmente, com um par de folíolos subapicais; bem desenvolvidos, fortemente esclerotinados, serrilhados, paralelo ao eixo longitudinal do edeago sobrepondo-se parcialmente na parede do edeago; projeção ventromesal subtriangular aproximadamente no centro do comprimento do folíolo.

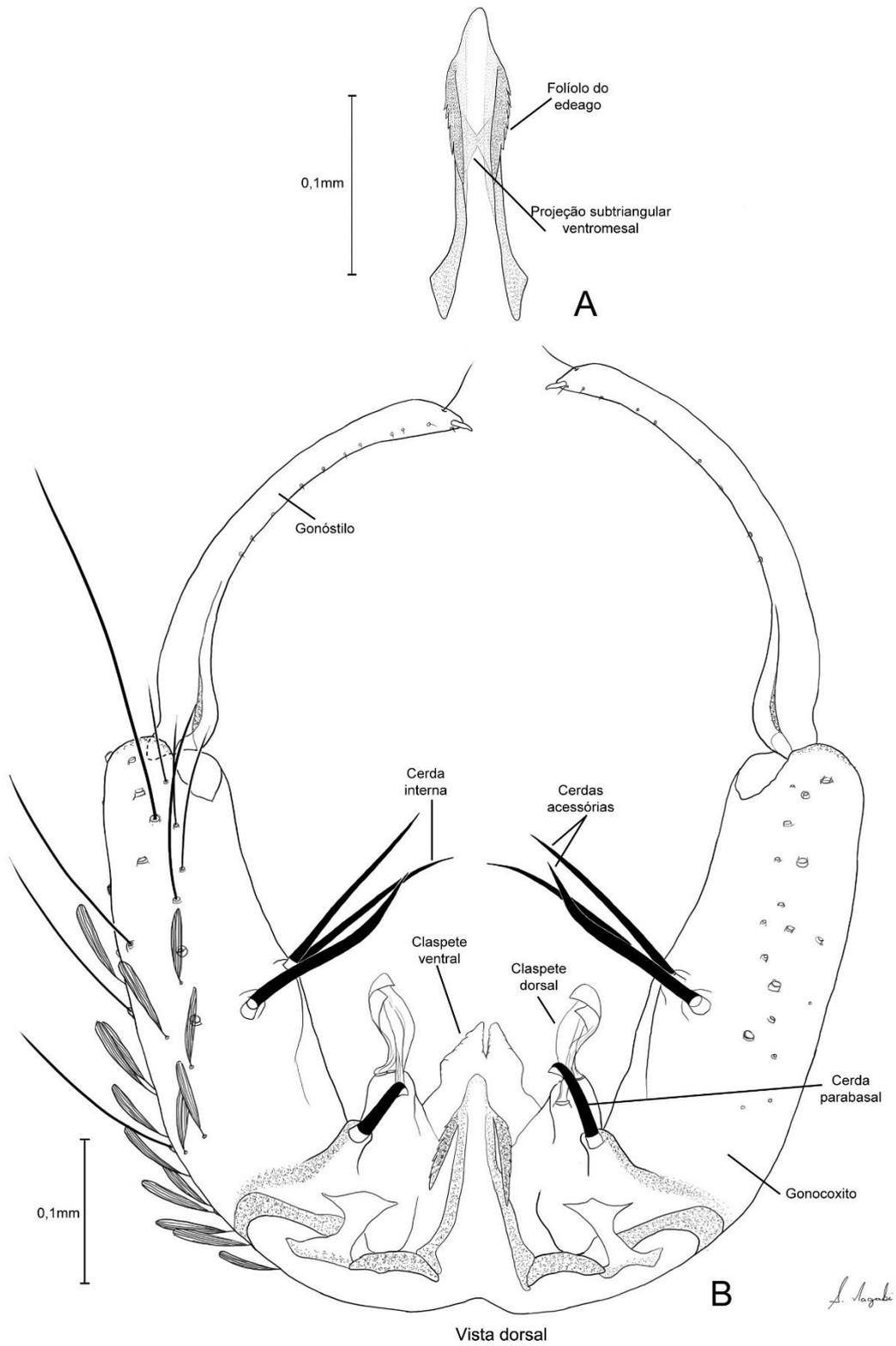


Figura 39. *Anopheles antunesi* - Forma 1 n. sp, espécime do município de Pindamonhangaba, SP. (A) Edeago; (B) Genitália masculina, vista dorsal.

**Pupa.** *Cefalotórax:* Tegumento levemente pigmentado, com áreas mais escuras nas pernas e probóscide; trompa longa levemente pigmentada, marrom claro no ápice, trompa truncada e dilatada apicalmente em vista lateral; pina aproximadamente 0,6 do comprimento da trompa (Anexo 5). *Abdome:* tegumento levemente pigmentado; cerda 0-II-VIII diminuta; cerda 1-II, III com ramos longos; cerda 3-I com 2–5 ramos; cerda 7-II com 2–4 ramos; cerda 9-II–IV sem pigmentação, diminutas; cerda 9-V–VIII longas e fortemente pigmentadas. *Paleta:* fracamente pigmentada, mais longa do que larga, cerda 1-P simples, fortemente pigmentada; cerda 2-P simples e fina.

**Larva.** *Cabeça:* tegumento moderadamente esclerotizado; cerda 2-C simples; cerda 4-C simples ou com dois ramos, longa, quase alcançando a base de 2-C; cerda 8-C com 3–6 ramos. *Antena:* com pequenas espículas, superfície ventral com espículas mais longas; cerda 1-A com 2–5 ramos longos e finos. *Tórax:* cerda 14-P com 3–4 ramos longos (Fig. 40A); cerda 3-T com 4–7 ramos; cerdas 9 e 10-T simples, aciculadas. *Abdome:* cerda 1-I geralmente bífida e curta; cerda 1-II–VII palmada, com folíolos pontiagudos (Fig. 40B); cerda 6-IV–VI simples (Fig. 40C). Aparelho espiracular com abertura larga (Fig. 40D). *Segmento X:* tegumento com finas e pequenas espículas, cerda 1-X mais longa que a sela.

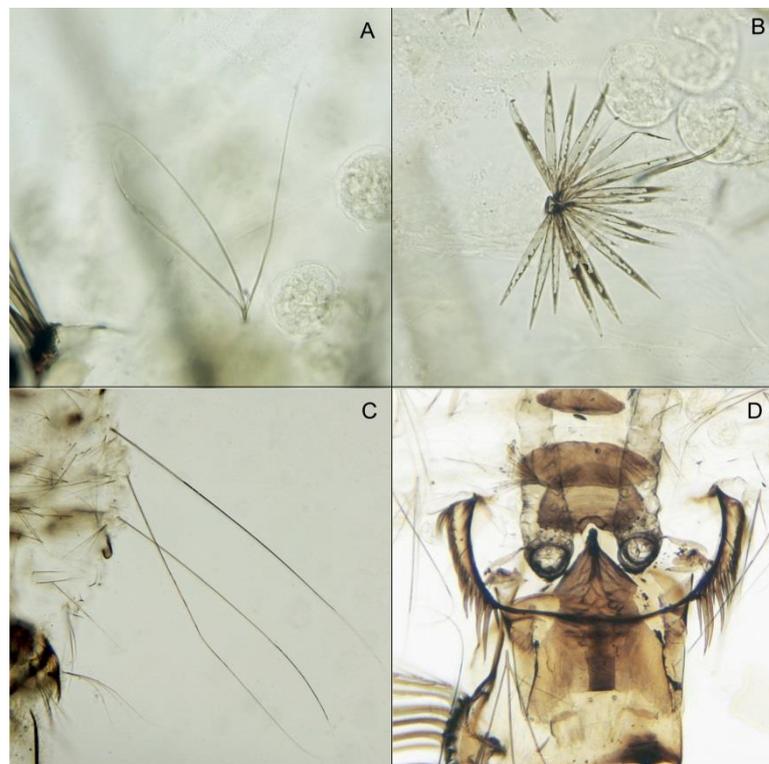


Figura 40. *Anopheles antunesi* - Forma 1 n. sp. (A) cerda 14-P; (B) cerda 1-II–VII; (C) cerda 6-IV–VI; (D) placa espiracular.

**Ovo.** Desconhecido.

**Bionomia.** *Anopheles antunesi* - Forma 1 n. sp. é uma espécie que ocorre em altitudes elevadas em mata sombreada na Serra da Mantiqueira. Coletas foram realizadas na Fazenda Saint Clair, Pico do Itapeva, na fronteira entre os municípios de Pindamonhangaba e Campos do Jordão, em altitude de mais de 1.000 metros. Espécimes imaturos foram coletados em ambiente sombreado dentro da mata, com vegetação em torno dos criadouros no solo, de água estagnada, límpida e fria. A espécie é simpátrica a *An. antunesi* e *An. pristinus*.

**Importância Médica.** A espécie não é conhecida como sendo de importância médica.

**Caracterização molecular:** O comprimento da sequência de ITS2 foi constante em 609 pb (sem a região dos primers). As sequências revelaram um único haplótipo que consiste de 19,7% T, 22,3% A, 28,6% C e 29,4% G. Utilizando o algoritmo BLAST, uma busca FASTA no bando de dados: nucleotide collection – otimizado para: Somewhat Similar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) revelou que sequências de ITS2 de *An. antunesi* – Forma 1 compartilham 91% de similaridade com a espécie mais próxima *An. antunesi* dentro de uma cobertura de 100% (Fig. 41).

```

An antunesi-Forma 1 | 150 160 170 180 190 200 210 220 230
An antunesi-Forma 1 | AAGC-TCGCGCGGGGTCCCCGCGGACCCCGCCGGACCAAGCTGCGTACTGATGATTTGAATGACGC--CCGCCCGG-----GCGTGTGGT
An antunesi         | .....
An antunesi         | .....C.....CG.....G.....G.....G.....T.....GC.....CGGGC.T.....
An antunesi         | .....C.....CG.....G.....G.....G.....T.....GC.....CGGGC.T.....

```

Figura 41. Fragmento de alinhamento de sequências de ITS2 mostrando diferenças entre *Anopheles antunesi* – Forma 1 e a espécie mais próxima.

**Distribuição Geográfica.** (Fig. 42). **BRASIL**, São Paulo, Pindamonhangaba (FSP).

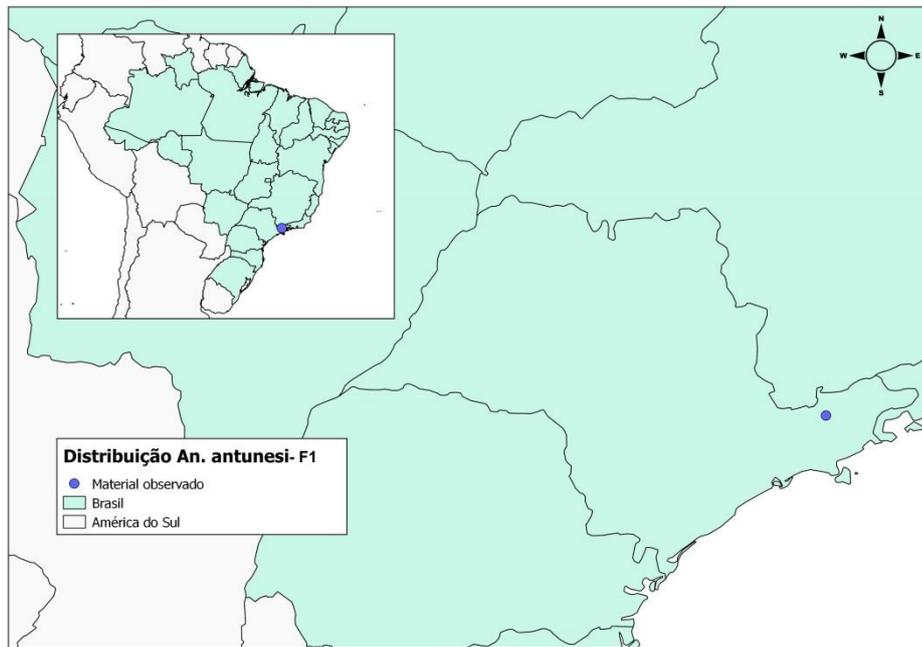


Figura 42. Mapa da distribuição geográfica de *Anopheles antunesi* - Forma 1 n. sp. no Brasil. O mapa foi construído com dados obtidos na literatura e material observado.

**Material Examinado.** BRASIL, São Paulo, Pindamonhangaba, Pico do Itapeva, Fazenda Saint Clair (22°45'89,3"S 45°30'34,4"W), Nagaki et al. coll., 08-XII-2011, Nagaki det., 2015, (FSP), SP132-23 [MLePeG], SP132-25 [MPeG], SP132-106 [Le]; Nagaki et al. coll., 08-XII-2013, Nagaki det., 2013, (FSP), SP149a [F], SP149-108 [Le], SP149-109 [Le], SP149-110 [LeG], SP149-112; Nagaki et al. coll., 14-I-2014, Nagaki det., 2014, (FSP), SP150-1 [MLePeG].

***Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi*–Forma 2 n. sp. Nagaki & Sallum**

(Figuras 43, 44, 45, 46 e 47; Anexos 4, 5 e 6)

*An. (Nys.) lutzii* de Bourke et al., 2011: 705 (filogenia molecular); Foster et al., 2013 (filogenia molecular).

**Diagnose.** O espécime não se distingue morfológicamente de *An. antunesi*.

**Fêmea.** Mosquito de aspecto geral escuro. *Cabeça:* Vértice com escamas espatuladas claras, sendo as do centro mais truncadas. *Tórax:* tegumento do escudo com coloração geral marrom escuro; escamas claras, espatuladas e decumbentes na região acrostical, dorsocentral e anteriormente a área pré-escutelar; escutelo com marcação mais escura na área central. *Asa:* (Anexo 4), veias de escamas escuras com manchas de escamas claras como segue: costa sempre com basal clara, basal escura e pré-umeral escura, umeral clara, umeral escura e pré-setor, setor escura proximal, setor acessório clara, setor escura distal, subcostal clara, pré-apical escura, pré-apical clara e apical escura; veia R<sub>4+5</sub> variável, com maior número de escamas claras, de aspecto geral mais claro do que escuro; veia M também bastante variável

**Genitália masculina.** (Fig. 43; Anexo 5) *Segmento VIII:* tergito sem escamas, esternito com raras escamas muito estreitas, segmento com cerdas. *Proctiger:* membranoso mesalmente, glabro, fortemente esclerotizado lateralmente. *Gonocoxito:* cerda acessória moderadamente longa, larga, afinando no ápice, terminando em um ápice estreito e pontiagudo; cerda acessória dorsal levemente curvada posteriormente; cerda acessória ventral reta; cerda interna delgada, curvada anteriormente; cerda parabasal larga, levemente mais delgada e curvada no ápice em forma de colher. *Claspete ventral:* ápice rugoso e truncado, superfície ventral com dois lobos distintos, sulco medianos em forma oval. *Claspete dorsal:* com uma cerda estreita surgindo subapicalmente, duas largas, contorcidas, surgindo do ápice. *Falósoma:* edeago longo, delgado, fortemente esclerotizado lateralmente, com um par de folíolos subapicais; folíolos bem desenvolvidos, fortemente esclerotizado, serrilhado, paralelo ao eixo longitudinal do edeago; projeção ventromesal subtriangular aproximadamente 0,3 apical do comprimento do folíolo.

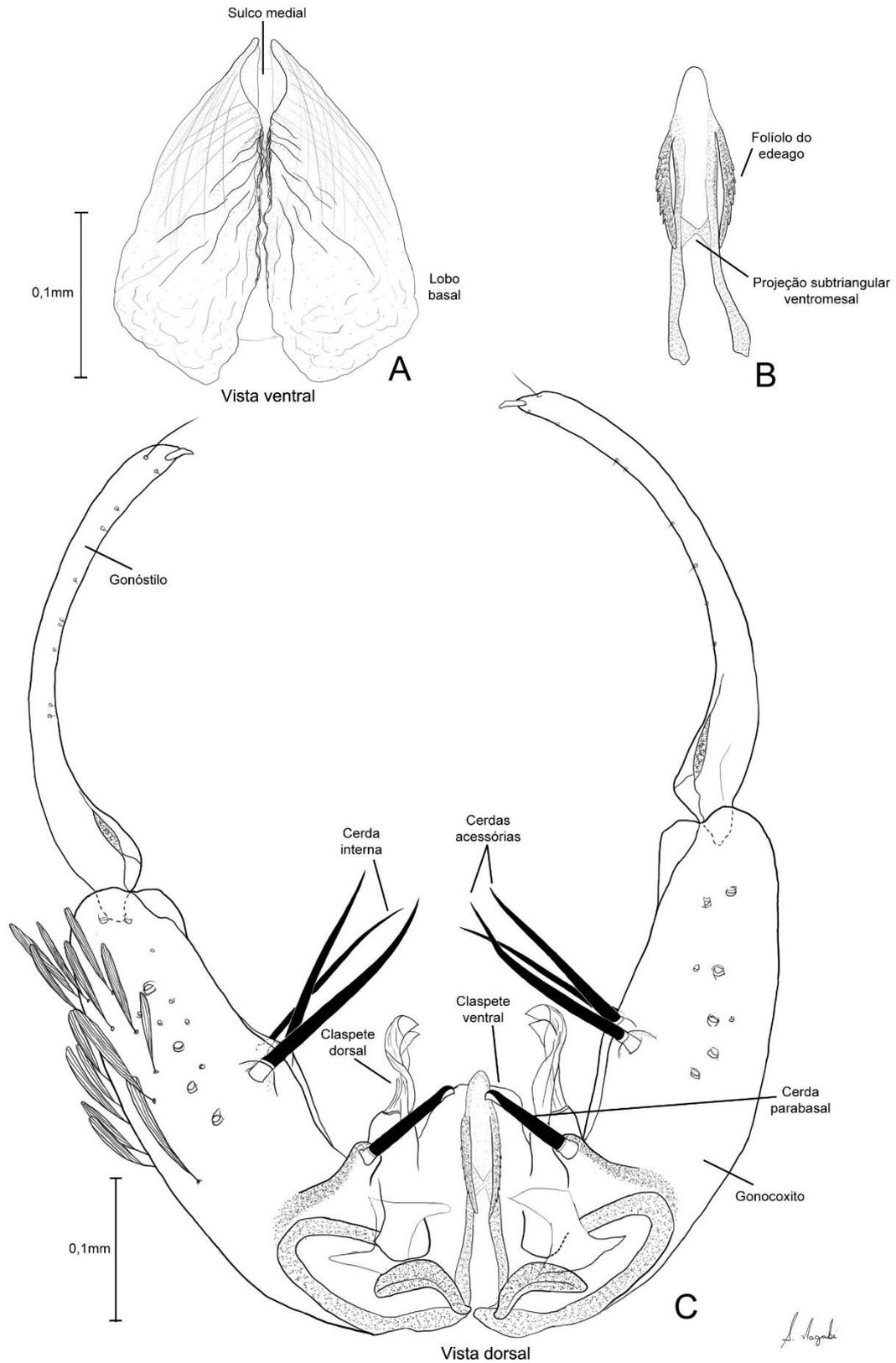


Figura 43. *Anopheles antunesi* - Forma 2 n. sp, espécime do município de São Francisco de Paula, RS.

(A) Claspete ventral, vista ventral; (B) Edeago; (C) Genitália masculina, vista dorsal.

**Pupa.** *Cefalotórax:* trompa longa e moderada a fortemente pigmentada, de claro a marrom escuro; trompa truncada e dilatada apicalmente em vista lateral; pina aproximadamente 0,7 do comprimento da trompa (Anexo 6); cerdas 1–3-CT curtas, simples ou duplas; cerda 10-CT geralmente dupla (1–3). *Abdome:* tegumento levemente pigmentado, cerda 0-II-VIII diminuta; cerda 1-II, III com ramos médios; cerda 1-IV-VII geralmente simples, longa; cerda 9-II–IV sem pigmentação, diminutas; cerda 9-V–VIII longas e fortemente pigmentadas. *Paleta:* fracamente pigmentada, mais longa do que larga, cerda 1-P simples, fortemente pigmentada; cerda 2-P simples e fina.

**Larva de 4º estágio.** *Cabeça:* tegumento moderadamente esclerotizado; cerda 2-C simples; cerda 4-C simples, longa, alcançando a base de 2-C; cerda 8-C com 3–6 ramos. *Antena:* com pequenas espículas, superfície ventral com espículas mais longas; cerda 1-A com 3–6 ramos longos e finos. *Tórax:* cerda 14-P geralmente com 4 ramos longos (Fig. 44A); cerda 3-T com folíolos hialinos; cerdas 9 e 10-T simples, aciculadas. *Abdome:* cerda 1-I com 2–4 ramos; cerda 1-II–VII palmada, com folíolos pontiagudos (Fig. 44B); cerda 6-IV–VI geralmente bífida (Fig. 44C), 6-IV com 2–2 ramos, 6-V com 1–3 ramos, 6-VI com 1–4 ramos. Aparelho espiracular largo com abertura larga (Fig. 44D). *Segmento X:* tegumento com finas e pequenas espículas; cerda 1-X tão longa quanto a sela.

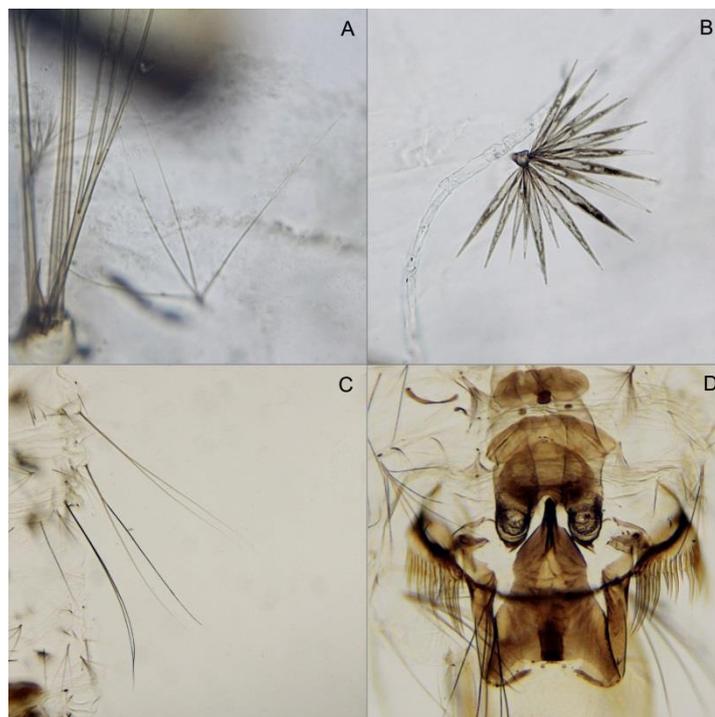


Figura 44. *Anopheles antunesi* – Forma 2 n. sp. (A) cerda 14-P; (B) cerda 1-II–VII; (C) cerda 6-IV–VI; (D) placa espiracular.



**Distribuição geográfica.** (Fig. 47). **BRASIL**, Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula, (FSP).

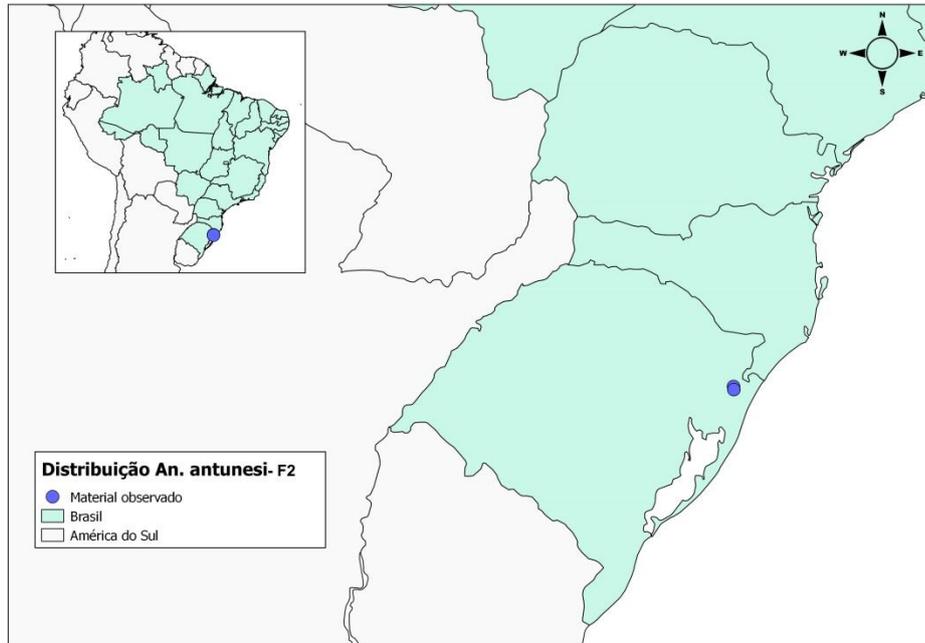


Figura 47. Mapa da distribuição geográfica de *Anopheles antunesi* - Forma 2 n. sp. no Brasil. O mapa foi construído com dados obtidos na literatura e material observado.

**Material Examinado.** *Material-tipo.* BRASIL, Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula, Est. Serra do Umbu (29°29'50,3''S 50°21'04,1''W), Sallum et al. coll., 13-I-2012, Nagaki det., 2013, (FSP), RS54-32 [MLePe], RS55-3 [LePe], RS59-4 [LePe], RS59-13 [FLPe], RS59-21 [FLPe], RS59-22 [MLePe]. *Outro Material.* BRASIL, Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula, Est. Serra do Umbu (29°29'50,3''S 50°21'04,1''W), Sallum et al. coll., 13-I-2012, Nagaki det., 2013, RS54-25 [LePeG], RS54-31 [LePe], RS54-33 [LePe], RS54-100 [Pe], RS54-101 [PeG], RS55-1 [LePeG], RS55-5 [LePe], RS59-5 [LePeG], RS59-6 [LePe], RS59-12 [LePeG], RS59-18 [LePeG], RS59-19 [LePe], RS59-20 [LePeG], RS59-23 [LePeG], RS59-24 [LePe], RS59-39 [LePe], RS59-109 [Pe], RS59-110 [Pe], RS59(6)-1 [LePeG].

***Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* -Forma 3 n. sp. Nagaki & Sallum**

(Figuras 48, 49, 50 e 51; Anexos 4 e 6)

*An. (Nys.) lutzii* de Bourke et al., 2011: 705 (filogenia molecular); Foster et al., 2013 (filogenia molecular).

**Diagnose:** Espécie morfologicamente semelhante a *An. antunesi*.

**Fêmea:** Mosquito de aspecto geral escuro. *Asa:* (Anexo 5), veia R<sub>4+5</sub> variável, de aspecto geral claro, com escamas claras nas extremidades distal e proximal, conjunto pequeno de escamas escuras na 0,2 proximal e 0,8 distal e escamas claras entre as manchas escuras; veia M variável, veia 1A escura com poucas escamas claras nas extremidades distal e proximal, e poucas escamas claras aproximadamente no meio da veia. *Pernas:* tarsômeros anteriores 1–3 com pequena marcação apical de escamas claras na superfície dorsal, tarsômero 4–5 escuro; tarso mediano escuro, tarsômeros 1–2 com poucas escamas claras no ápice; tarsômero posterior 1 com um anel apical de escamas claras, tarsômero 2 com aproximadamente 0,5 apical de escamas claras, tarsômeros 3–5 completamente brancos. *Abdome:* tegumento marrom escuro; segmentos I–VII sem escamas e cobertos de cerdas; esternito VIII com algumas escamas espatuladas no ápice.

**Genitália masculina.** (Fig. 48). *Segmento VIII:* tergito e esternito sem escamas, com cerdas. *Proctiger:* membranoso mesalmente, glabro, fortemente esclerotinado lateralmente. *Gonocoxito:* cerda acessória moderadamente longa, larga, afinando no ápice, terminando em um ápice estreito e pontiagudo; cerda acessória dorsal levemente curvada posteriormente; cerda acessória ventral reta; cerda interna delgada, curvada anteriormente; cerda parabasal larga, levemente mais delgada e curvada no ápice em forma de colher. *Claspete ventral:* ápice rugoso, superfície ventral com dois lobos distintos. *Claspete dorsal:* com uma cerda estreita surgindo subapicalmente, duas largas, contorcidas, surgindo do ápice. *Falósoma:* edeago longo, delgado, fortemente esclerotinado lateralmente, com um par de folíolos subapicais; folíolos bem desenvolvidos, fortemente esclerotinado, serrilhado, paralelo ao eixo longitudinal do edeago; projeção ventromesal subtriangular aproximadamente 0,3 apical do comprimento do folíolo.

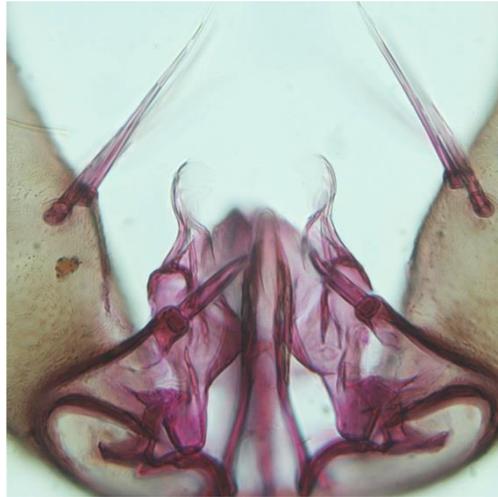


Figura 48. Genitália masculina de *An. antunesi* - Forma 3 n. sp. Espécime do município de Maquiné, RS. Vista dorsal.

**Pupa.** *Cefalotórax:* Tegumento levemente pigmentado; trompa longa de moderada a fortemente pigmentada; pina aproximadamente 0,7 do comprimento da trompa (Anexo 6). *Abdome:* tegumento levemente pigmentado; cerda 0-II-VIII diminuta; cerda 1-III-VII geralmente simples, com ramos longos; cerda 5-IV-VII geralmente simples e tão longa quanto a cerda 1 dos mesmos segmentos; cerda 9-II-IV sem pigmentação, diminutas; cerda 9-V-VIII longas e fortemente pigmentadas. *Paleta:* fracamente pigmentada, mais longa do que larga, cerda 1-P simples, fortemente pigmentada; cerda 2-P simples e fina.

**Larva de 4º estágio.** *Cabeça:* tegumento levemente esclerotizado; cerda 2-C simples; cerda 4-C simples, aciculada, longa, alcançando a base de 2-C; cerda 8-C com 3 ou mais ramos. *Antena:* com pequenas espículas, superfície ventral com espículas mais longas; cerda 1-A com ramos longos. *Tórax:* cerda 14-P geralmente com 3 ou 4 ramos longos (Fig. 49A); cerda 3-T com folíolos hialinos; cerdas 9 e 10-T simples e aciculadas. *Abdome:* cerda 1-I geralmente bífida; cerda 1-II-VII palmada, com folíolos pontiagudos (Fig. 49B); cerda 6-IV-VI bífida (Fig. 49C). Aparelho espiracular com abertura larga (Fig. 49D). *Segmento X:* tegumento com finas e pequenas espículas; cerda 1-X mais longa que a sela.

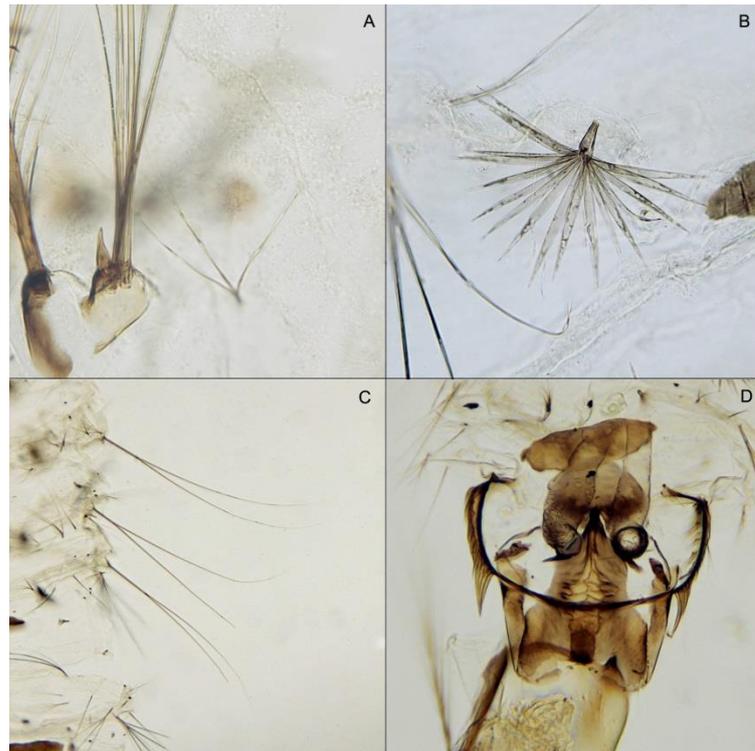


Figura 49. *Anopheles antunesi* - Forma 3 n. sp. (A) cerda 14-P; (B) cerda 1-II-VII; (C) cerda 6-IV-VI; (D) placa espiracular.

**Ovo.** Desconhecido

**Bionomia.** Larvas foram encontradas em água limpa e fresca, em remansos de riachos em área sombreada no meio da mata, a uma altitude de aproximadamente 80 metros.

**Importância Médica.** A espécie não é conhecida como sendo de importância médica.

**Caracterização molecular:** O comprimento da sequência de ITS2 foi constante em 596 pb (sem a região dos primers). As sequências revelaram um único haplótipo que consiste de 20,3% T, 21,1% A, 27,5% C e 31% G. Utilizando o algoritmo BLAST, uma busca FASTA no bando de dados: nucleotide collection – otimizado para: Somewhat Similar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) revelou que sequências de ITS2 de *An. antunesi* – Forma 3 compartilham 95% de similaridade com a espécie mais próxima *An. antunesi* dentro de uma cobertura de 100% (Fig. 50).

```

An antunesi-Forma 3 | 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
An antunesi-Forma 3 | GCCCTCGGGCCCGGCGTCCACCCGGGACCCGCGGGCCGAGCTGCGTACTGATGATTTGATTGACGCGCGCCCGCCCGGGCCCGTGTGTGTC
An antunesi        | .....C..G.....C.G.C.GGC..G.....
An antunesi        | .....C..G.....C.G.C.GGC..G.....

```

Figura 50. Fragmento de alinhamento de sequências de ITS2 mostrando diferenças entre *Anopheles antunesi* – Forma 3 e a espécie mais próxima.

**Distribuição Geográfica.** (Fig. 51). **BRASIL**, Rio Grande do Sul, Maquiné (FSP.).

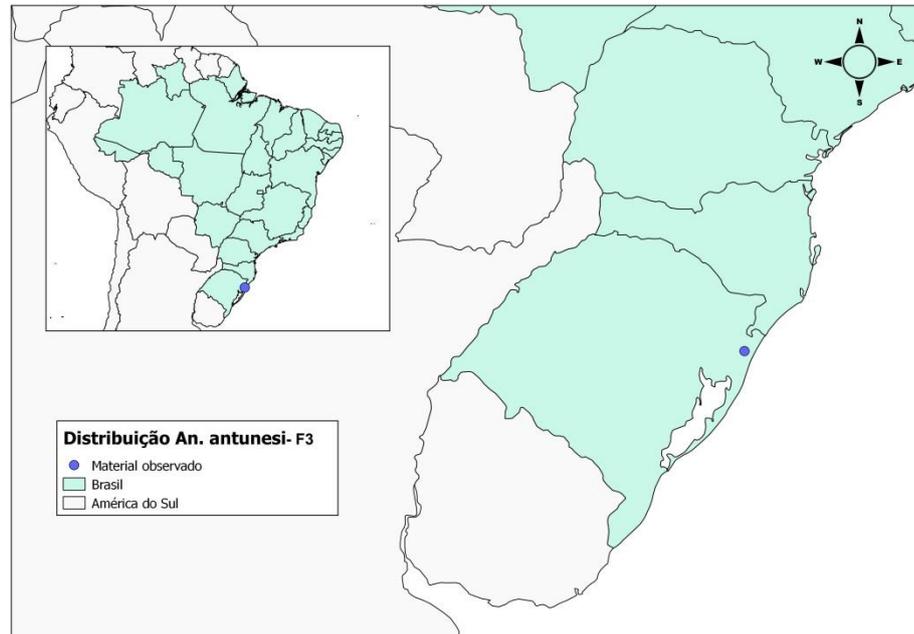


Figura 51. Mapa da distribuição geográfica de *Anopheles antunesi* - Forma 3 n. sp. no Brasil. O mapa foi construído com dados obtidos na literatura e material observado.

**Material Examinado.** BRASIL, Rio Grande do Sul, Maquiné, FEPAGRO (29°39'39"S 50°13'10"W) Sallum et al. coll., 10-I-2012, Nagaki det., 2013, (FSP), RS48-12 [LePe]; Barra do Ouro (29°35'22"S 50°15'44"W), Sallum et al. coll., 11-I-2012, Nagaki det., 2013, (FSP), RS49-9 [FLPe]; (29°35'26"S 50°15'48"W), Sallum et al. coll., 12-I-2012, Nagaki det., 2013, (FSP), RS52-15 [LePe]; FEPAGRO (29°39'42,7"S 50°13'10,0"W), Cardoso et al. coll., 18-III-2008, Sallum det., 2008, (identificado como *An. lutzii*) Nagaki det., 2014, (FSP), E-13341 [asas].

## 4.1.2. Distribuição Geográfica

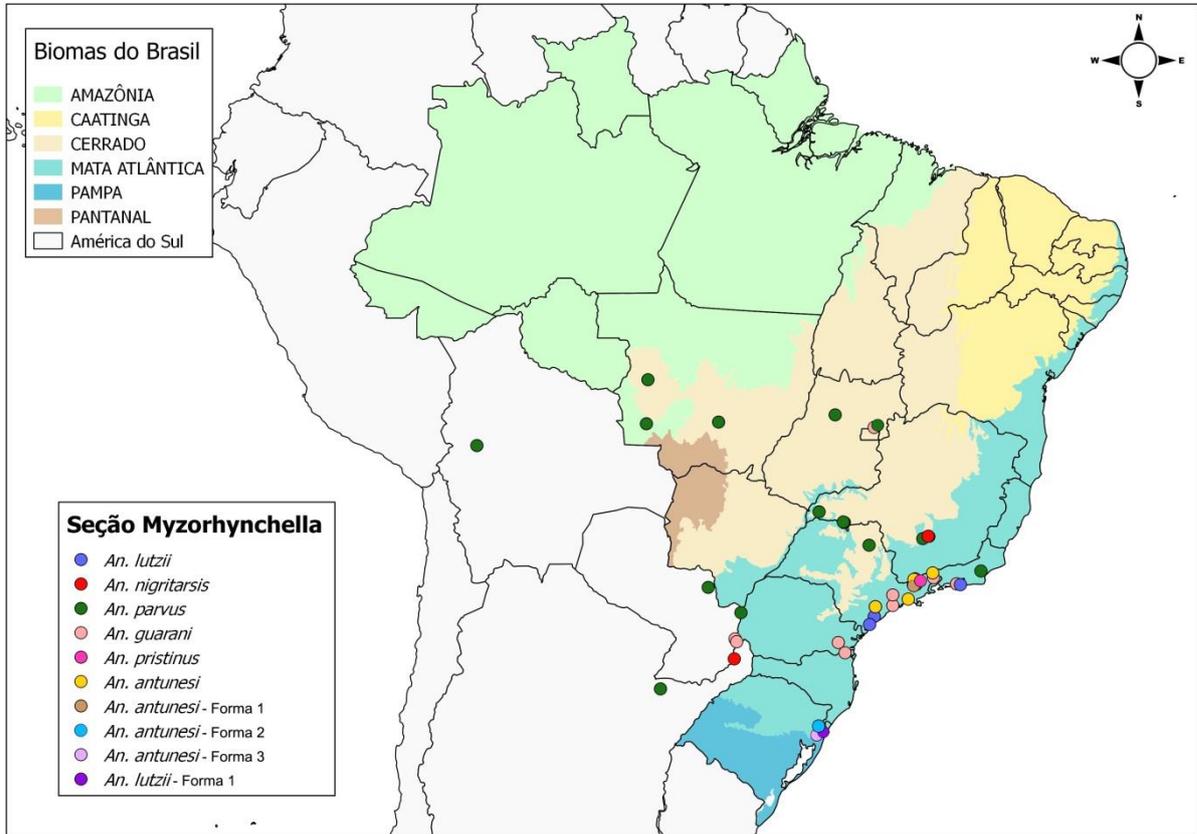


Figura 52. Mapa da distribuição geográfica das espécies da Seção Myzorhynchella. O mapa foi construído a partir de material observado.

## 4.1.3. Chave de Identificação de Adultos.

- 1- Tarsômero posterior *Ta-4* com marcação escura basal ..... *nigritarsis*  
 Tarsômero posterior *Ta-4* inteiramente claro ..... 2
- 2- Tarsômero anterior *Ta-1-3* com conjunto conspícuo de escamas claras no ápice da superfície dorsal ..... 3  
 Tarsômero anterior *Ta-1-3* com pequena faixa de escamas claras no ápice da superfície dorsal ..... 4
- 3- Asa com veia  $R_{4+5}$  com três manchas escuras, uma sub-basal, outra mediana e a terceira, subapical; tarsômero mediano *Ta-1-3* com anel apical de escamas claras ..... *guarani*  
 Asa com veia  $R_{4+5}$  variável; tarsômero mediano *Ta-1-2* com poucas escamas claras no ápice ..... *lutzii*
- 4- Asa com veia  $CuA_2$  com duas manchas escuras, uma mediana e a outra sub-apical ..... *pristinus*  
 Asa com veia  $CuA_2$  com uma mancha escura sub-apical..... 5
- 5- Asa com veia  $CuA_1$  com duas manchas escuras; veia  $R_{4+5}$  com três manchas escuras, uma sub-basal, outra mediana e a terceira, sub-apical bem delimitadas ..... *parvus*  
 Asa com veia  $CuA_1$  com três manchas escuras; veia  $R_{4+5}$  variável ..... 6
- 6- Tarsômero posterior *Ta-2* com aproximadamente 1/3 basal de escamas escuras; veia  $R_{4+5}$  com predomínio de escamas escuras ..... *antunesi* – Forma 1  
 Tarsômero posterior *Ta-2* com aproximadamente 1/5 basal de escamas escuras; veia  $R_{4+5}$  variável ..... 7
- 7- Asa com  $R_{4+5}$  com duas manchas escuras, uma sub-basal e a outra sub-apical, e algumas escamas claras dispersa sobre escamas escuras entre as manchas ..... *lutzii* – Forma 1  
 Asa com  $R_{4+5}$  com duas manchas escuras, uma sub-basal e a outra sub-apical, e predomínio de escamas claras ..... *antunesi*  
*antunesi* – Forma 2  
*antunesi* – Forma 3

## 4.1.4. Chave de Identificação de Larva de quarto estágio.

1. Cerda 6-IV–VI simples ou bífida ..... 2  
 Cerda 6-IV–VI com 3 ou mais ramos ..... 5
  
2. Cerda 14-P moderadamente curta, cerca do dobro do tamanho do tubérculo onde estão inseridas as cerdas 9–12-P, geralmente com 3 ramos; cerda 8-C com 1 a 3 ramos ..... 3  
 Cerda 14-P longa, mais de 5 vezes o tamanho do tubérculo onde estão inseridas as cerdas 9–12-P geralmente com 3 ramos; cerda 8-C com 3 ou mais ramos ..... 4
  
3. Cerda 6-IV–VI geralmente simples; cerda 1-II–VII palmada, bem desenvolvida; cerda 4-C longa próxima a base da cerda 2-C ..... *lutzii* – Forma 1  
 Cerda 6-IV–VI geralmente bífida; cerda 1-II–VII palmada com ápice dos filamentos hialinos; cerda 4-C curta ..... *lutzii*
  
4. Cerda 6-IV–VI simples ..... *antunesi* – Forma 1  
 Cerda 6-IV–VI bífida ..... *antunesi*  
*antunesi* – Forma 2
*antunesi* – Forma 3
  
5. Cerda 8-C geralmente simples; cerda 14-P geralmente com 4 ramos; cerda 1-II–VII palmada, bem quitinizada ..... *parvus*  
 Cerda 8-C ramificada; cerda 14-P geralmente com mais de 4 ramos; cerda 1-III–VII com pedúnculo estreito e alongado e filamentos hialinos de difícil visualização ..... 6
  
6. Traquéias e abertura espiracular estreitas; cerda 4-C curta e ramificada ..... *guarani*  
 Traquéias e abertura espiracular largas; cerda 4-C longa ..... *pristinus*



## 4.2. FILOGENIA

Das espécies que atualmente pertencem a Seção Myzorhynchella (*An. lutzii*, *An. nigratarsis*, *An. parvus*, *An. guarani*, *An. antunesi* e *An. pristinus*), apenas *An. nigratarsis* não foi incluída no estudo devido a falta de amostras.

### 4.2.1. ITS2

Não foi possível alinhar as sequências de ITS2 devido a heterogeneidade e a diferença entre o comprimento das sequências de cada espécie que variam de 585 a 617pb (Tabela VI). Análises moleculares não foram realizadas utilizando o marcador, no entanto a maioria das espécies apresentaram sequências únicas que distinguem as espécies. *Anopheles parvus*, *An. antunesi* – Forma 2 e *An. guarani* foram as espécies que apresentaram variação intraespecífica. *Anopheles guarani* apresentou duas sequências, as quais foram diferenciadas entre si por apenas 3 gaps. As outras duas apresentaram variação intraespecífica devido as múltiplas cópias e por esse motivo foram clonadas. A figura 53 apresenta dois espécimes de cada espécie e suas variações quanto as bases.

Devido as sequências únicas para as espécies utilizando ITS2, este foi utilizado como marcador diagnóstico das espécies para as análises seguintes.

Tabela VI. Sequências de ITS2 sem a região dos primers (5.8S e 28S).

Espécie	Comprimento da sequência (pb)
<i>An. lutzii</i>	617
<i>An. parvus</i>	595/600
<i>An. guarani</i>	585/588
<i>An. antunesi</i>	609
<i>An. pristinus</i>	607
<i>An. pristinus</i> – Forma 1	609
<i>An. lutzii</i> – Forma 1	615
<i>An. antunesi</i> – Forma 1	609
<i>An. antunesi</i> – Forma 2	596/598
<i>An. antunesi</i> – Forma 3	614
<i>An. antunesi</i> – Forma 4	598

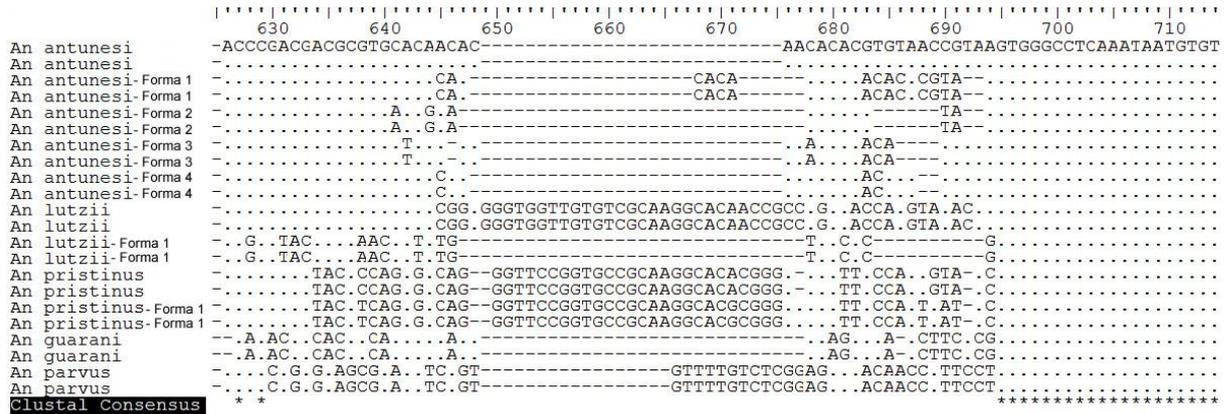


Figura 53. Fragmento final de alinhamento de seqüências de ITS2 mostrando diferenças entre as espécies. “.” representam similaridade e “-“ indicam gaps.

#### 4.2.2. *COI*

Foram analisados 123 espécimes e como grupo externo *An. aquasalis* (nº de acesso do Genbank KC354822). As seqüências foram facilmente alinhadas e nenhuma inserção ou deleção foi encontrada. O resultado da análise bayesiana apresentado na Figura 54 mostrou que seis grupos de espécies foram fortemente suportados: *An. parvus*, *An. pristinus*, *An. guarani*, *An. lutzii*, *An. lutzii* – Forma 1 e *An. antunesi* – todas as Formas. A probabilidade posterior para as divisões de cada grupo foi alta.

O clado formado por *An. parvus* foi colocado como grupo irmão de um clado formado por todos os outros grupos. *Anopheles parvus* apresentou três subgrupos com valores de probabilidade posterior 1.00, 0.71 e 1.00. O grupo *An. pristinus* também apresentou dois subgrupos distintos com alto valor de probabilidade posterior, *An. pristinus* (1.00) e *An. pristinus* – Forma 1 (1.00).

Desse modo, os resultados a partir de seqüências de *COI* suportaram a existência de duas linhagens de *An. parvus*, *An. pristinus* e *An. lutzii* – Forma 1, além de um grupo formado por *An. antunesi*, *An. antunesi* – Forma 1, *An. antunesi* Forma - 2, *An. antunesi* - Forma 3 e *An. antunesi* – Forma 4. Dados estes, corroborados pelas seqüências de ITS2 (Fig. 53), com exceção de *An. lutzii* – Forma 1 que apresenta seqüência única de ITS2.

As distâncias genéticas utilizando o algoritmo K-2P entre os 11 grupos variaram de 1,6% a 15,6% (Tabela VII). As maiores distâncias entre os grupos foram apresentadas por *An. parvus*, com todos os valores acima de 13%. Os menores valores foram entre *An. antunesi* e *An. antunesi* – Forma 2 (1,6%) seguido por *An. antunesi* e *An. antunesi* – Forma 3 (2,3%).

Todos os outros grupos apresentaram distância interespecífica que excede 3%. Além disso, as maiores distâncias intraespecíficas também ocorreram entre *An. parvus* (1,5%), seguido por *An. pristinus* – Forma 1 (1,4%) (Tabela VIII).

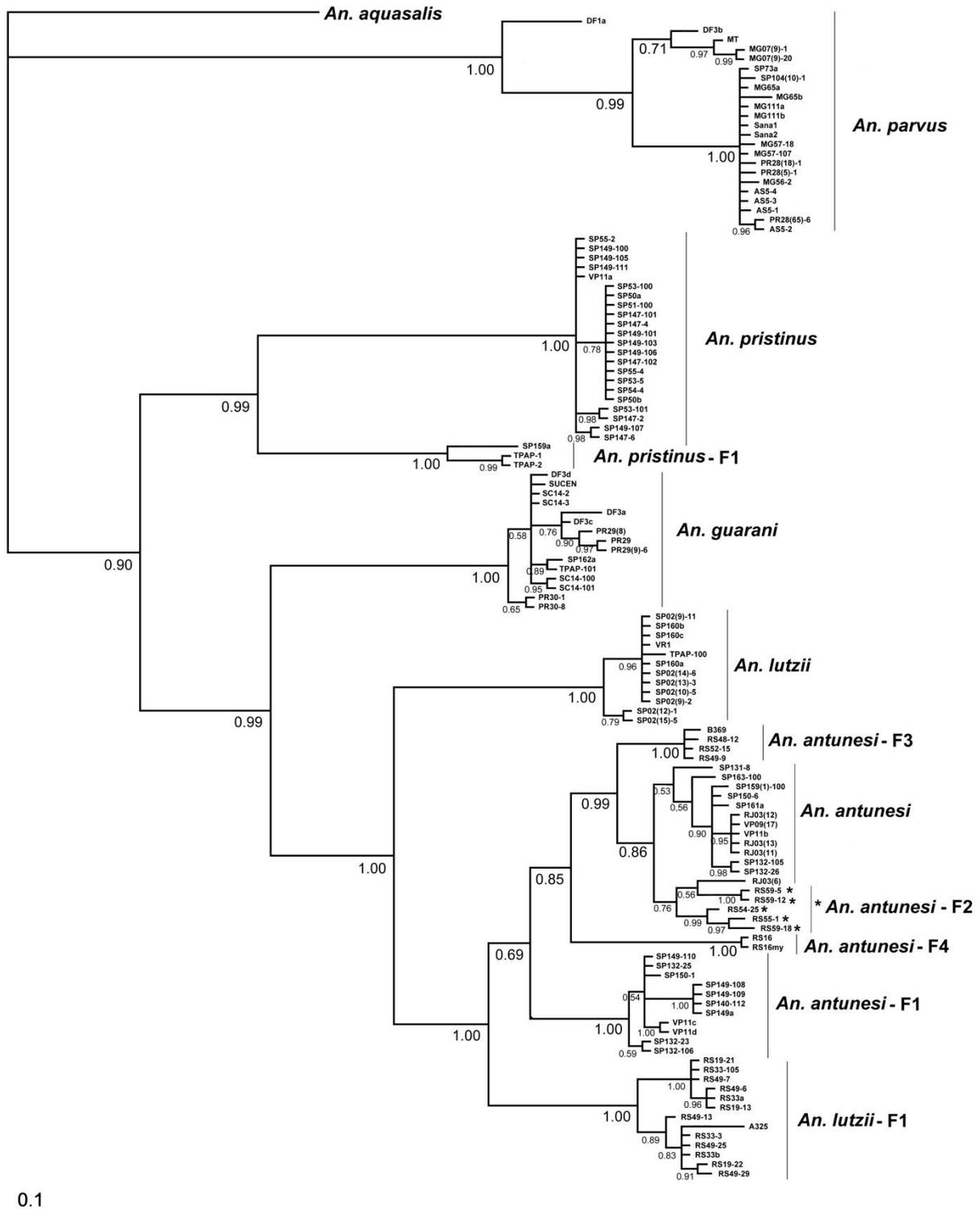


Figura 54. Topologia de análise filogenética baseada em probabilidade Bayesiana utilizando sequências de *COI* de 123 indivíduos da Seção Myzorhynchella. Os números sob os ramos são valores de probabilidade posterior.

Tabela VII. Estimativa média de divergência evolutiva sobre as sequências de *COI* entre os grupos. Valores apresentados em porcentagem (%).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>An. lutzii</i> – F1	-									
2 <i>An. antunesi</i> - F3	5,8	-								
3 <i>An. guarani</i>	9,1	8,8	-							
4 <i>An. antunesi</i>	5,4	2,3	9,0	-						
5 <i>An. pristinus</i>	10,7	10,9	11,8	12,4	-					
6 <i>An. antunesi</i> - F4	6,2	4,9	9,7	4,5	11,4	-				
7 <i>An. antunesi</i> - F2	5,8	2,5	9,2	1,6	12,4	4,6	-			
8 <i>An. antunesi</i> - F1	5,2	4,1	8,7	3,4	12,0	5,5	3,9	-		
9 <i>An. pristinus</i> - F1	10,8	9,8	9,7	10,8	8,9	10,8	11,1	10,8	-	
10 <i>An. parvus</i>	14,0	15,3	13,8	15,6	15,1	15,3	15,1	14,7	14,3	-
11 <i>An. lutzii</i>	7,9	6,8	9,0	6,8	12,3	9,0	7,3	7,3	10,9	14,3

Tabela VIII. Estimativa média de divergência evolutiva sobre as sequências de *COI* dentro dos grupos.

Espécie	Distância (%)	Nº de Espécimes
<i>An. lutzii</i> – F1	1,0	13
<i>An. antunesi</i> - F3	0,2	4
<i>An. guarani</i>	0,7	15
<i>An. antunesi</i>	0,7	13
<i>An. pristinus</i>	0,3	22
<i>An. antunesi</i> - F4	0	2
<i>An. antunesi</i> - F2	1,0	5
<i>An. antunesi</i> - F1	0,6	11
<i>An. pristinus</i> - F1	1,4	3
<i>An. parvus</i>	1,5	23
<i>An. lutzii</i>	0,3	12

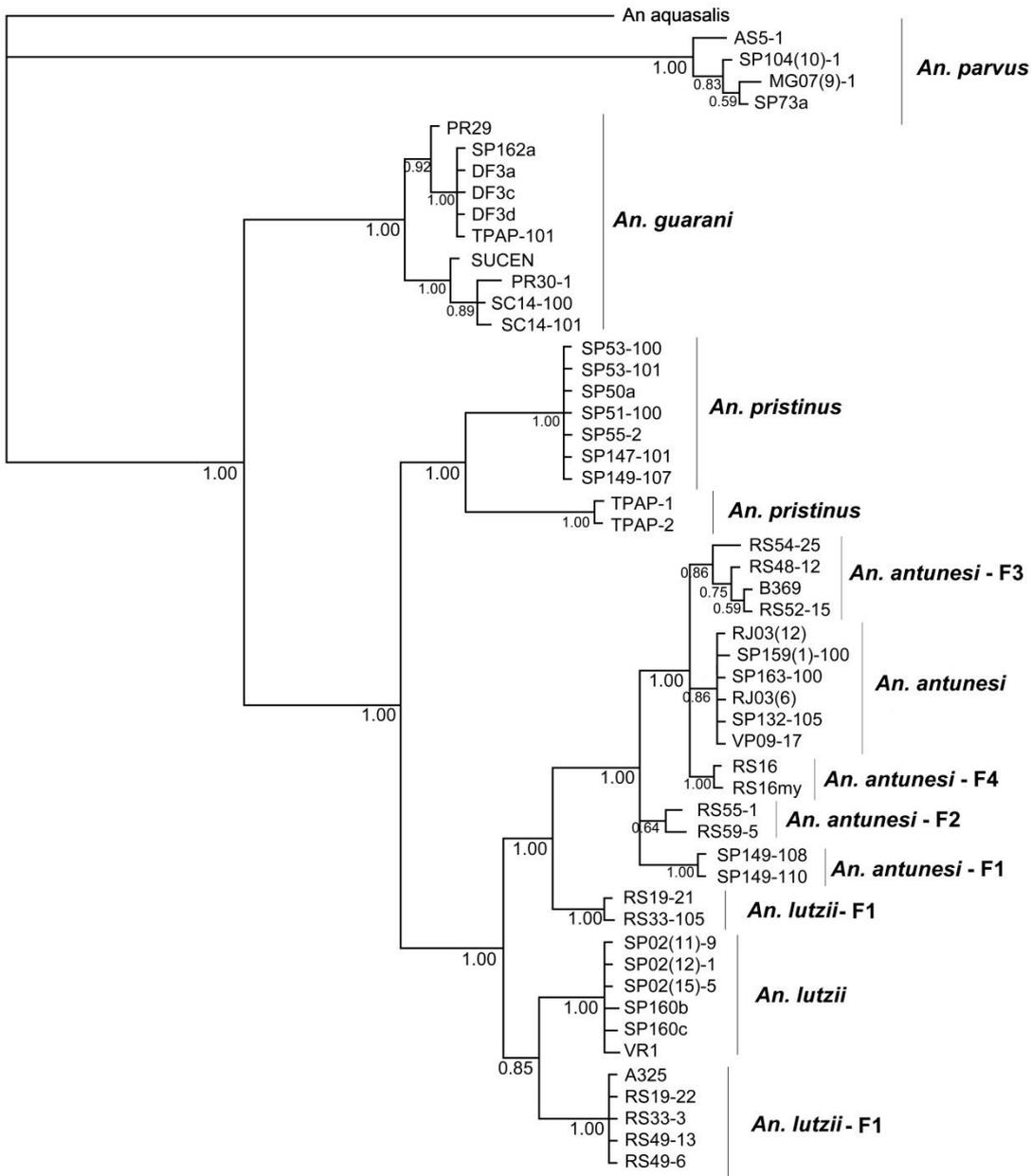
#### 4.2.3. *Catalase*

O resultado da análise bayesiana com sequências de *Catalase* apresentou clados bem suportados (Fig. 55.), com alto valor de probabilidade posterior: *An. parvus*, *An. guarani*, *An. pristinus* e um clado maior que agrupa *An. lutzii*, *An. lutzii* – Forma 1, *An. antunesi* e as outras formas de *An. antunesi*.

O grupo *An. pristinus* apresentou dois subgrupos distintos com alto valor de probabilidade posterior, *An. pristinus* (1.00) e *An. pristinus* – Forma 1 (1.00). Assim como *An.*

*parvus*, *An. guarani* e *An. lutzii* – Forma 1. Espécimes deste último não se agruparam no mesmo clado.

O clado formado por *An. parvus* foi colocado como grupo irmão de todos os outros clados. *Anopheles guarani* foi apresentado como grupo irmão de *An. pristinus* + (*An. lutzii* + *An. antunesi*).



0.1

Figura 55. Topologia de análise filogenética baseada em probabilidade Bayesiana utilizando seqüências de *Catalase* de 52 indivíduos da Seção Myzorhynchella. Os números sob os ramos são valores de probabilidade posterior.

#### 4.2.4. *COI* + *Catalase*

O resultado da análise bayesiana com os dois marcadores combinados (*COI*+*Catalase*) (Fig. 56) também revelou os mesmos agrupamentos principais já mencionados: *An. parvus*, *An. guarani*, *An. pristinus*, *An. lutzii*, *An. lutzii* – Forma1 e as diferentes formas de *An. antunesi*.

Assim como nas topologias com sequências de *COI* e *Catalase*, *An. pristinus* apresenta duas linhagens bem suportadas com valor 1.00 de probabilidade posterior, assim como *An. parvus* e *An. lutzii* – Forma 1. Vale ressaltar que em todas as topologias, *An. parvus* se encontra mais distante e como grupo irmão de todos os outros clados.

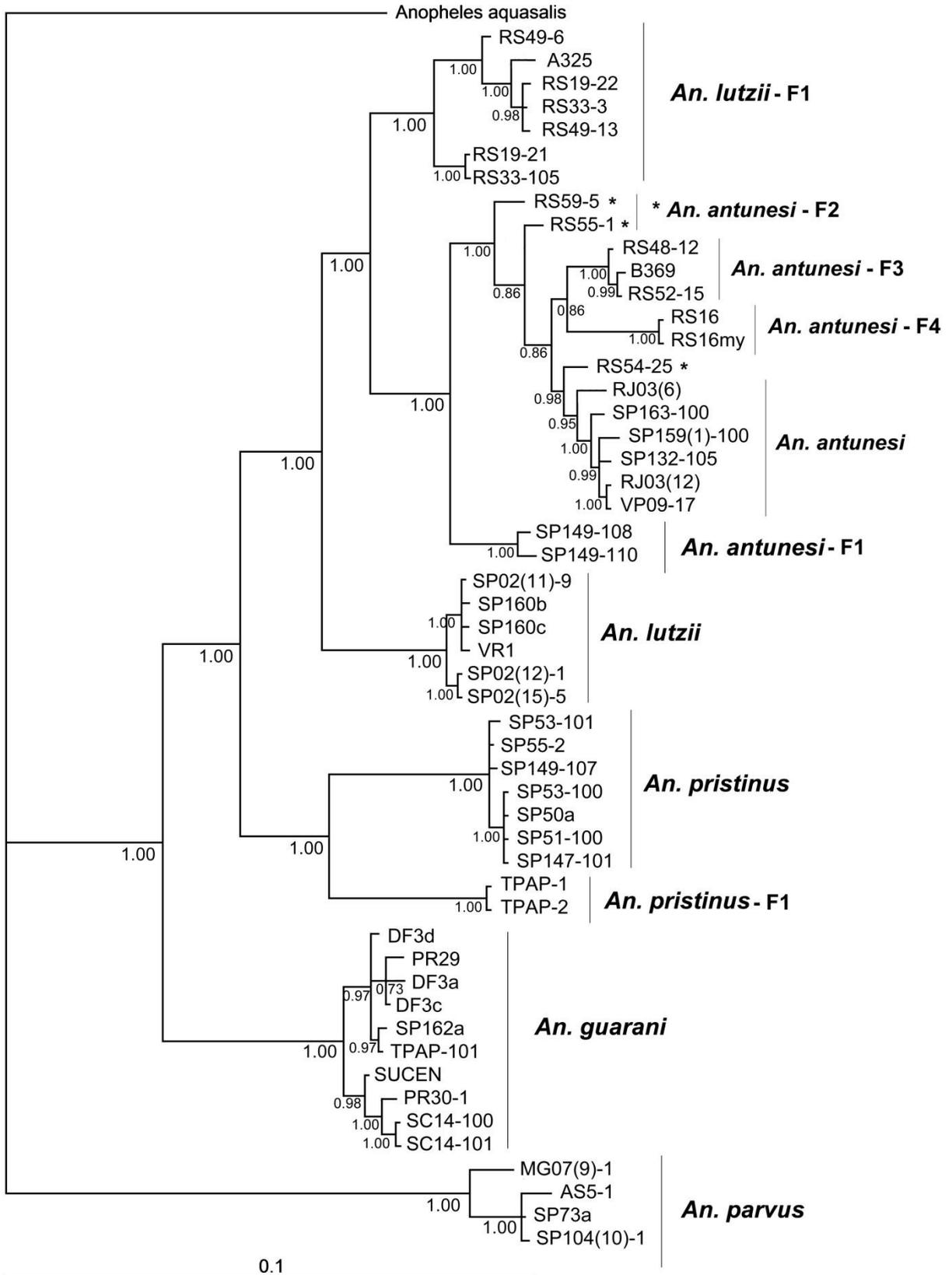


Figura 56. Topologia Bayesiana utilizando sequências de *COI+Catalase* de 52 indivíduos da Seção Myzorhynchella. Os números sob os ramos são valores de probabilidade posterior.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados dos estudos morfológicos e moleculares envolvendo as diversas fases de desenvolvimento de vida das espécies que formam a Seção Myzorhynchella de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) demonstraram a presença de múltiplas espécies desconhecidas da ciência. Dessa maneira, os resultados obtidos permitiram levantar a hipótese da presença de pelo menos 12 espécies na Seção Myzorhynchella. Esse valor representa aumento de 300% em relação ao que foi proposto por PEYTON et al. (1992). O descobrimento de espécies até então desconhecidas e a revalidação de outras permitiram redesenhar, mas não esgotar, a distribuição geográfica potencial das espécies da Seção. A melhor compreensão da distribuição das espécies de Myzorhynchella tornará possível a realização de estudos biogeográficos e, portanto, o descobrimento dos padrões evolutivos que foram determinantes para o grupo.

Em relação aos dados moleculares para espécies da Seção Myzorhynchella, vale assinalar que até o momento não existem muitos estudos sobre o grupo. Os resultados do estudo desenvolvido por BOURKE et al. (2010), demonstraram através das análises bayesiana de dados concatenados dos genes *ND6* e *white* que a Seção representa grupo monofilético dentro do subgênero *Nyssorhynchus*. Resultado semelhante foi obtido por FOSTER et al. (2013) empregando sequências de DNA dos genes *white*, *CAD* e *COI* combinados. Em ambos os estudos, os genes separadamente não corroboram o monofiletismo da Seção Myzorhynchella, mas a informação concatenada permitiu o entendimento da Seção como grupo natural.

Em estudos de filogenia de Anophelinae a partir de caracteres morfológicos, SALLUM et al. (2000) e HARBACH & KITCHING (2005) utilizaram duas espécies pertencentes a Seção Myzorhynchella (*An. lutzii* e *An. parvus*), e ambos trabalhos não a consideraram como grupo natural. Resultado este, talvez por não incluir outras espécies da Seção, já que *An. parvus* se mostrou extremamente diferente das outras espécies, tanto a partir de características da morfologia quanto dados moleculares.

Os resultados das análises desenvolvidas como parte do presente estudo, demonstraram que os espécimes de *An. parvus* formam grupo distinto que foi resgatado como irmão de um clado formado por todas as outras espécies da Seção Myzorhynchella. Os espécimes de *An. parvus* analisados formaram dois grupos distintos nas análises dos dados

concatenados dos genes *COI* + *Catalase* e três linhagens nas análises empregando sequências do gene *COI*. Dado este corroborado por BOURKE et al. (2011) e FOSTER et al. (2013), onde o último trabalho não apenas considera *An. parvus* como um grupo formado por mais de um táxon, mas também como pertencente a um subgênero distinto devido a elevada diferença genética em relação aos demais táxons de *Nyssorhynchus*. No presente estudo, a distância genética entre cada um dos grupos comparado a *An. parvus*, apresentou valores acima de 13%, sendo que o valor limite de divergência genética que tem sido utilizado para separar espécies é de 3% (HERBERT et al., 2003; RUIZ-LOPEZ et al., 2012).

Essas informações são suportadas por evidências morfológicas. Nesse sentido, diferenças são facilmente observadas em todas as fases de vida de *An. parvus*: através do padrão de manchas formadas por escamas claras e escuras nas asas dos adultos; características da genitália masculina como a presença de edeago com a extremidade apical em forma de gancho (GALVÃO, 1941) e claspete ventral apresentando espículas na porção basal da superfície ventral. Acresce considerar a presença de diferenças na larva, na pupa, e no ovo. Este último possui estrutura em forma de coroa em torno da micrópila e a presença de um tubérculo proeminente junto da mesma extremidade anterior (FORATTINI et al., 1998). Estas características representam autapomorfias que permitem a separação de *An. parvus* tanto das demais espécies da Seção Myzorhynchella como daquelas do subgênero *Nyssorhynchus*.

Além disso, BOURKE et al. (2011) sugerem que os espécimes identificados como *lutzii*A325 e *lutzii*B369 podem representar espécies distintas. Exemplares coletados na mesma região confirmam tal resultado e com o maior número de espécimes analisados, sugere-se ainda mais uma nova espécie não descrita, totalizando três espécies no trabalho de FOSTER et al. (2013). Esses dados mostram o quanto é importante o número amostral para estabelecer relações entre os grupos e obter resultados consistentes. Fato corroborado no presente estudo, onde novas coletas foram realizadas nas mesmas localidades a fim de conseguir mais espécimes e confirmar os resultados obtidos nos trabalhos anteriores. De acordo com os dados moleculares, podemos sugerir não mais três, porém quatro espécies na região. Sendo que três estão descritas no presente estudo, com exceção de uma devido à falta de exemplares.

Ressaltando ainda a importância do número amostral, o clado formado por *An. antunesi* - Forma 1, possui duas sequências retiradas do Genbank (VP11c (GU989349) e VP11d (GU989350)) que haviam sido depositadas como *Anopheles antunesi* no trabalho de NAGAKI et al. (2010). No entanto, tais resultados mostraram que com um maior número de espécimes analisados, ambas as sequências correspondem a uma espécie distinta, porém

próxima a *An. antunesi*. Observando-se a matriz de distância interespecífica com sequências de *COI*, nota-se que o valor da distância genética entre *An. antunesi* - Forma 1 e *An. antunesi* é de 3,4%. Esse valor é superior ao encontrado em outros grupos de espécies morfológicamente semelhantes do subgênero *Nyssorhynchus* de *Anopheles*. Como exemplo, vale assinalar que o valor de distância K2P empregado para delimitar algumas espécies do complexo *An. albitarsis* foi de 2%, como é o caso de *An. albitarsis* H (RUIZ-LOPEZ et al., 2012).

Nas três topologias geradas nas análises filogenéticas empregando as sequências de DNA dos genes *COI*, *Catalase* e *COI+Catalase*, *An. antunesi* e suas quatro formas se mostraram muito próximas. Alguns clados não são, estatisticamente, bem suportados. Nas análises das matrizes de distâncias K2P, utilizando apenas as sequências de *COI*, foram gerados dois grupos que apresentaram valores de similaridade genética inferiores a 3%. Resultado semelhante foi observado entre espécies do Subgrupo Strodei que é formado por cinco espécies morfológicamente distintas, no entanto, as sequências do fragmento do gene *COI* não permitem separar *Anopheles albertoi* Unti de *Anopheles strodei* Root. Contrastando com esse resultado, as análises *multiloci*, empregando sequências de *COI* e ITS2, todas as espécies do grupo foram corroboradas (BOURKE et al., 2013).

Em relação ao grupo *An. lutzii* – Forma 1, as três topologias apresentaram duas linhagens bem suportadas por valores de bootstrap. Nas topologias utilizando *COI* e *COI+Catalase*, os espécimes de *An. lutzii* – Forma 1 apareceram agrupados, porém na de *Catalase* eles apresentaram-se separados. Este resultado também poderia indicar a presença de dois táxons em um novo complexo de espécies, todavia, as sequências de ITS2 para o grupo se apresentaram únicas. Vale assinalar que os espécimes são simpátricos e morfológicamente semelhantes. A utilização de outros marcadores moleculares poderá auxiliar na definição do táxon ou táxons.

Sequências de ITS2 de espécies distintas são difíceis de alinhar devido à elevada variabilidade intra e interespecífica derivadas de diferenças no comprimento das sequências. Como exemplo existe o estudo de BOURKE et al. (2011), com espécies da Seção *Myzorhynchella*, no qual os autores não conseguiram alinhar as sequências completas de ITS2. Dessa maneira, as regiões ambíguas foram excluídas das análises. Ademais, as topologias apresentadas não foram enraizadas, pelo fato de os autores não conseguirem gerar alinhamento com sequências de um potencial grupo externo. Resultados semelhantes foram apresentados por HACKETT et al. (2000) que mesmo entre espécies muito próximas, *An.*

*funestus* Giles e *An. rivulorum* Leeson pertencentes ao Grupo *Funestus*, não puderam determinar as homologias das bases de todas as sequências, o que impossibilitou o emprego das mesmas em análises filogenéticas.

Mesmo com as dificuldades para obter alinhamentos de ITS2, o fato de as sequências apresentarem-se únicas para cada espécie demonstra que essa região do gene ribossômico pode ser adequada como marcador diagnóstico para as espécies da Seção *Myzorhynchella*, mas não para análise filogenética.

A presença de sequências únicas de ITS2 demonstrou a presença de quatro táxons diferentes próximos a *An. antunesi*. Esse fato indica a possibilidade da existência de mais um complexo de espécies dentro da Seção *Myzorhynchella*. A bionomia das espécies desse grupo são semelhantes, todas de altitudes elevadas, além da morfologia externa que também se mostram muito similares por caracteres do adulto, larva de quarto estágio, pupa e genitália masculina.

Espécies da Seção *Myzorhynchella* são geralmente maiores em relação às outras espécies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). As espécies coletadas em altitudes mais elevadas, acima de 800 metros, que são *An. pristinus*, *An. antunesi*, *An. antunesi* Forma 1 e *An. antunesi* Forma 2 são maiores que as demais espécies da Seção. Esse dado pode ser suportado pela regra de Bergmann, que diz que os animais tendem a serem maiores em latitude ou altitude onde a temperatura é mais baixa (ATKINSON, 1994). No entanto, MOUSSEAU (1997) sugere o inverso, que diz que o tamanho dos insetos aumenta enquanto a elevação decresce. No estudo de DEMARI-SILVA et al. (2014), no qual populações de *Culex coronator* Dyar & Knab foram analisadas, a regra de Bergmann é corroborada, assim como em populações do flebotomíneo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva) (MARCONDES et al., 1999).

*Anopheles pristinus*, *An. antunesi*, *An. antunesi* Forma 1 e *An. antunesi* Forma 2 podem apresentar suas distribuições restritas a regiões com altitude mais elevada. Vale ressaltar que neste estudo estas espécies foram de difícil manutenção em condições de laboratório, as formas imaturas não evoluíram para fase adulta, muito provavelmente devido às diferenças de altitude e de temperatura. No entanto, *An. lutzii*, *An. guarani* e *An. parvus* foram mais fáceis de serem mantidas em laboratório, além de apresentarem distribuição geográfica mais ampla. Este parece ser o caso de *An. parvus* que é um mosquito pequeno em comparação aos demais membros da Seção e se apresenta amplamente disperso no Brasil e outros países da América do Sul (Fig. 52). Ao contrário das demais espécies que foram

coletadas apenas em ambiente de Mata Atlântica, *An. parvus* se mostra uma espécie pertencente ao cerrado brasileiro. Esta foi a espécie com o maior número de exemplares de diferentes localidades. No entanto todos coletados a partir de adultos. Pouco se conhece sobre a biologia da espécie, sobretudo em relação ao habitat larval.

Aspectos relativos à biologia dos anofelinos são ainda pouco conhecidos. Isso se deve em parte à dificuldade que existe para encontrar os criadouros de algumas espécies na natureza. Nos casos em que a oviposição das fêmeas, em condições de laboratório, para a obtenção de progênes, não é possível, as coletas de formas imaturas em campo são de extrema importância. Isto fica mais evidente nos casos em que a identificação das espécies depende, fundamentalmente, de caracteres presentes nas larvas e nas pupas, pois os adultos são morfologicamente semelhantes ou mesmo idênticos.

A principal característica das larvas de 4º estágio empregada para definir a Seção *Myzorhynchella* era a presença da cerda 6 dos segmentos abdominais IV-VI, ramificadas. No entanto, com as análises realizadas, pode-se verificar que dois novos membros na Seção (*An. lutzii* – Forma 1 e *An. antunesi* – Forma 1) apresentam a cerda abdominal 6 simples. Esta característica tem sido amplamente empregada para identificar as Seções *Argyritarsis* e *Albimanus* do subgênero *Nyssorhynchus*. Portanto, os conhecimentos sobre os táxons *An. lutzii* Forma 1 e *An. antunesi* Forma 1 da Seção *Myzorhynchella* demonstraram que as Seções do subgênero *Nyssorhynchus* não podem ser corretamente identificadas por características das cerdas 6 dos segmentos abdominais das larvas.

Quanto à distribuição geográfica, os mapas foram construídos com dados obtidos de artigos publicados na literatura e por material observado para a presente investigação. Vale ressaltar que até recentemente *An. guarani* era considerada sinônimo de *An. lutzii* (NAGAKI et al., 2011), e atualmente apresenta distribuição geográfica que atinge os estados do Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal, assim como Província de Misiones na Argentina, este último registrado por ROSSI & LESTANI (2014).

Quase não há registros na literatura de *Anopheles nigratarsis* desde a sua descrição, e os únicos exemplares observados foram o sítipo e uma fêmea que está depositada na coleção entomológica do Museu Nacional de História Natural de Washington (USNM). A espécie se distingue das demais por apresentar no extremo basal dos tarsômeros 3 e 4 da perna posterior um anel de escamas escuras, enquanto em todas as outras espécies da seção os mesmos segmentos são recobertos por escamas brancas. É provável que essa característica seja

decorrente de polimorfismo de outra espécie da seção. Acredita-se que seja *An. guarani* devido a similaridade do padrão de manchas claras e escuras presente nas asas de fêmeas. No entanto, não existem exemplares para confirmação através de outros estágios de desenvolvimento ou para sequenciamento de DNA. Variação semelhante foi mencionada por HARBACH et al. (1993) em população de *An. darlingi* Root de Belize, que apresentou a mesma variação presente em *An. nigratarsis* além de outras variações a partir de progênie e larvas coletadas em campo.

Devido a difícil identificação dos espécimes adultos, principalmente quando não se apresentam em bom estado de preservação, e a falta de especialistas treinados na área, é provável que muitos desses dados de literatura estejam incorretos. Por esse motivo, a distinção na apresentação dos mapas por material observado e registro em literatura, uma vez que a maioria dos trabalhos que não de taxonomia, não apresentam material testemunho para comprovação dos resultados.

Projetos de pesquisa requerem investimentos significativos de tempo, esforço e financeiro. Por isso os espécimes devem ser depositados como material testemunho em uma coleção para assegurar que estejam disponíveis para estudos posteriores. Acresce considerar que o método científico é baseado no princípio de que resultados de estudos devem ser replicáveis. Portanto, os exemplares de mosquitos capturados em estudos de diversas naturezas deveriam ser preservados e depositados em coleções institucionais.

## 6. CONCLUSÕES

Com base na revisão taxonômica e análise filogenética molecular das espécies da Seção Myzorhynchella, pode-se concluir que:

- No estado do Rio Grande do Sul, Brasil, ocorrem pelo menos quatro espécies distintas desconhecidas da ciência. Destas, três novas espécies foram definidas e serão validadas (*An. lutzii* – Forma 1 n. sp., *An. antunesi* – Forma 2 n. sp. e *An. antunesi* – Forma 3 n. sp.). A quarta espécie deverá ser definida e delineada.

- Uma nova espécie que coexiste em simpatria com *An. antunesi* e *An. pristinus* (*An. antunesi* – Forma 1 n. sp) também foi descrita a partir de espécimes de Campos do Jordão, SP, Brasil.
- Os resultados suportam que *An. antunesi* é um complexo formado por pelo menos cinco espécies.
- De acordo com dados moleculares, os resultados sugerem que *An. parvus* e *An. pristinus* também são complexos de espécies.
- As sequências de ITS2 podem ser utilizadas como marcador diagnóstico para espécies da Seção Myzorhynchella.
- Diferenças morfológicas e os resultados das análises filogenéticas moleculares indicam que *Anopheles parvus* representa um grupo distinto que não pertence à Seção Myzorhynchella.
- *Anopheles nigratarsis* é provavelmente sinônimo de outra espécie da Seção Myzorhynchella.
- A Seção Myzorhynchella não pode ser diferenciada das demais Seções de *Nyssorhynchus* pelas características morfológicas da larva que são empregadas em chaves de identificação.
- Há a necessidade de estudos com maior número amostral e outros marcadores moleculares para estabelecer relações entre os grupos e obter resultados mais consistentes.
- Os resultados das análises dos dados moleculares corroboram as hipóteses levantadas por características morfológicas. Além disso, eles sugerem que existem pelo menos 12 espécies na Seção Myzorhynchella. Vale acrescentar, que o conhecimento das espécies da Seção foi ampliado significativamente com a adição de dados morfológicos, moleculares, de bionomia e de distribuição.
- Este estudo demonstra que pouco se conhece sobre a diversidade de espécies de *Anopheles* que ocorrem em ambientes onde a malária é de baixa endemicidade. A necessidade de mais estudos fica evidente pelo número de espécies novas encontradas e ainda pela escassez de investigações científicas com espécies da Seção.

## 7. REFERÊNCIAS

- Aiken J. Notes on the Mosquitoes of British Guiana. Br Gui Med Annual. 1909;1-25.
- Alencar J, Ferreira ZM, Lopes CM, Serra-Freire NM, Mello RP, Silva JS, Guimarães AE. Biodiversity and Times of Activity of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Biome of the Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. J Med Entomol 2011;48(2):223-231.
- Andrade WA, Santos AT, Parente JAS, Gil-Santan HR, Bragança MAL, Alencar J. Diversidade de anofelinos (Diptera: Culicidae) identificados em área de implantação de hidrelétrica nas margens do rio Tocantins, município de Nacional-TO. Rev Patol Trop. 2006;35(2):143-147.
- Antunes PCA, Lane J. Nota sobre a distribuição geográfica dos culicídeos (Diptera) de São Paulo (Brasil). Rev Biol Hyg. 1933;4(3):91-97.
- Aragão MB, Neto JAF, Martins CM. Observações sobre anofelinos em Santa Catarina, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1973;7(5):289-303.
- Aragão NC, Müller GA, Balbino VQ, Costa Junior CR, Figueirêdo Júnior CS, Alencar J, Marcondes CB. A list of mosquito species of the Brazilian State of Pernambuco, including the first report of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae), yellow fever vector and 14 other species (Diptera: Culicidae). Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(4):458-459.
- Araujo R, Silva AM, Souza Filho EC, Luz E. Composição da fauna de *Anopheles* (Diptera, Culicidae) da Reserva Indígena do Ocoy, foco ativo de malária no município de São Miguel do Iguaçú, Paraná (Brasil). Acta Biol Par. 2014;43(1-2):85-112.
- Atkinson D. Temperature and organism size - A biological law for ectotherms? Adv Ecol Res. 1994;25:1-58.

- Barghini A, Urbinatti PR, Natal D. Atração de mosquitos (Diptera: Culicidae) por lâmpadas incandescentes e fluorescentes. *Entomol Vect.* 2004;11(4):611-622.
- Basseres M. Atividades da estação biológica de Perú. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1943;38(1):39-52.
- Bejarano JFR, Duret JP. Nota previa sobre mosquitos argentinos. *Rev Sanid Milit Argent.* 1949:452-454.
- Belkin JN. The mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). University of California Press, Berkeley. 1962.
- Belkin JN, Schick RX, Heinemann SJ. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXV. Mosquitoes originally described from Brazil. *Contrib Amer Ent Inst.* 1971;7:1-64.
- Bourke BP, Foster PG, Bergo ES, Calado DC, Sallum MAM. Phylogenetic relationships among species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera, Culicidae) based on nuclear and mitochondrial gene sequences. *Acta Trop.* 2010;114:88-96.
- Bourke BP, Nagaki SS, Bergo EE, Cardoso JC, Sallum MAM. Molecular phylogeny of the Myzorhynchella Section of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae): genetic support for recently described and resurrected species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(6):705-715.
- Bourke BP, Oliveira TP, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MA. A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors.* 2013;6:111.
- Bourroul C. Mosquitos do Brasil. Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina da Bahia. Bahia; 1904.

- Calderón G, Fernández R, Valle J. Species de la fauna anofelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Perú. *Rev peru epidemiol.* 1995;8(1):5-23.
- Cardoso JC, Corseuil, Barata JMS. Anophelinae (Diptera: Culicidae) ocorrentes no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Entomol Vect.* 2004;11(1):159-177.
- Cardoso JC, Paula MB, Fernandes A, Santos E, Almeida MAB, Fonseca DF, Sallum MAM. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic forest area on the north coast of Rio Grande do Sul State, Brazil. *J Vector Ecol.* 2011;36(1):175-186.
- Carvalho MESD, Lustosa ES, Naves HAM, Carneiro E. Anofelinos coletados na chácara Naves. Anofelinos coletados na chácara Naves 1987-1988. *Rev Pat Trop.* 1992;21(2):203-208.
- Cerutti Jr C, Boulos M, Coutinho AF, Hatab MCLD, Falqueto A, et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J.* 2007;6:33.
- Chagas C. O novo gênero *Myzorhynchella* de Theobald: Duas novas anophelinas brasileiras pertencentes a este gênero – *Myzorhynchella parva* (nov. sp.). *Brazil Med.* 1907;21:291-293.
- Chagas C. O novo gênero *Myzorhynchella* de Theobald: Duas novas anophelinas brasileiras pertencentes a este gênero – *Myzorhynchella nigratarsis* (nov. sp.). *Brazil Med.* 1907;21(31):303-305.
- Christophers SR. Provisional list and reference catalogue of the Anophelini. *Indian J Med Res.* 1924;3:1-105.
- Consolim J, Pellegrini NJM, Luz E. Culicídeos (Diptera, Culicidae) do Lago de Itaipú, Paraná, Brasil. I. Município de Foz do Iguaçu. *Acta Biol Par.* 1993; 22(1, 2, 3, 4):83-90.

- Costa Lima A. Sobre algumas anophelinas encontrados no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1928;3:91-113.
- Costa Lima A. Sobre alguns anophelineos encontrados no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1929;12:275-293.
- Coutinho JO, Rachou R, Ferreira M. Considerações em torno de uma inspeção preliminar de malária em zona de alta endemicidade no Estado de Santa Catarina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1944;41(1):1-19.
- Cruz OG. Contribuição para o estudo dos culicídeos do Rio de Janeiro. Brazil Med. 1901;15:423-426.
- Dayrat B. Towards integrative taxonomy. Biol J Linn Soc. 2005;85:407-415.
- Deane, M. P. Causey, O. R. Deane, L. M. Chave ilustrada para a identificação de 32 espécies de anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil pelos caracteres da larva, com a descrição de duas larvas. Rev Serv Esp Saúde Públ. 1947;1(2):335-384.
- Deane, L. M. Causey, O. R. Deane, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. Rev Serv Esp Saúde Públ. 1948;1(4):827-965.
- Deane LM. Monkey malaria in Brazil. A summary of studies performed in 1964-1966. WHO. 1967:21pp
- Deane LM, Neto JA. Malária em macacos do estado de Rio Grande do Sul. Observações preliminares. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1969;11:299-305.
- Deane LM, Deane MP, Neto JA, Almeida FB. On the transmission of simian malaria in Brazil. Rev Inst Med Trop. 1971;13(5):311-319.
- Demari-Silva B, Suesdek L, Sallum MAM, Marelli MT. Wing geometry of *Culex coronator* (Diptera: Culicidae) from South and Southeast Brazil. Parasit Vectors. 2014;7:174.

- Dibo MR, Menezes RMT, Ghirardelli CP, Mendonça AL, Neto FC. Presença de culicídeos em município de porte médio do Estado de São Paulo e risco de ocorrência de febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(4):496-503.
- Djadid ND, Gholizadeh S, Tafsiri E, Romi R, Gordeev M, Zakeri S. Molecular identification of palearctic members of *Anopheles maculipennis* in Northern Iran. *Malar J.* 2007;17:6.
- Duarte AMRC, Pereira DM, Paula MB, Fernandes A, Urbinatti PR, et al. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic forest in Brazil. *Parasit Vectors.* 2013;6:58.
- Duret JP. Algunos culicidos nuevos para la Republica Argentina. *Rev San Mil Arg.* 1948;48:449-454.
- Dyar, HG. The mosquitoes of the Americas. Published by Carnegie Institution of Washington. 1928;387:444pp.
- Edwards FW. Diptera Fam. Culicidae. In: P. Wytsman (ed.). *Genera Insectorum. Fascicule 194.* Tervueren, Desmet-Verteneuil. 1932:258 p.
- Elliott R. The biting cycles of some anopheline mosquitos of Colombia. WHO. 1967.
- Falavigna-Guilherme AL, Silva AM, Guilherme EV, Morais DL. Retrospective study of malaria prevalence and *Anopheles* genus in the area of influence of the binational Itaipu reservoir. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2005;47(2):81-86.
- Faran ME. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* 1980;15(7):1-215.
- Favretto MA, Santos EB, Geuster CJ. Entomofauna do Oeste do estado de Santa Catarina, sul do Brasil. *ebras.* 2013;6(1):42-63.

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994;3:294-299.
- Forattini OP. *Entomologia Médica*, volume I. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Departamento de Parasitologia. 1962.
- Forattini OP, Lopes OS, Rabello EX. Investigações sobre o comportamento de formas adultas de mosquitos silvestres no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde públ S Paulo*. 1968;2(2):111-173.
- Forattini OP, Marucci D. The scanning electron microscopy of *Anopheles (Kerteszia)* eggs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993;88:349-52.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitões (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 7- Behaviour of adults *Nyssorhynchus* anophelines with special reference to *Anopheles albitarsis* s. l. in South-Eastern Brazil. *Rev Saúde Pública*. 1995;29(1):20-26.
- Forattini OP, Sallum MAM, Marques GRAM, Flores DC. Description of the eggs of *Anopheles (Kerteszia) laneanus* and *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* (Diptera: Culicidae) by scanning electron microscopy. *J Am Mosq Control Assoc*. 1997;13:368-374.
- Forattini OP, Sallum MAM, Bergo ES, Flores DC. Ultrastructure of eggs of *Anopheles rondoni*, *Anopheles lutzii*, and *Anopheles parvus*, Three species of the subgenus *Nyssorhynchus*. *J Am Mosquito Contr*. 1998;14(3):256-265.
- Forattini OP. *Culicidologia Médica*, volume II: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Edusp. 2002.
- Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TMP, Nagaki SS, Sant'Ana DC, Sallum MAM. Phylogenetic Analysis and DNA-based Species Confirmation in *Anopheles (Nyssorhynchus)*. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e54063.

- Franca-Rodriguez ME, Varela JC. *Anopheles (Myzorrhynchella) antunesi*, especie nueva para el Uruguay. An Fac Med Montevideo. 1962;47:246-249.
- Galbadon A, Cova-Garcia P. Zoogeografia de los anofelinos en Venezuela: II. Los vectores secundários y los no vectores. Tijeretazos Malar. 1946;10(2):78-127.
- Galvão ALA, Amaral ADF. Estudos sobre os anofelinos do grupo Myzorrhynchella com a descrição de uma espécie nova, *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* n. sp. (Dipt. Culicidae). Folia Clin Biol. 1940;12(5):151-160.
- Galvão ALA. Contribuição ao Conhecimento das espécies de Myzorrhynchella (Diptera, Culicidae). Arch Zool S Paulo. 1941;2:558-576.
- Garros C, Dujardin JP. Genetic and Phenetic Approaches to *Anopheles* Systematics. in: S. Manguin (Ed.) *Anopheles* Mosquitoes – New Insights into Malaria Vectors. InTech Open Access. 2013;81-105.
- Gomes AC, Paula MB, Natal D, Gotlieb SLD. Ecologia de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root em área de implantação de empreendimento hidrelétrico, na divisa dos Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(3):272-276.
- Gorham JR, Stojanovich CJ, Scott HG. Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamerica Oriental. Published by Atlanta, GA, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Center. 1967.
- Guimarães AE, Arlé M. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil. I – Distribuição Estacional. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79(3):309-323.
- Guimarães AE, Arlé M, Machado RNM. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil. II. Distribuição Vertical. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985;80(2):171-185.

- Guimarães AE, Motta MA, Arlé M, Machado RM, Gonçalves LD. Bionomia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em áreas de Mata Atlântica no município de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, Brasil. I Frequência intra, peri e extradomiciliar. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84(4):243-254.
- Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Sant'Anna A, Jovita AM. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em áreas do Parque Nacional da Serra da Bocaina, Brasil. I - Distribuição por habitat. Rev Saúde Pública. 2000;34(3):243-50.
- Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Sant'Anna A. Ecologia de mosquitos em áreas do Parque Nacional da Serra da Bocaina. II – Frequência mensal e fatores climáticos. Rev Saúde Pública. 2001;35(4):392-399.
- Guimarães AE, Lopes CM, Mello RP, Alencar J. Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em áreas do Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. 1 – Distribuição por hábitat. Cad Saúde Pública. 2003;19(4):1107-1116.
- Hackett BJ, Gimnig J, Guelbeogo W, Costantini C, Koekemoer LL, Coetzee M, Collins FH, Besansky NJ. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. Insect Mol Biol. 2000;9:369-374.
- Harbach RE, Roberts DR, Manguin S. Variation in the hindtarsal markings of *Anopheles darling* (Diptera: Culicidae) in Belize. Mosquito Systematics. 1993;25(3):192-197.
- Harbach RE. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of the phylogenetic relationships. Bull Entomol Res. 2004;94:537-553.
- Harbach RE, Kitching IJ. Reconsideration of anopheline mosquito phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. Syst Biodv. 2005;3(4):345-374.
- Harbach RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa. 2007;1668:591-638.

- Harbach RE. The Phylogeny and Classification of *Anopheles*. in: S. Manguin (Ed.) *Anopheles Mosquitoes – New Insights into Malaria Vectors*. InTech Open Access. 2013;3-55.
- Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/> (acessado em outubro de 2015).
- Herbert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identification through DNA barcodes. *Proc R Lond B*. 2003;270:313-321.
- Howard LO, Dyar HG, Knab F. The mosquitoes of North and Central America and the West Indies. Part II. Published by the Carnegie Institution of Washington. Vol 4. 1917.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. 2001;17:754-755.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16:111-120.
- Kirchgatter K, Tubaki RM, Malafronte RS, Alves IC, Lima GFMC, et al. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) in peridomiliary area during asymptomatic malaria transmission in the Atlantic Forest: Molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts. *Rev Inst Med Trop*. 2014;56(5):403-409.
- Kirichenko N, Huemer P, Deutsch H, Triberti P, Rougerie R, Lopez-Vaamonde C. Integrative taxonomy reveals a new species of *Callisto* (Lepidoptera, Gracillariidae) in the Alps. *ZooKeys*. 2015;473:157-176.
- Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105:2761-2762.
- Lane J. Notas sobre Culicideos de Rifaina. *Rev Biol Hyg*. 1935;6(2):73-78.

Lane J. Notas sobre mosquitos de São Paulo. Instituto de Hygiene de São Paulo. Boletim nº 60. 1936.

Lane J. Catálogo dos mosquitos neotrópicos. Instituto de Higiene de São Paulo. 1939.

Lardeux F, Chávez T, Rodríguez R, Torrez L. *Anopheles* of Bolivia: new records with an updated and annotated checklist. C R Biol. 2009;332:489-499.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007;23:2947-2948.

Laurito M, Oliveira TMP, Almirón WR, Sallum MAM. COI barcode versus morphological identification of *Culex (Culex)* (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:110-122.

Limongi JE, Chaves KM, Paula MBC, Costa FC, Silva AA, Lopes IS, et al. Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(3):232-237.

Linthicum, K.J. A revision of the *Argyritarsis* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1988;20:98-271.

Lira-Vieira AR, Gurgel-Gonçalves R, Moreira IM, Yoshizawa MAC, Coutinho ML, Prado PS, Souza JL, et al. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the gallery forest of Brasília National Park, Brazil, with an emphasis on potential vectors of yellow fever. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(5):566-574.

Lopes J, Lozovei AL. Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do norte do Paraná, Brasil. II. Coletas com isca humana. Rev bras Zool. 1996;13(3):585-596.

- Lounibos LP, Duzak D, Linley JR. Comparative egg morphology of six species of the Albimanus section of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1997;34:136-155.
- Lustosa ES, Naves HAM, Carvalho MESD. Anofelinos de oito municípios do estado de Goiás e fazenda Riacho Frio, Distrito Federal – 1981 – 1987. *Rev Pat Trop.* 1989;18(1):1-6.
- Manoel ER, Silva HHG, Silva IG. Espécies de *Anopheles* (Diptera, Culicidae) em municípios com risco e autoctonia de malária no estado de Goiás. *Rev Pat Trop.* 2010;39(2):137-144.
- Marchon-Silva V, Lourenço-de-Oliveira R, Almeida MD, Silva-Vasconcelos A, Costa J. The type specimens of mosquitos (Diptera, Culicidae) deposited in the Entomological Collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91(4):471-478.
- Marcondes CB, Lozovei AL, Falqueto A, Brazil RP, Galati EAB, Aguiar GM, Souza NA. Influence of Altitude, Latitude and Season of Collection (Bergmann's Rule) on the Dimensions of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94:693-700.
- Marcondes CB, Fernandes A, Muller GA. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) near a reservoir in the Western part of the Brazilian State of Santa Catarina. *Biota Neotrop.* 2006;6(3):bn02606032006.
- Melville J, Smith K, Hobson R, Hunjan S, Shoo L. The Role of Integrative Taxonomy in the Conservation Management of Cryptic Species: The Taxonomic Status of Endangered Earless Dragons (Agamidae: *Tympanocryptis*) in the Grasslands of Queensland, Australia. *PLoS ONE.* 2014;9:e101847.
- Meneguzzi VC, Santos CB, Pinto IS, Feitoza LR, Feitoza HN, Falqueto A. Use of geoprocessing to define malaria risk areas and evaluation of the vectorial importance of anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(4):570-575.

- Ministério da Saúde. Malária: Resumo Epidemiológico Nacional Mensal 2014[SIVEP presente na internet]. Brasília (DF); 2014 [acesso em 21 de julho de 2015]. Disponível em: <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet>.
- Missawa NA, Ribeiro ALM, Maciel GBML, Zeilhofer P. Comparison of capture methods for the diagnosis of adult anopheline populations from State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(5):555-560.
- Morales-Ayala F. A list of the Mosquitoes of Peru (Diptera, Culicidae). *Mosq Syst Newsletter*. 1971;3(3):138-145.
- Mousseau TA. Ectotherms Follow the Converse to Bergmann's Rule. *Evolution*. 1997;51:630-632.
- Nagaki SS, Motta MA, Sallum MAM. Redescription of *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* Galvão & Amaral and description of a new species of the Myzorhynchella Section (Diptera: Culicidae) from Serra da Mantiqueira, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(3):278-285.
- Nagaki SS, Silva AM, Sallum MAM. Redescription of *Anopheles (Nyssorhynchus) lutzii*, and resurrection of *Anopheles guarani* from synonymy with *An. lutzii* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am*. 2011;104(3):374-388.
- Naves HAM, Carvalho MESD, Carneiro E, Sales KP. Espécies de Culicidae de Goiânia-Brasil. *Rev Pat Trop*. 1996;25(1):31-42.
- Naves HAM, Carvalho MESD, Sales KP, Carneiro E. Preferência para diferentes tipos de isca por mosquitos (Diptera: Culicidae) capturados em Goiânia-Goiás. *Rev Pat Trop*. 1998;27(1):43-52.
- Nunes TC, Ribeiro RS, Faria PRGV, Silva JR NJ. Vetores de importância médica na área de influência da pequena central hidrelétrica Mosquitão – Goiás. *estudos*. 2008;35(11,12):1085-1105.

- Neiva A. Contribuição para o estudo dos dipteros. Observações sobre a biologia e sistemática das anofelinas brasileiras e suas relações com o impaludismo. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;69-77.
- Parise EV, Vigilância, prevenção e controle da malária em Palmas, Tocantins, Brasil, no período 2000 a 2013. Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde. 2014; Hygeia 2014;10(18):190-206.
- Parra-Henao G, Delgado D, Alarcón EP. Especies de *Anopheles* em el Canón del Río Sogamoso, Santander, Colombia, al inicio de la puesta em marcha del proyecto hidroeléctrico. Bol Mal Salud Amb. 2012;52(2):287-293.
- Peyton EL, Wilkerson RC, Harbach RE. Comparative analysys of the subgenera *Kerteszia* and *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1992;24:51-69.
- Pinto C. Mosquitos da região neotropica (Brasil, S. Paulo). I (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1930;552-560.
- Pinto C. Alguns mosquitos do Brasil e do oriente da Bolivia (Diptera. Culicidae). Rev med-cirurg Brasil. 1932.
- Pinto C, Netto S, Marques H. Mosquitoes do Rio Grande do sul. Arquivos do Departamento Estadual de Saúde Rio Grande do Sul. 1940;1:14-52.
- Portes MGT, Rossi JCN, Nascimento JC, Zeccer S, Silva LA. Anofelinos de Santa Catarina (Diptera: Culicidae), Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(2):156-160.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol. 2008;25(7):1253-6.
- Quispe E. Distribución y actividad de picadura de especies de *Anopheles* en el departamento de Pando, zona amazónica de Bolivia 2006. Rev de Enfermedades Infecciosas y Tropicales. 2009;1(1):24-28.

- Rachou RG, Ferraz DM. Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica dos anofelinos no Brasil: estado de Santa Catarina. Rev Bras Malariol. 1951;3:540-554.
- Rachou RG, Ricciardi I. Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica dos anofelinos no Brasil: Estado do Paraná (Distribuição por municípios e localidades). Rev Bras Malariol. 1951;3:423-447.
- Rachou RG, Sousa J. Do encontro de um exemplar de *A (M) nigratarsis* (Chagas, 1907) no estado do Paraná. Rev Bras Malariol. 1950;2:234-238.
- Rebêlo JMM, Moraes JLP, Alves GA, Leonardo FS, Rocha RV, et al. Distribuição das espécies do gênero *Anopheles* (Diptera, Culicidae) no Estado do Maranhão, Brasil. Cad Saúde Pública. 2007;23(12):2959-2971.
- Reidenbach KR, Cook S, Bertone MA, Harbach RE, Wiegmann BM, Besansky NJ. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. BMC Evol Biol. 2009;9:298.
- Rezende HR, Soares RM, Cerutti Jr C, Alves I, Natal D, et al. Entomological Characterization and Natural Infection of Anophelines in an Area of the Atlantic Forest with Autochthonous Malaria Cases in Mountainous Region of Espírito Santo State, Brazil. Neotrop Entomol. 2009;38(2):272-280.
- Ribeiro ALM, Miyazaki RD, Rodrigues JSV, Campelo Jr JH. Parity and influence of abiotic factors on *Anopheles* in the Manso dam, State of Mato Grosso, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(4):498-501.
- Root FM. Studies on Brazilian mosquitoes. I. The anophelines of the *Nyssorhynchus* group. The American Journal of Hygiene. 1926;6:684-717.
- Root FM. Studies on Brazilian mosquitoes. IV. Notes on some Brazilian species of *Anopheles*. Am J Hyg. 1927;7(5):599-605.

- Rossi GC, Lestani EA, D'oria JM. Nuevos registros y distribución de mosquitos de la Argentina (Diptera: Culicidae). *Rev Soc Entomol Argent.* 2006;65(3-4):51-56.
- Rossi GC, Lestani EA. New records of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Misiones Province, Argentina. *Rev Soc Entomol Argent.* 2014;73(1-2):49-53.
- Ruiz F, Linton YM, Ponsonby DJ, Conn JE, Herrera M, Quiñones ML, Vélez ID, Wilkerson RC. Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105:899-903.
- Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, et al. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasit Vectors.* 2012;5:44.
- Sallum MAM, Schultz TR, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera Culicidae) Based on Morphological Characters. *Ann Entomol Soc Am.* 2000;93:745-775.
- Sallum MAM, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, Santos CLS. Insight into *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) Species from Brazil. *J Med Entomol.* 2008;45:970-981.
- Sallum MAM, Foster PG, Dos Santos CLS, Flores DC, Motoki MT, Bergo ES. Resurrection of Two Species from Synonymy of *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root, and Characterization of a Distinct Morphological form from the Strodei Complex (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2010;47:504-526.
- Santos-Neto LG, Lozovei AL. Aspectos ecológicos de *Anopheles cruzii* e *Culex ribeirensis* (Diptera, Culicidae) da Mata Atlântica de Morretes, Paraná, Brasil. *Rev Bras Entomol.* 2008;52(1):105-111.
- Shannon RC. *Anopheles (Nyssorhynchus) guarani* Shannon new species. In Dyar HG. The mosquitoes of the Americas. Carnegie Institution of Washington. 1928;387:444pp.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725-2729.
- Theobald FV. A monograph of the Culicidae of the World. London, British Museum (Natural History). 1907.
- Tubaki RM, Hashimoto S, Domingos MF, Berenstein S. Abundance and frequency of culicids, emphasizing anophelines (Diptera, Culicidae), at Taquaruçu dam in the Paranapanema basin, Southern Brazil. *Rev Bras Entomol.* 1999;43(3/4):173-184.
- Wang X, Liu C, Huang L, Bengtsson-Palme J, Chen H, Zhang J, Cai D, Li J. ITS1: A DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?. *Mol Ecol.* 2015;15:573-586.
- WHO. World Malaria Report 2014. World Health Organization. Geneva. 2014. p. 2-167.
- Wilkerson RC, Peyton EL. Standardized Nomenclature for the Costal Wing Spots of the genus *Anopheles* and other spotted-wing mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1990;27:207-224.
- Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han, J, Li Y, Pang X, Xu H, Zhu Y, Xiao P, Chen S. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE.* 2010;5:e13102.
- Zavortink TJ. The dismal state of mosquito systematics: perspectives of a classical taxonomist. *Bull Soc Vector Ecol.* 1994;19:69-72.

Anexo 1 – Ficha de campo.

PAÍS: BRASIL		Longitude/Latitude:		Data:		Nº da coleta					
Nº Coleta:	Localidade:	Altitude (m):			Sub-número	LE	PE	Sexo	Terminalia	Identificação	Condição
<p><b>Estágios Coletados:</b> O – 1 – 2 – 3 – 4 – P – A</p>											
<p><b>Coletores:</b></p>											
<p><b>Tipo de coleção:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Inaturos</li> <li>Pouso</li> <li>Refúgio de animais</li> <li>Caverna</li> <li>Buraco em árvore</li> <li>Vegetação</li> <li>Outros</li> <li>Picando</li> <li>Rede</li> <li>Armadilha luminosa CDC</li> <li>Armadilha de Shannon</li> <li>BGS</li> <li>Mosquito magnet</li> <li>Voo</li> <li>Cural</li> <li>Revoada</li> <li>Atração animal</li> </ol>			<p><b>Ambiente:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Floresta tropical</li> <li>Floresta tropical permanente</li> <li>Floresta tropical semidecídua</li> <li>Floresta tropical decídua</li> <li>Floresta de coníferas</li> <li>Arbustos</li> <li>Cerrado</li> <li>Cerradão</li> <li>Floresta inundada</li> <li>Floresta seca</li> <li>Aberto</li> <li>Mangue</li> <li>Plantação de frutas</li> <li>Plantação de arroz irrigado</li> <li>Agricultura</li> <li>Bambu</li> <li>Plantação de palmito</li> <li>Urbano</li> <li>Rural</li> <li>Outros</li> </ol>			<p><b>Habitat:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Lago</li> <li>Poça no solo</li> <li>Pântano</li> <li>Mangue</li> <li>Área inundada</li> <li>Margem de rio</li> <li>Margem de correço</li> <li>Poça em pedra</li> <li>Poço</li> <li>Fonte</li> <li>Cisterna</li> <li>Caixa d'água</li> <li>Vale de drenagem</li> <li>Recipientes artificiais</li> <li>Pneu</li> <li>Buraco em árvores</li> <li>Raízes</li> <li>Internódio de bambu</li> <li>Bambu aberto</li> <li>Axila de bromélias</li> <li>Axilas de abacaxi</li> <li>Axilas de Eryngium</li> <li>Planta carnívora</li> <li>Folhas caídas no solo</li> <li>Casca de castanha</li> <li>Casca de coco</li> <li>Pecíolo de folhas de palmeiras</li> <li>Buracos de caranguejos</li> <li>Calha</li> <li>Ralo</li> <li>Recipientes artificiais</li> <li>Marca de pneu</li> <li>Marcas de patas de animais</li> <li>Outros</li> </ol>			<p><b>Dimensão do criadouro:</b> _____ metros</p> <p><b>Água:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Permanente</li> <li>Temporária</li> <li>Semi permanente</li> </ol> <p><b>Movimento da água:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Estagnada</li> <li>Lento</li> <li>Moderado</li> <li>Rápido</li> </ol> <p><b>Salinidade:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Sem sal</li> <li>Salgada</li> <li>Salobra</li> </ol> <p><b>Turbidez:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Clara</li> <li>Colorida</li> <li>Turbida</li> <li>Poluída</li> </ol> <p><b>Vegetação:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Submersa</li> <li>Emergente</li> <li>Flutuante</li> <li>Algas vermelhas</li> <li>Algas verdes</li> <li>Algas marrom</li> </ol> <p><b>Quantidade de vegetação:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Nenhuma</li> <li>Escassa</li> <li>Muita</li> </ol> <p><b>Variável físico química da água:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Oxigênio dissolvido na água</li> <li>PH da água do criadouro</li> <li>Temperatura da água</li> <li>Temperatura do ambiente</li> <li>Umidade do ar: _____</li> </ol>		
<p><b>Terreno:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Montanhoso</li> <li>Colina</li> <li>Vale</li> <li>Planalto</li> <li>Plano</li> </ol>			<p><b>Modificadores de ambiente:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Primário</li> <li>Secundário</li> <li>Banana</li> <li>Borracha</li> <li>Frua</li> <li>Palmeiras</li> <li>Abacaxi</li> <li>Canas de açúcar</li> <li>Arrozal</li> <li>Laranjal</li> <li>Cafézal</li> <li>Outros</li> </ol>			<p><b>Vento:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Nenhum</li> <li>Fraco</li> <li>Forte</li> </ol>			<p><b>Altura do criadouro/solo:</b> _____ metros</p>		
<p><b>Distância da casa:</b> _____ metros</p>			<p><b>Céu:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Claro</li> <li>Parcialmente nublado</li> <li>Nublado</li> <li>Neblina</li> <li>Garoa</li> <li>Chuva leve</li> <li>Chuva forte</li> </ol>			<p><b>Sombra:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Nenhuma</li> <li>Parcial</li> <li>Total</li> </ol>			<p><b>Hospedeiro:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Humano</li> <li>Cavalo</li> <li>Porco</li> <li>Gado</li> <li>Burro</li> <li>Galinha</li> <li>Outros</li> </ol>		



Number of branches for setae of the larva of *An. lutzii* - Forma 1: range (mode).

Seta No	Head C	Thorax				Abdominal segments									
		P	M	T	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	X		
0	0	0	-	-	-	0	0	0	0	0	1	0	1	-	
1	0	7-10 (9)	0	1	1-5 (2)	#N/D	15-20 (20)	17-23 (17)	14-19 (19)	0	0	0	1	1	
2	0	10-15 (12)	1-2 (1)	1	1-3 (2)	2-6 (4)	2-4 (3)	1-3 (1)	2-4 (3)	2-4 (3)	3-4 (3)	3-6 (4)	3-6 (4)	11-15 (12)	
3	0	1	1	2-4 (3)	1	1	1	1-2 (1)	1	1-2 (1)	2-4 (3)	5-12 (8)	7-10 (9)		
4	1-2 (1)	0	2-4 (3)	0	3-5 (4)	2-5 (4)	2-4 (3)	1-3 (2)	2-3 (3)	1	1	1	13-15 (13)		
5	0	0	1-3 (1)	0	3-4 (3)	4-6 (5)	2-5 (3)	1-4 (2)	3-6 (4)	4-7 (5)	3-6 (4)	4-6 (4)	-		
6	0	1	2-5 (3)	2-4 (3)	0	0	0	1	1	1-3 (1)	2-4 (3)	1-S	5-9 (6)		
7	0	0	3-4 (3)	0	0	0	3-5 (4)	2-4 (3)	3-4 (3)	3-5 (4)	2-4 (3)	2-S	2-4 (3)		
8	1-3 (2)	0	0	0	-	2-3 (2)	1-2 (1)	1-2 (1)	2-3 (2)	2-3 (3)	2-3 (3)	6-S	1		
9	3-6 (5)	3-6 (6)	1	1	4-6 (5)	4-7 (5)	3-5 (4)	3-5 (3)	3-5 (3)	2-3 (3)	2-4 (3)	7-S	1-2 (2)		
10	1-3 (2)	1	1	1	1-2 (1)	1-3 (2)	1	1	1	2-5 (3)	3-5 (3)	8-S	2-3 (2)		
11	0	2-4 (3)	0	1	3-5 (3)	1	2-3 (2)	1-3 (2)	2	2	1-2 (2)	9-S	1-2 (1)		
12	3-4 (3)	1	1	2-3 (3)	2-5 (3)	2-3 (3)	2	2-3 (2)	2	1	1	-	-		
13	2-4 (3)	6-13 (9)	3-5 (4)	2-5 (3)	3-5 (4)	2-3 (2)	1-3 (2)	1-3 (2)	3-5 (4)	2-4 (3)	3-4 (3)	-	-		
14	0	2-4 (3)	3-5 (3)	-	-	-	-	0	0	0	0	0	-		
15	1-3 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

## Pupa

Number of branches for setae of the pupa of *Anopheles antunesi* : range (mode).

Seta No.	Cephalothorax CT	Abdominal segments									Paddle P
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
0	-	-	1	1	1	0	0	1	1	-	-
1	1-2 (2)	n.c.	1-4 (2)	1-3 (1)	1-2 (1)	1-2 (1)	1	1	-	0	1
2	1-2 (2)	1	1-3 (3)	1-3 (2)	1-2 (1)	1-2 (1)	1-2 (1)	1-2 (1)	1-2 (1)	-	1
3	1-3 (2)	2-6 (5)	1-2 (1)	1-3 (1)	1-4 (3)	1-6 (2)	1	1-3 (1)	-	-	-
4	1-4 (2)	1-4 (3)	1-3 (2)	2-4 (3)	1-4 (3)	1-4 (2)	1-2 (1)	1-2 (1)	1-12 (2)	-	-
5	2-3 (3)	1	1-3 (2)	1-3 (2)	1-2 (1)	1-2 (1)	1-2 (1)	1-3 (1)	-	-	-
6	1-3 (1)	1	1-2 (1)	1-2 (1)	1	1	1	1	-	-	-
7	1-3 (2)	1-4 (3)	2-5 (3)	1-4 (4)	1-4 (3)	1-4 (2)	1-2 (1)	1-2 (1)	-	-	-
8	1-3 (1)	-	-	1-2 (1)	1-2 (2)	1-2 (1)	1-3 (2)	1-3 (2)	-	-	-
9	1-3 (2)	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
10	1-2 (1)	-	-	1-4 (1)	1	1-2 (1)	0	1-3 (1)	-	-	-
11	2-6 (3)	-	-	1-2 (1)	1-2 (1)	1	1-2 (1)	1-3 (2)	-	-	-
12	1-2 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	1	1	0	0	1	-	-

n.c. = not counted

Number of branches for setae of the pupa of *An. antunesi* - Forma 1 : range (mode)

Seta No.	Cephalothorax CT	Abdominal segments									Paddle P
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
0	-	-	0	0	0	0	0	0	1	-	-
1	1-2 (2)	n.c.	1-3 (1)	1	1	1	1	1	-	0	1
2	1-2 (2)	1	1-3 (2)	1-2 (1)	1	1-2 (1)	1	1	-	-	1
3	1-2 (1)	2-5 (3)	1-2 (1)	1	2-4 (3)	1-2 (2)	1-2 (1)	2-3 (2)	-	-	-
4	1-3 (2)	2-4 (2)	1-2 (1)	1-3 (2)	1-3 (1)	1-3 (2)	1	1	1-3 (1)	-	-
5	2-3 (2)	1-2 (1)	1-3 (2)	1-2 (1)	1	1	1-2 (1)	1	-	-	-
6	1-3 (1)	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-
7	1-3 (2)	2-5 (3)	2-4 (3)	1-2 (2)	1-3 (2)	1-3 (2)	1	1	-	-	-
8	1	-	-	1-2 (2)	1-2 (2)	1-2 (2)	1-3 (2)	1-2 (2)	-	-	-
9	1-2 (2)	1	0	1	1	1	1	1	1	-	-
10	1-2 (1)	-	-	1-3 (2)	1	1	0	1-2 (1)	-	-	-
11	1-4 (3)	-	-	1-2 (1)	1	1	1	1-2 (1)	-	-	-
12	1-2 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	1	1	0	0	1	-	-

n.c. = not counted

**Number of branches for setae of the pupa of *An. antunesi* - Forma 2: range (mode)**

Seta No.	Cephalothorax	Abdominal segments									Paddle P	
	CT	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX		
0	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
1	1-2 (2)	n.c.	2-4 (2)	1-3 (1)	1-2 (1)	1	1	1	1	-	1	1
2	1-2 (1)	1	1-3 (3)	1-3 (3)	1-3 (1)	1-2 (1)	1-3 (1)	1-2 (1)	1-2 (1)	-	-	1
3	1-2 (2)	1-3 (3)	1-2 (1)	1-5 (1)	1-4 (3)	1-4 (2)	1-3 (1)	1-3 (1)	-	-	-	-
4	1-2 (1)	1-3 (2)	1-4 (2)	2-4 (3)	1-3 (2)	1-3 (2)	1-2 (1)	1-2 (1)	1-3 (2)	-	-	-
5	1-2 (1)	1-2 (1)	1-3 (2)	1-4 (1)	1-2 (1)	1	1-2 (1)	1-2 (1)	-	-	-	-
6	1-2 (1)	1	1	1-2 (1)	1	1	1	1	-	-	-	-
7	1-2 (2)	1-2 (2)	1-3 (1)	2-3 (3)	1-3 (2)	1-3 (2)	1	1-2 (1)	-	-	-	-
8	1-2 (1)	-	-	1-3 (2)	1-2 (2)	1-2 (1)	1-2 (2)	1-3 (2)	-	-	-	-
9	1-2 (2)	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-
10	1-3 (2)	-	-	1-4 (2)	1	1-2 (1)	0	1-4 (2)	-	-	-	-
11	1-4 (3)	-	-	1-2 (1)	1-2 (1)	1	1	1-3 (2)	-	-	-	-
12	1-2 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	1	1	0	0	1	-	-	-

n.c. = not counted

**Number of branches for setae of the pupa of *An. lutzii* - Forma 1: range (mode)**

Seta No.	Cephalothorax	Abdominal segments									Paddle P	
	CT	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX		
0	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
1	1-2 (1)	n.c.	2-4 (2)	1	1	1	1	1	-	0	-	1
2	1-2 (1)	2-4 (3)	2-3 (3)	2-3 (3)	1-3 (2)	1-3 (2)	1-2 (2)	1-2 (2)	-	-	-	1
3	1-2 (1)	1	1	1-3 (1)	2-4 (3)	1-3 (1)	1-3 (2)	1-3 (2)	-	-	-	-
4	1-3 (2)	2-4 (3)	1-2 (2)	1-3 (2)	1-3 (1)	1-3 (2)	1	1	1-3 (1)	-	-	-
5	1-3 (2)	1-2 (1)	2-3 (3)	2-4 (3)	1-3 (2)	1	1-2 (1)	1-2 (1)	-	-	-	-
6	1-3 (1)	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-
7	1-2 (1)	1-3 (1)	1-4 (2)	1-3 (2)	1-3 (2)	2-4 (3)	1	1	-	-	-	-
8	1	-	-	1-3 (2)	1-3 (2)	1-2 (2)	2-3 (2)	1-3 (2)	-	-	-	-
9	1-3 (2)	1-3 (1)	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-
10	1-2 (1)	-	-	1-3 (2)	1-2 (1)	1	0	1-2 (1)	-	-	-	-
11	2-5 (3)	-	-	1-2 (1)	1	1	1-2 (1)	1-2 (1)	-	-	-	-
12	1-2 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	1	1	1	0	1	-	-	-

n.c. = not counted

**Anexo 3** – Informação dos espécimes utilizados para as análises moleculares.

<b>Amostra</b>	<b>Localidade (UF)</b>	<b>Espécie</b>	<b>COI</b>	<b>ITS2</b>	<b>Catalase</b>
SP02(9)-2	Pariquera-Açu (SP)	<i>An. lutzii</i>	JF923664	JN023044	-
SP02(10)-5			JF923665	JN023045	-
SP02(11)-9			JF923666	JN023046	*
SP02(12)-1			JF923667	JN023047	*
SP02(13)-3			JF923668	JN023048	-
SP02(14)-6			JF923669	JN023049	-
SP02(15)-5			JF923670	JN023050	*
VR1			*	*	*
SP160a	Cananéia (SP)		*	*	-
SP160b			*	*	*
SP160c			*	*	*
TPAP-100	Tapiraí (SP)		*	*	-
PR28(5)-1	Guaíra (PR)	<i>An. parvus</i>	JF923677	JN023063	-
				JN023062	
PR28(18)-1			JF923678	JN023064	-
PR28(65)-6			JF923679	JN023065	-
MG56(2)			JF923676	JN023061	-
MG07(9)-1	Frutal (MG)		-	-	*
MG07(9)-20			JF923675	JN023060	-
				JN023059	
MG111a			*	-	-
MG111b			*	-	-
MG57-18			*	*	-
MG57-107			*	-	-
MG65a	União de Minas (MG)		*	*	-
MG65b			*	*	-
AS5-1	Pilar de Goiás (GO)		JF923671	JN023051	*

*Continua*

continuação

Amostra	Localidade (UF)	Espécie	COI	ITS2	Catalase
AS5-2			JF923672	JN023054	-
				JN023053	
				JN023052	
AS5-3			JF923673	JN023055	-
AS5-4			JF923674	JN023058	-
				JN023057	
				JN023056	
MT	Campus de Júlio (MT)		*	-	
SP104(10)-1	Pindamonhangaba (SP)		*	*	*
SP73a			*	*	*
Sana1	Macaé (RJ)		*	*	-
Sana2			*	-	-
DF1a	Brasília (DF)		*	-	-
DF3b			*	*	-
PR29	Foz do Iguaçu (PR)	<i>An. guarani</i>	JF923659	JN023041	*
PR29(8)			JF923660	-	-
PR29(9)-6			JF923661	-	-
SC14-2	Campo Alegre (SC)		*	-	-
SC14-3			*	*	-
SC14-100			*	*	*
SC14-101			*	*	*
PR30-1	São José dos Pinhais (PR)		*	*	*
PR30-8			*	*	-
TAP-101	Tapiraí (SP)		*	*	*
SUCEN	São Paulo (SP)		*	*	*
SP162a	São José do Barreiro (SP)		*	*	*
DF3a	Brasília (DF)		*	*	*
DF3c			*	*	*
DF3d			*	*	*

Continua

continuação

Amostra	Localidade (UF)	Espécie	COI	ITS2	Catalase
RJ03(6)	Itatiaia (RJ)	<i>An. antunesi</i>	GU989342	GU989324	*
RJ03(11)			GU989343	GU989325	-
RJ03(12)			GU989344	GU989326	*
RJ03(13)			GU989345	GU989327	-
VP11b	Pindamonhangaba (SP)		GU989347	GU989329	-
VP09(17)			GU989346	GU989328	*
VP11c			GU989349	-	-
VP11d			GU989350		-
SP131-8			*	-	-
SP132-105			*	-	*
SP132-26			*	-	-
SP150-6			*	-	-
SP159(1)-100	Tapiraí (SP)		*	*	*
SP161a	Salesópolis (SP)		*	-	-
SP163-100	Campos do Jordão (SP)		*	-	*
VP11a	Pindamonhangaba (SP)	<i>An. pristinus</i>	GU989348	GU989331	-
SP50a			GU989351	GU989333	*
SP50b			GU989352	GU989334	-
SP51-100			GU989353	GU989335	*
SP53-4			GU989354	GU989336	-
SP53-5			GU989355	GU989337	-
SP53-100			GU989356	GU989338	*
SP53-101			GU989357	GU989339	*
SP55-2			GU989358	GU989340	*
SP55-4			GU989359	GU989341	-
SP147-2			*	*	-
SP147-4			*	-	-
SP147-6			*	*	-
SP147-101			*	*	*

continua

continuação

Amostra	Localidade (UF)	Espécie	COI	ITS2	Catalase
SP147-102			*	*	-
SP149-100			*	*	-
SP149-101			*	*	-
SP149-103			*	-	-
SP149-105			*	*	-
SP149-106			*	*	-
SP149-107			*	*	*
SP149-111			*	*	-
A325	Maquiné (RS)	<i>An. lutzii</i> – F1	JF923662	JN023042	*
RS19-13			JN413695	-	-
RS19-21			JN413696	-	*
RS19-22			JN413697	-	*
RS33-3			JN413700	-	*
RS33-105			JN413701	-	*
RS33a			JN413698	-	-
RS33b			JN413699	-	-
RS49-6			*	*	*
RS49-7			*	*	-
RS49-13			*	*	*
RS49-25			*	*	-
RS49-29			*	*	-
SP132-106	Pindamonhangaba (SP)	<i>An. antunesi</i> - F1	*	*	-
SP132-23			*	*	-
SP132-25			*	*	-
SP149a			*	*	-
SP149-108			*	*	*
SP149-109			*	*	-
SP149-110			*	*	*
SP149-112			*	*	-

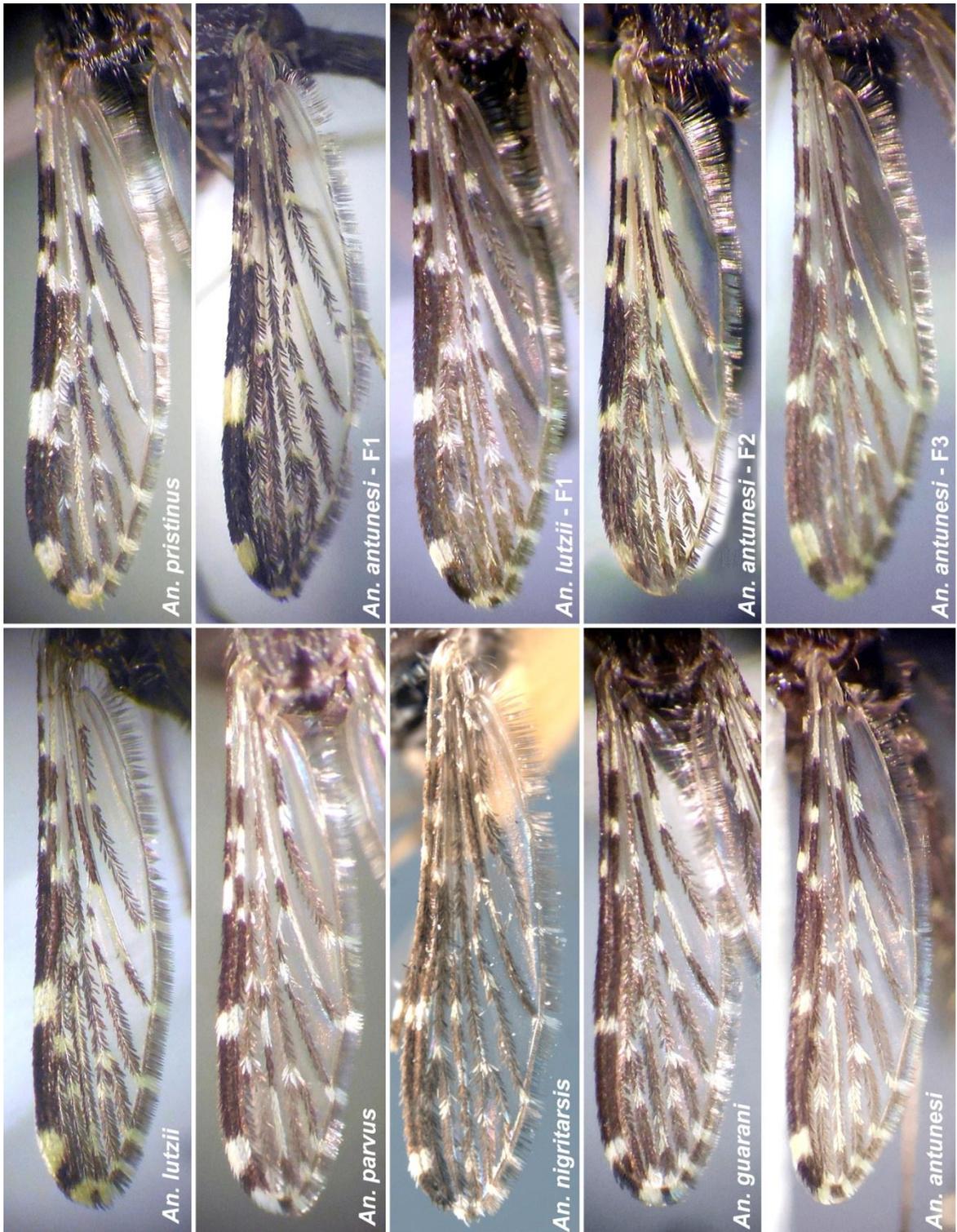
continua

continuação

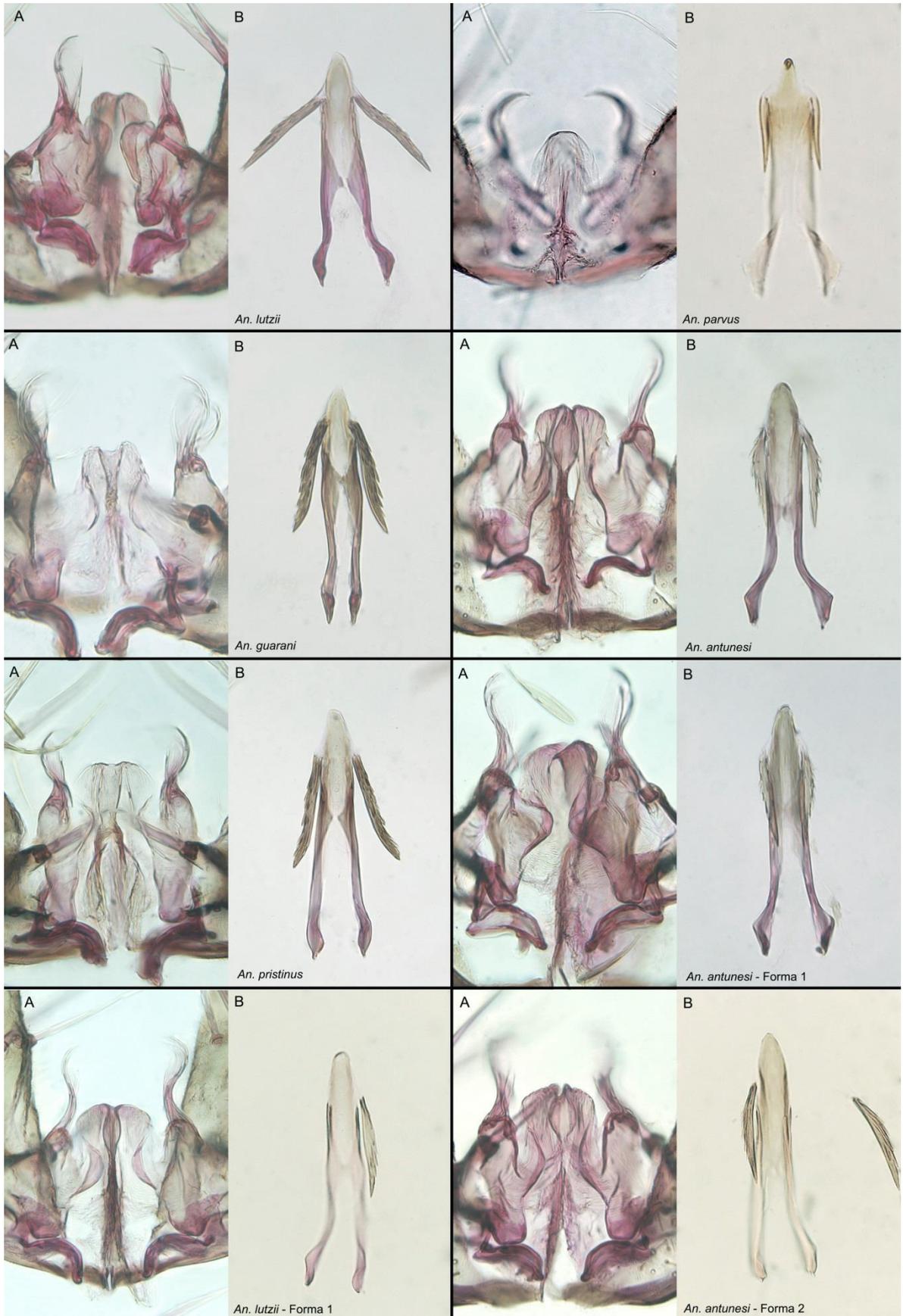
<b>Amostra</b>	<b>Localidade (UF)</b>	<b>Espécie</b>	<b>COI</b>	<b>ITS2</b>	<b>Catalase</b>
SP149-112			*	*	-
SP150-1			*	*	-
RS59-5	São Francisco de Paula	<i>An. antunesi</i> -F2	*	*	*
RS59-12	(RS)		*	*	-
RS59-18			*	*	-
RS54-25			*	*	*
RS55-1			*	*	*
B369	Maquiné (RS)	<i>An. antunesi</i> -F3	JF923663	JN023043	*
RS48-12			*	*	*
RS52-15			*	*	*
RS49-9			*	-	-
TAP-1	Tapiraí (SP)	<i>An. pristinus</i> - F1	*	*	*
TAP-2			*	*	*
SP159a			*	*	-
RS16	São Francisco de Paula	<i>An. antunesi</i> - F4	JN413693	*	*
RS16my	(SP)		JN413694	*	*

(\*) indicam sequências do presente estudo; (-) indicam que não há sequências

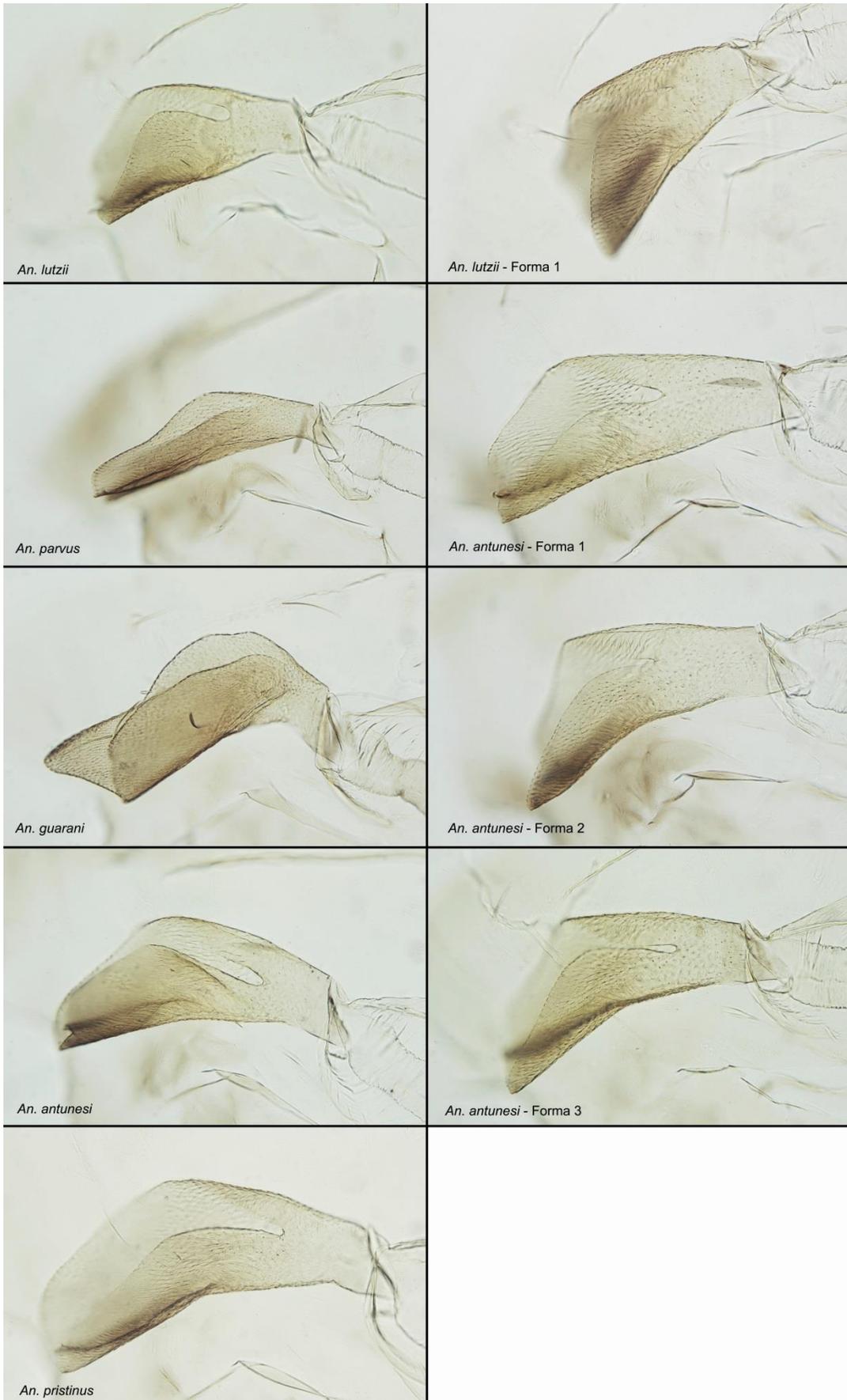
## Anexo 4 – Fotos de asas.



**Anexo 5 – Genitália masculina. (A) Claspete ventral, vista dorsal; (B) Edeago.**



## Anexo 6 – Trompas.



## Lattes



**Sandra Sayuri Nagaki**

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0544181016545552>

Última atualização do currículo em 01/05/2015

---

Possui graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura/Bacharelado pela Universidade de Mogi das Cruzes (2003), especialização em Entomologia Médica pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (2005), mestrado em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública/USP (2009) e doutorado em andamento pela mesma faculdade. Atua na área de Entomologia Médica com ênfase em: Culicidae, Anopheles, Taxonomia. **(Texto informado pelo autor)**

---

### Identificação

**Nome** Sandra Sayuri Nagaki

**Nome em citações bibliográficas** NAGAKI, S. S.;Nagaki, S. S.;Nagaki, Sandra S.;NAGAKI, SANDRA SAYURI;NAGAKI, SANDRA S

---

### Endereço

**Endereço Profissional** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.  
Av. Dr. Arnaldo, 715; Departamento de Epidemiologia; Laboratório de Taxonomia  
Cerqueira Cesar  
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil  
Telefone: (11) 30617731  
URL da Homepage: [www.fsp.usp.br](http://www.fsp.usp.br)

---

### Formação acadêmica/titulação

- 2011** Doutorado em andamento em Saúde Pública.  
Faculdade de Saúde Pública - USP.  
Título: Revisão da Seção Myzorhynchella de Anopheles (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae).  
Orientador: Maria Anice Mureb Sallum.  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
- 2007 - 2009** Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.  
Título: Estudos sistemáticos sobre espécies da seção Myzorhynchella do subgênero Nyssorhynchus (Diptera: Culicidae).Ano de Obtenção: 2009.  
Orientador: Maria Anice Mureb Sallum.  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.  
Palavras-chave: Nyssorhynchus; Sistemática; Myzorhynchella.
- 2005 - 2005** Especialização em Entomologia Médica. (Carga Horária: 656h).  
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP-USP, Brasil.  
Título: Estado Atual do Controle de Triatomíneos Domiciliados no Estado de São Paulo.
- 2006 - 2007** Aperfeiçoamento em Entomologia Médica e Seroepidemiologia.  
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP-USP, Brasil.  
Título: Entomologia Médica e Seroepidemiologia. Ano de finalização: 2007.  
Orientador: Delsio Natal.  
Bolsista do(a): A Fundação do Desenvolvimento Administrativo.
- 2000 - 2003** Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura/ Bacharelado.  
Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil.  
Título: Araneofauna de Solo do Parque Natural Municipal da Serra do Itapety (PNMSI), Mogi das Cruzes - SP.  
Orientador: Maria Santana de Castro Morini.



## Maria Anice Mureb Sallum

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1B - CA ZO - Zoologia

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/120024772482237>

Última atualização do currículo em 29/08/2015

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (1976), mestrado (1991) e doutorado (1994) em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo. Possui título de livre docente, pela Universidade de São Paulo, desde 2010. Atualmente é professor adjunto do Departamento de Epidemiologia da mesma universidade. Membro do Comitê Editorial das revistas: Infection, Genetics and Evolution, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz e Revista Brasileira de Entomologia. Tem experiência na área de Parasitologia, com ênfase em Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores, atuando principalmente nos seguintes temas: Entomologia Médica, Culicidae, Anopheles, Culex, taxonomia morfológica e molecular, ecologia, biodiversidade e evolução. **(Texto informado pelo autor)**

### Identificação

**Nome** Maria Anice Mureb Sallum

**Nome em citações bibliográficas** SALLUM, M. A. M.; Sallum, Maria Anice M.; Sallum, Maria Anice Mureb; Mureb Sallum, Maria A.; Mureb Sallum, Maria A.; Mureb Sallum, Maria Anice; Sallum, Maria AM; Sallum, Maria Anice; Maria Anise Sallum; Sallum, Maria Anise; SALLUM, M.A.M.; SALLUM, MARIA

### Endereço

**Endereço Profissional** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.  
AV. DR. ARNALDO, 715 Sala 210  
CERQUEIRA CESAR  
01246904 - São Paulo, SP - Brasil  
Telefone: (11) 30617731  
Fax: (11) 32821898

### Formação acadêmica/titulação

- 1991 - 1994** Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.  
Título: REVISÃO DA SEÇÃO SPISSIPES DE CULEX (MELANOCONION)(DIPTERA: CULICIDAE), Ano de obtenção: 1994.  
Orientador: OSWALDO PAULO FORATTINI.  
Palavras-chave: Culex (Melanoconion); Culicidae; Sistemática.  
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
- 1989 - 1991** Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.  
Título: ESTUDO TAXONÔMICO DO CIBÁRIO NA SEÇÃO SPISSIPES DE CULEX (MELANOCONION) (DIPTERA: CULICIDAE), Ano de Obtenção: 1991.  
Orientador: OSWALDO PAULO FORATTINI.  
Palavras-chave: Culex (Melanoconion); Culicidae; Sistemática.  
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
- 1979 - 1979** Especialização em Entomologia Médica. (Carga Horária: 560h).  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
- 1973 - 1976** Graduação em Ciências Biológicas.  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

### Pós-doutorado e Livre-docência

- 2010** Livre-docência.  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.  
Título: Estudo taxonômico sobre *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root (Diptera: Culicidae). Uma abordagem morfológica e molecular., Ano de obtenção: 2010.  
Palavras-chave: Microscópio eletrônico de varredura; Morfologia Ovos; gene mitocondrial COI; gene nuclear white; ITS2; *Anopheles strodei*.  
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Zoologia / Subárea: Taxonomia dos Grupos Recentes.  
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.  
Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico.
- 1998 - 2000** Pós-Doutorado.  
National Museum of Natural History.  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.  
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Zoologia.  
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Zoologia / Subárea: Taxonomia dos Grupos Recentes.